



Análise Qualitativa e Quantitativa dos Principais Tocoferóis e Fitoesteróis na Semente de Urucum (*Bixa Orellana L.*) por GC-MS

Palavras-Chave: URUCUM, TOCOFERÓIS, FITOESTERÓIS, CROMATOGRAFIA

Autores/as:

Matheus L. Dallaqua Silva [IQ – UNICAMP]

Mariana Baptista [IQ – UNICAMP]

Hans R. Zamora Obando [IQ – UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Ana Valéria C. Simionato (Orientadora) [IQ – UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O urucum (*Bixa Orellana*) é uma planta originária da América Central e América do Sul, cuja árvore é comumente chamada de urucuzeiro e, no inglês, é conhecida como annatto. A planta é conhecida por seu pigmento avermelhado intenso sendo amplamente utilizada na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, têxtil e de tintas [1,2] sendo atualmente o Brasil o maior produtor e consumidor mundial [3]. Sua produção é destinada majoritariamente à venda do grão triturado para a produção de corante, condimento comum na culinária brasileira, e na produção dos corantes norbixina e bixina [2,4], amplamente utilizados na indústria alimentícia [5]. Este projeto teve como objetivo a extração por Bligh & Dyer do óleo de urucum e análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) para a identificação de tocoferóis e fitoesteróis, ambos compostos com alto grau de atividade e importância biológica, com o intuito de tornar a utilização de subprodutos do urucum viáveis e pertinentes para a indústria alimentícia, cosmética e química [6-8].

METODOLOGIA:

A obtenção das amostras se deu através da doação de lotes da semente por produtores do estado de São Paulo. Após o recebimento dos lotes, foi pesado aproximadamente 0,6 g de sementes, transferiu-se para um becker junto a água deionizada e deixou-se a amostra no ultrassom por 45 minutos para facilitar a remoção da tintura exterior das sementes. Passado esse tempo, com o auxílio de um alfinete, raspou-se o exterior de cada semente para retirar a bixina e norbixina, a fim de evitar contaminações e interferências na análise, e limpou-se a semente novamente com água deionizada.

As amostras limpas foram secas com o auxílio de um guardanapo de papel para retirar o excesso de umidade e, posteriormente, deixadas para secar em um becker dentro de um dessecador.

Para a extração das amostras, as sementes foram congeladas com nitrogênio líquido para posterior maceração em almofariz. Após a maceração total de cada amostra, transferiu-se para um tubo de vidro com tampa rosqueável. Adicionou-se a cada tubo 1,4 mL de água deionizada, 4 mL de metanol, 2 mL de clorofórmio e realizou-se agitação automática por 5 minutos. Após isso, adicionou-se mais 2,0 mL de clorofórmio, agitando novamente por mais 2 minutos e, por fim, adicionou-se mais 2,0 mL de água deionizada agitando por outros 5 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos e armazenadas envoltas em papel-alumínio para evitar a fotodegradação dos compostos alvo da amostra.

As amostras foram secadas através de dois métodos diferentes, a fim de encontrar as melhores condições. A princípio adicionou-se $MgSO_4$, levando-as ao agitador por aproximadamente 5 minutos. Após isso separou-se a fase orgânica da amostra com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e cuidadosamente transferiu-se para um segundo tubo de ensaio, também envolto em alumínio. Seguidamente secou-se parcialmente o extrato em nitrogênio até aproximadamente 1,0 mL e transferiu-se o mesmo para um vial para cromatografia gasosa âmbar, com posterior secagem e armazenamento. A segunda abordagem foi feita apenas pela transferência da fase orgânica para um tubo e posterior secagem do mesmo para armazenamento em vial âmbar. Com todas as amostras secas e pesadas, armazenou-se os vials a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Para a derivatização das amostras, preparou-se uma solução de metoxiamina 10 ppm em piridina. Adicionou-se 30 μL da solução preparada às amostras e deixou-se reagir por 14 horas para finalização da metoximação. Em seguida, adicionou-se 30 μL de N, O-bistrifluoroacetamida e Cloreto de trimetilsililo (BSTFA + TMCS 99:1) para a silição, reagindo por mais 3 h.

Também, foi preparada uma solução padrão de valina, serina, asparagina, 4-trans-hidroxi prolina, metionina, creatinina, alanina, lisina, glicose, ácido aspártico, ácido glutâmico e adenosina para avaliar a performance na aquisição dos dados metabolômicos.

As análises por GC-MS foram realizadas num cromatógrafo Agilent (7890C) acoplado a um espectrômetro de massas (5975C). Utilizou-se He como gás de arraste numa vazão de 1,1 mL/min. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Agilent J&W DB-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) com uma programação de temperatura inicial de $60\text{ }^\circ\text{C}$, mantida por 1 minuto; aquecimento até $325\text{ }^\circ\text{C}$ numa razão de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; temperatura final de $325\text{ }^\circ\text{C}$ mantida por 10 min. A temperatura da fonte, da interface GC-MS, e do quadrupolo foram mantidas em $250\text{ }^\circ\text{C}$, $290\text{ }^\circ\text{C}$ e $200\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A fonte de íons (EI) operou com uma energia de ionização de -70 eV . Os dados foram adquiridos por meio do software MSD ChemStation (G1701EA E.02.01.1177) na faixa de 50 – 600 m/z .

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na primeira etapa do estudo, avaliou-se o método de injeção que apresentaria melhor repetibilidade e rendimento. Assim foram selecionadas 4 amostras de acordo com suas respectivas taxas de extração de óleo (Tabela 1) baseado na relação entre a massa de

óleo extraída da amostra e a massa inicial da amostra, sendo selecionado o modo *splitless* de injeção para as amostras A4, A5, A6 e A8 e modo *split* 10:1 para a amostra A4, a fim de otimizar o método.

Tabela 1: Porcentagem de óleo extraído das sementes de urucum.

Amostra	Massa da amostra (g)	Massa de óleo extraída (g)	% de óleo recuperado
A4	0,6078	0,0095	1,56
A5	0,6097	0,0124	2,03
A6	0,6079	0,0080	1,31
A8	0,6032	0,0080	1,32

A princípio, os cromatogramas mostram a diferença gerada pela forma de injeção das amostras (Figura 1), sendo atribuída ao volume de amostra injetado - acarretando uma resposta mais intensa para o modo *splitless* quando comparada ao modo *split* 10:1. Assim, tomou-se como padrão o método de injeção *splitless* para garantir uma resposta analítica desejável e uma reprodutibilidade dos dados obtidos (Figura 2) uma vez que, empiricamente, se observou a ineficácia do método *split* 10:1.

Após a inspeção dos cromatogramas no software MassHunter Qualitative Analysis (B.07, SP2), o tratamento dos dados e a identificação dos compostos foram feitas no software MS-DIAL (V 4.70) e a identificação feita com o auxílio das bibliotecas Fiehn, NIST e GOLM. A Tabela 2 apresenta a relação de quantos compostos foram identificados pelas bibliotecas Fiehn e NIST e quantos foram encontrados pelo software.

Tabela 2: Número de Compostos Identificados/ Total de Compostos Encontrados por Bibliotecas em sementes de urucum após análise por GC-MS.

Amostra	Fiehn	NIST	GOLM
A4 - n. f.* = 842	71	311	98
A5 - n. f. = 846	61	267	107
A6 - n. f. = 795	52	229	79
A8 - n. f. = 864	71	232	91

*n.f. = número de *features*.

Comparando-se os compostos encontrados pelas bibliotecas, utilizando-se um critério de similaridade de, no mínimo, 70% em cada amostra, percebeu-se a presença de compostos de interesse, conforme apresentado na Tabela 3, esses foram ranqueados de 1 à 10, conforme ordem de saída da coluna e demonstrados na imagem 3. O critério de seleção para esses compostos se deu pela classificação como fitoesterol ou tocoferol, pela atividade biológica e pela recorrência do composto nas diferentes amostras e diferentes bibliotecas, buscando abranger o máximo de compostos possíveis [10]. Entretanto, foram encontradas diversas espécies de interesse para futuras pesquisas, tais como ácidos graxos e sacarídeos.

Tabela 3: Compostos Identificados em sementes de urucum, seus respectivos t_r e relação m/z

Composto	t_r (min)	m/z
δ -tocopherol (1)	27.35	209.1
colesterol (2)	29.20	129.1
hidroxicolesterol (3)	29.67	296.2
campesterol (4)	29.71	129.1
epi campesterol (5)	29.73	225.2
stigmasterol (6)	29.89	219.1
β -sitosterol (7)	30.27	482.4
lanosterol (8)	30.16	189.1
β -sitosterol (9)	30.27	482.4
fucosterol (10)	30.58	386.3

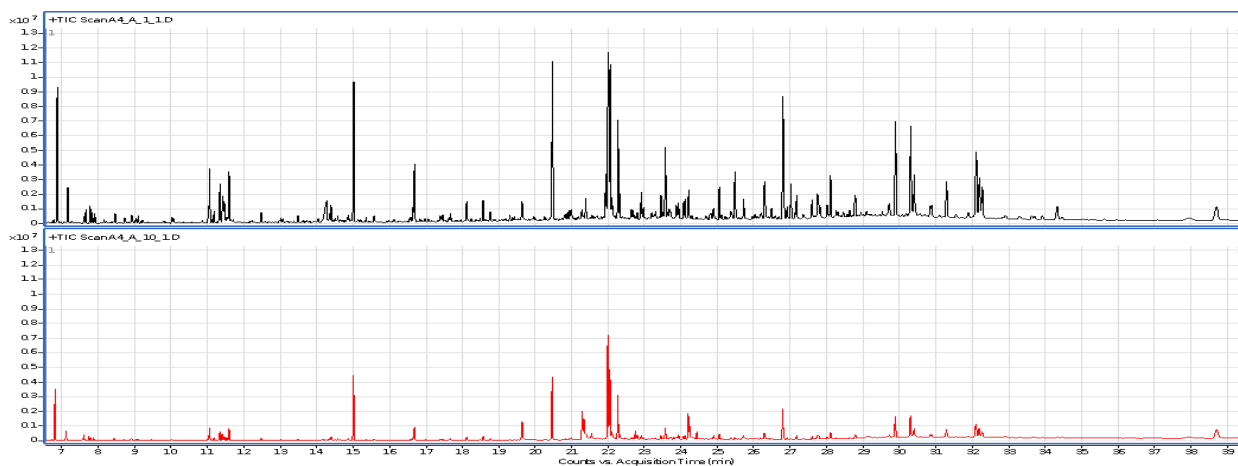


Figura 1: Comparação entre modos splitless e split 10:1 para a amostra A4

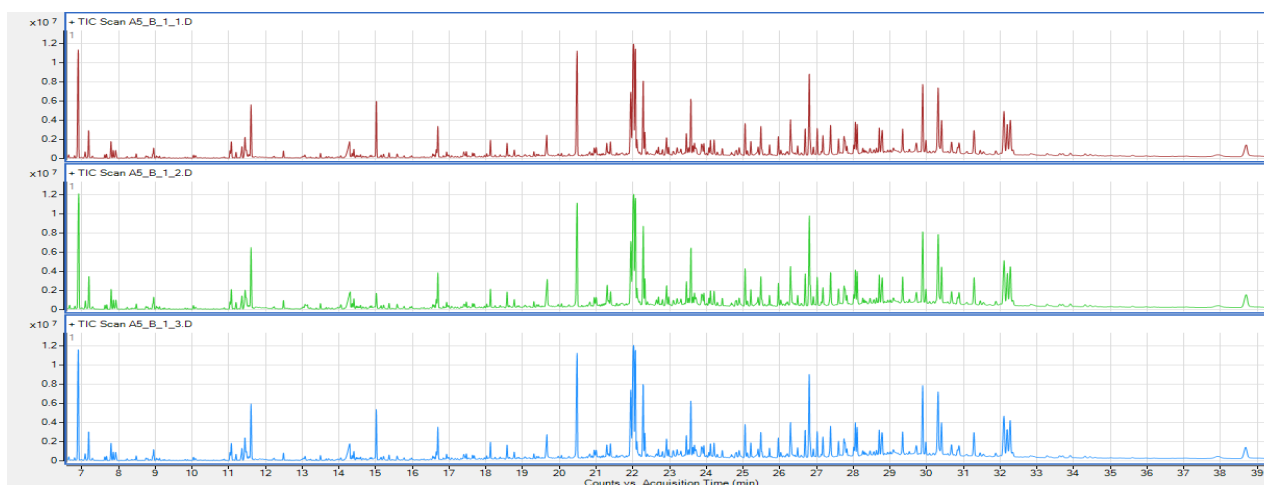


Figura 2: Cromatograma da amostra A5 em triplicata

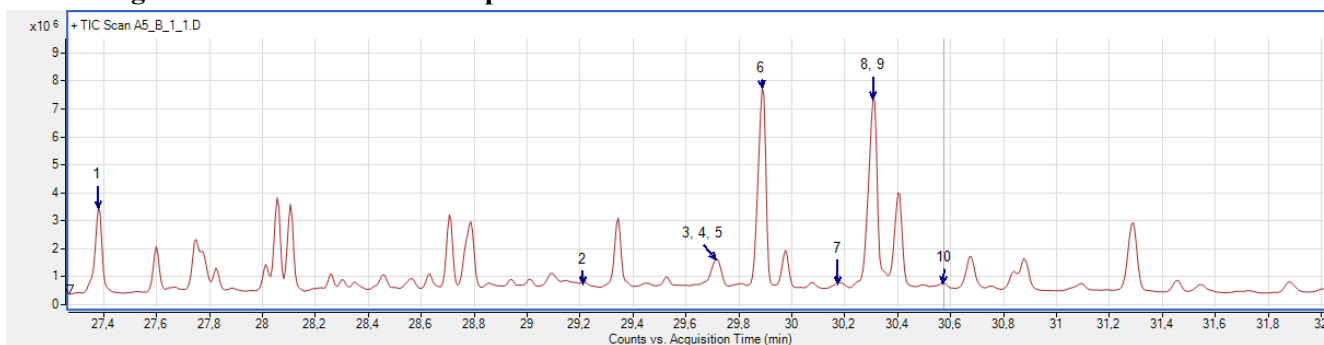


Figura 3: Picos referentes à saída dos compostos encontrados na amostra A5

CONCLUSÕES:

Devido às restrições causadas pela pandemia de COVID-19 e reparos no equipamento de GC-MS, a quantificação dos compostos foi preterida e, assim, decidiu-se realizar somente um fingerprint da semente de urucum para auxiliar futuros estudos quanto à quantificação de compostos chaves da semente.

Com isso, vê-se que a semente de urucum apresenta uma grandiosa variabilidade de compostos biologicamente ativos com grau de importância e relevância tanto para a comunidade científica, quanto para a indústria alimentícia. Assim a ocorrência de diversos fitoesteróis e o extenso cultivo do produto em solo brasileiro, justificam maiores pesquisas sobre a semente de urucum para

utilização e aproveitamento dos compostos e dos subprodutos advindos de uma espécie tão rica.

BIBLIOGRAFIA

1. NETTO, Rita C. M., **Dossiê corantes. FIB – Food Ingredients Brasil.** Nº 9, 2009.
2. Dos Santos EJ, Lourenzani WL, Lourenzani **Histórico e ascensão do urucum na microrregião de dracena- são paulo / history and ascension of annatto cultivation in the microregion of dracena, são paulo state.** *Rev Bras Eng Biosistemas* 12:29. AEBS (2018) <https://doi.org/10.18011/bioeng2018v12n1p29-39>
3. Fabri EG, Teramoto **Urucum: fonte de corantes naturais.** *Hortic Bras* 33:140–140. JRS (2015) <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000100023>
4. dos Santos, E. J., Lourenzani, W. L., & Lourenzani, A. E. B. S. (2019). **Coordenação do sistema agroindustrial do urucum na Microrregião de Dracena, Estado de São Paulo.** *Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional*, 15(1).
5. Mendes, A. M. D. S., Figueiredo, A. F. D., & Silva, J. F. D. (2006). **Crescimento e maturação dos frutos e sementes de urucum.** *Revista Brasileira de Sementes*, 28(1), 133-141.
6. Rêgo, A. C. D., Cândido, M. J. D., Pereira, E. S., Feitosa, J. V., & Rêgo, M. M. T. (2010). **Degradação de silagens de capim-elefante contendo subproduto do urucum.** *Revista Ciência Agronômica*, 41, 482-489.
7. Bligh EG, Dyer WJ (1959) **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
8. Jensen SK (2008) **Improved Bligh and Dyer extraction procedure.** *Lipid Technol* 20:280–281. <https://doi.org/10.1002/lite.200800074>
9. Gonçalves, R. P., Março, P. H., & Valderrama, P. (2015). **Degradação térmica de tocoferol e produtos de oxidação em diferentes classes de azeite de oliva utilizando espectroscopia UV-VIS e MCR-ALS.** *Química Nova*, 38, 864-86
10. Subarnas, A., Apriyantono, A., & Mustarichie, R. (2010). **Identification of compounds in the essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) that inhibit locomotor activity in mice.** *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4771-4781.