



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

NATHALIA DE MATOS SANTOS

EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DAS SEMENTES DE URUCUM
(Bixa orellana L.)

Assis
2013

NATHALIA DE MATOS SANTOS

EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DAS SEMENTES DE URUCUM
(*Bixa orellana L.*)

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação

Orientador: Prof^a Dr^a Silvia Maria Batista de Souza
Área de Concentração: Química

Assis
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Nathalia de Matos

Extração do pigmento das sementes de Urucum
(*Bixa orellana*) / Nathalia de Matos Santos.

Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis,
2010.

56p.

Orientador: Profª Drª Silvia Maria Batista de Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de
Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Pigmento Natural. 2. Urucum 3. *Bixa orellana* L.

CDD:660
Biblioteca da FEMA

EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DAS SEMENTES DE URUCUM
(*Bixa orellana L.*)

NATHALIA DE MATOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do Curso de Graduação,
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientador: Prof^a Dr^a. Sílvia Maria Batista de Souza

Analisador: Prof^a Dr^a Mary Leiva de Faria

Assis
2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á minha família, em especial a minha mãe pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas grandes oportunidades, por estar sempre me iluminando e me dando força nos momentos de dificuldade.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Silvia Maria Batista de Souza, pela orientação durante a realização do trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Idécio Nogueira por ter compartilhado comigo toda sua experiência ajudando na finalização deste trabalho. À Prof^a Dr^a Mary Leiva por sua atenção e orientação.

À minha mãe, Maria, ao meu irmão, Victor, aos meus avós, Enezio e Pedrina, e ao meu namorado, Helton Rodrigo, pelo grande apoio e incentivo em todos os momentos.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho, em especial as minhas amigas Camila Maschio e Bruna Roncon.

RESUMO

Cada vez mais o mercado globalizado vem restringindo o uso de corantes sintéticos em alimentos, levando os pesquisadores e a indústria ao interesse em pesquisas por materiais naturais em particular os vegetais. O urucum (*Bixa orellana*) é uma planta que possui um corante importante para a indústria. Das suas sementes obtêm-se os carotenóides e a bixina que tem um grande valor comercial. Esse trabalho tem como objetivo extrair o pigmento do urucum com a finalidade de contribuir na sua função como corante na Indústria cosmética e alimentícia. A extração dos pigmentos do urucum foi realizada com uma solução de 5% de KOH em etanol, sob agitação, aquecimento e controle de temperatura, tendo seu pH corrigido para 8,0. Em seguida, foi realizada uma cromatografia de camada delgada (TLC) com clorofórmio e álcool metílico na proporção de 95:5, onde foi revelado 4 substâncias diferentes. De acordo com os cálculos de Fator de referência (Rf) a segunda mancha exibiu o valor de Rf: 0,85 essa é a mais próxima do padrão que apresenta Rf igual a 0,8 descrito na literatura. Logo após preparou-se a cromatografia de coluna sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de 190 mL de clorofórmio e 10 mL de álcool metílico. Foi adicionado na coluna 4 mL da amostra de urucum extraída, de onde foi retirada 32 frações em tubos de ensaios enumerados para análise em espectrofotômetro. Através da análise no espectrofotômetro, utilizando como solvente o clorofórmio, ficou comprovado que por meio da cromatografia de coluna foi obtida a bixina em sua forma pura. Conclui-se que pela metodologia aplicada pode-se obter a bixina das sementes de urucum. Este trabalho, além da extração de pigmentos do urucum, também relata como esse tema pode ser empregado no ensino médio para estudo de corantes naturais, extração de pigmento, e a estrutura química da bixina, podendo explorar suas funções orgânicas.

Palavras-chave: Pigmento Natural; Urucum; *Bixa orellana*.

ABSTRACT

Increasingly globalized market has been restricting the use of synthetic dyes in foods, leading researchers and industry interest in the research of natural materials in particular vegetables. The annatto (*Bixa orellana*) is a plant that has a dye important to the industry. From the seeds obtained by the carotenoids bixin and having a high commercial value. This work aims to extract the pigment from annatto in order to contribute to its function as a coloring agent in cosmetics and food industry. The extraction of annatto pigment was accomplished with a 5% solution of KOH in ethanol under stirring, heating and temperature control, having its pH adjusted to 8.0. Then we carried out a thin layer chromatography (TLC) with chloroform and methyl alcohol at a ratio of 95:5, where it was revealed 4 different substances. According to the calculations of reference factor (R_f), the second stain showed R_f value : 0.85 that is the closest to the pattern that presents R_f of 0.8 described. Immediately after prepared to column chromatography on silica gel, using as eluent a mixture of 190 ml of chloroform and 10 ml of methyl alcohol . Was added in column 4 mL sample extracted annatto, from where it was withdrawn 32 fractions in test tubes listed for spectrophotometer analysis. Through analysis on a spectrophotometer using chloroform as solvent, it was proved that by means of column chromatography bixin was obtained in pure form. It is concluded that the methodology can be applied to obtain bixin of annatto seeds. This work, in addition to the extraction of annatto pigments, also recounts how this subject can be used in high school to study natural dyes, pigment extraction, and chemical structure of bixin may exploit their bodily functions.

Keywords: Pigment Natural, Annatto, *Bixa orellana*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Urucuzeiro.....	17
Figura 2	– Fruto contendo semente de <i>Bixa orellana</i>	19
Figura 3	– Aspecto da folha de <i>Bixa orellana</i> com Oídio.....	20
Figura 4	– Aspecto da folha de <i>Bixa orellana</i> com Cercosporiose.....	21
Figura 5	– Estrutura química do ácido gálico, apigenina e geraniol.....	22
Figura 6	– Estrutura química do pirofosfato de farnesilo	23
Figura 7	– Estrutura química bixina, isobixina e norbixina.....	25
Figura 8	–Biossíntese da bixina.....	26
Figura 9	– Estrutura química e clivagem do β -caroteno.....	27
Figura 10	– Estrutura química do tocoferol e trocotrienol.....	28
Figura 11	– Formação da espécie reativa do oxigênio.....	31
Figura 12	– Estrutura química dos corantes naturais.....	33
Figura 13	– Estrutura química dos corantes sintéticos.....	34
Figura 14	– Estrutura química da bixina.....	35
Figura 15	– Extração do pigmento com agitador e aquecimento.....	39
Figura 16	– Filtração das amostras.....	39
Figura 17	– Realizando a correção do pH.....	40
Figura 18	– Cromatografia de TLC.....	40
Figura 19	–Cromatografia de coluna.....	41

Figura 20	– Resultado da cromatografia de TLC.....	42
Figura 21	–Etapas da cromatografia de coluna.....	44
Figura 22	– Espectro padrão da bixina.....	44
Figura 23	– Espectro da fração 4	45
Figura 24	– Espectro da fração 22	45

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	HISTÓRICO DO URUCUM.....	15
3.	ASPECTOS BOTÂNICOS.....	17
4.	COMPONENTES QUÍMICOS.....	22
4.1	CAROTENÓIDES PRESENTES NO URUCUM.....	23
4.1.1	Bixina e norbixina.....	24
4.1.2	Licopeno e b-caroteno.....	25
4.1.3	Tocoferóis e Tocotrienóis.....	28
5.0	AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS CAROTENOS.....	30
5.1	RADICAIS LIVRES.....	30
6.0	CORANTE.....	32
7.0	CORANTE NATURAIS, EXTRAÇÃO E APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO.....	35
8.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
8.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	37
8.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	38
8.2.1	Extração do pigmento.....	38
8.2.2	Cromatografia de TLC.....	40
8.2.3	Cromatografia de coluna.....	41
8.2.4	Espectro.....	41
9.0	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
9.1	EXTRAÇÃO DO CORANTE.....	42
9.2	CROMATOGRAFIA DE TLC.....	42
9.3	CROMATOGRAFIA DE COLUNA.....	42
9.4	ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	45
10	CONCLUSÃO.....	48

REFERÊNCIAS..... 49

1. INTRODUÇÃO

O mercado globalizado vem restringindo o uso de corantes sintéticos em alimentos e, essa restrição imposta pela Organização Mundial de saúde, tem levado os pesquisadores e a indústria ao interesse em pesquisas por materiais naturais, em particular os vegetais, que são muito usados como corantes. Entre os corantes naturais, o urucum é o mais utilizado no mundo, podendo ser aplicado em produtos alimentícios. Sua utilização se estende a outros segmentos como a indústria têxtil, de tintas, ração animal, cosmético e farmacológico (ALVES, 2005).

O urucum (*Bixa orellana L.*) é um arbusto tropical, uma planta nativa do Brasil, mas desenvolve-se também em outras regiões da América do Sul e central. Suas sementes apresentam em sua película externa um carotenóide avermelho denominado bixina. De suas sementes podem ser obtido corante de diversas tonalidades que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho (SILVA, 2007).

A extração do pigmento do urucum ocorre na camada externa de suas sementes, que são constituídas basicamente de *cis*-bixina, o qual é um corante natural permitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por não ser tóxico e não alterar o sabor dos alimentos. Da bixina são obtidos os demais pigmentos do urucum, como a norbixina. Seus corantes apresentam características hidrossolúveis e lipossolúveis, podendo ser empregado em grande número de produtos alimentícios. Apresentam também, maior estabilidade comparado a outros corantes naturais, coloração atrativa e trata-se de uma cultura abundante (SILVA, 2007)

O corante da bixina é obtido por processos mecânicos e/ou empregando solventes como: os óleos vegetais, para a produção de extratos lipossolúveis; solução alcalina, para o extrato hidrossolúvel ou ainda os solventes orgânicos como, acetona, etanol, hexano, propilenoglicol ou clorofórmio. Após a eliminação do solvente, alguns dos extratos obtidos são normalmente processados na forma de pasta ou em pó. (FRANCO, 2008).

O desenvolvimento de tecnologia que conduza não só a extração do pigmento bruto, mas principalmente que leve à obtenção de bixina de elevada pureza é de fundamental importância para agregar valor ao produto. Disponibilizar no mercado a bixina de elevada pureza, significa maior competitividade e certeza de expansão comercial (FRANCO, 2008)

Esse trabalho tem como objetivo extrair o pigmento do urucum com a finalidade de contribuir na sua função como corante na Indústria cosmética e alimentícia.

2. HISTÓRICO DO URUCUM

Os primeiros registros sobre o urucum e diversas espécies de vegetais são datadas em 1500, na Carta escrita por Pero Vaz de Caminha ao Rei D.Manoel, no descobrimento do Brasil. Segundo Filgueiras et al. (2002, p.267) Caminha descreveu essa planta como:

...uns ouriços verdes, de árvores que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos, e eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam...

Sua denominação científica *Bixa orellana* Linné se deu em homenagem ao primeiro botânico que o estudou, Francisco de Orellana (FONNEGRA et. al, 2007).

Pertencente á família botânica Bixaceal, é uma planta arbórea, rústica, perene, de origem pré-colombiana. O urucum ou *Bixa orellana* é uma planta originária da América do Sul, mais especificamente da região amazônica, é encontrada também no Caribe e África, sendo os maiores produtores Quênia, Brasil e Peru. Seu nome popular tem origem da palavra tupi "uru-ku", que significa "vermelho" (BARBOSA, 2006).

Além de urucum, a *B.orellana* apresenta outros nomes populares no Brasil como, urucu e colorau. Na Bahia esse é conhecido como açafroeira da terra e açafroa. No Peru, Cuba e Porto Rico é conhecida como bija e achiote. No México é conhecido como axiotl, na Bolívia como urucu e onotto e onotillo na Venezuela (CORRÊA et. al, 1984 apud COSTA, 2007).

A parte mais utilizada das plantas são suas sementes, mas também utiliza-se as raízes e folhas. Como citado em documentos históricos, obtém-se das sementes o

corante vermelho, usado inicialmente pelos indígenas como tinta corporal, e que hoje tem grande importância na indústria alimentícia e cosmética (ALONSO, 2004).

3. ASPECTOS BOTÂNICOS

O urucuzeiro também chamado de urucueiro pertence à família bixaceae e ao gênero bixa, tendo com espécies: *Bixa orellana* L.(espécie mais cultivada), *Bixa arbórea*, *Bixa Americana*, *Bixa Purpúrea*, *Bixa Upatensis*, *Bixa Tinctoria* e *Bixa Oviedi*. (FRANCO, 2002 apud SILVA, 2007).

É uma árvore pequena ou arbusto, com folhagens de três a cinco metros de altura, podendo alcançar 10 metros. Seu tronco é curto tendo de 20 a 30 cm de diâmetro. Suas folhas são alternadas entre 10 a 20 cm de comprimento e de 5 a 10 cm de largura, pontiagudas de cor verde (figura 1). Suas flores podem ser brancas ou rosadas, o seu fruto tem formato de cápsula, coberta externamente com apêndices flexíveis vermelhos, verdes ou pardos (REVILLA, 2001).



Figura 1- Urucuzeiro

As condições consideradas ótimas para o cultivo do urucueiro que se adaptam aos mais variados condições climáticas são: temperatura entre 22 a 27. Sob condições

de frio prolongado, o urucum não se desenvolve, ocorrendo redução na sua produtividade. A quantidade de chuva deve ser acima de 1.200 milímetros, bem distribuída durante o ano. Devem ser evitadas as áreas sujeitas a ventos fortes ou frios, alta luminosidade. Costuma-se efetuar sua plantação no início de temporada chuvosa. (MANFIOLLI, 2004)

O urucueiro se desenvolve melhor em solos profundos, bem drenados para evitar que as plantas em períodos de chuva permaneçam sob condições de encharcamento por períodos prolongados. O pH do solo deve estar entre 5,5 e 7,0, tornando importante a fertilização orgânica ou mineral, pois esse tipo de solo enriquecido é difícil de se encontrar naturalmente, sendo necessária na fase inicial de seu crescimento a adição de alguns nutrientes como cálcio, nitrogênio, potássio, ferro e manganês (FARIA, 2004).

As mudas do urucueiro geralmente são produzidas em canteiros ou em semeadura em sacos plásticos. O preparo do solo para o cultivo consiste basicamente, em uma aração aproximadamente 30 cm de profundidade. A calagem deve ser procedida conforme os resultados da análise do solo, de 60 a 90 dias antes do plantio, para maior eficiência (MANFIOLLI, 2004)

Segundo Revilla (2001), o fruto pode ser colhido após 16 meses da sementeação, quando estiverem maduros, o que pode ser identificado pela maturação das cápsulas que é dada pela mudança de sua cor quando passa do verde, amarelo ou vermelho para castanho ou marrom. É importante colher apenas as cápsulas que se apresentem maduras e secas, uma vez que o porcentual elevado de umidade nas sementes contribuirá negativamente para a perda da qualidade das mesmas, assim como, o aparecimento de mofos.

Suas sementes medem de 0,3 a 0,5cm de diâmetro, e seu formato varia em piramidal a cônico, a superfície das sementes são lisas, com coloração vermelha (figura 2). Na obtenção de suas sementes, devem se escolher as plantas produtivas e rústicas, resistente a pragas e doenças, com alto teor de bixina e maduras. Quando as sementes são retiradas das cápsulas essa já pode ser semeada, se isso não for feito, deixar as sementes á sombra, em local ventilado, mais a sua armazenagem deve ser evitada (FARIA, 2004).



Figura 2- Fruto contendo semente de *Bixa orellana*

A qualidade das sementes está diretamente relacionada com o teor de bixina produzida, e varia de região para região, pois dependem de sua variedade, clima e solo. É de extrema importância cuidados no cultivo, pois para suas sementes serem classificadas para exportação, o teor de bixina deve ser superior a 2,5%, o que ainda não acontece na média das sementes nacionais (FARIA, 2004).

Existem algumas pragas e doenças que podem vir atacar o urucueiro que é uma planta tolerante a pragas causadoras de danos econômicos as espécies cultivadas. Dentre essas se destacam: o cochonilhas (*Pinnaspis sp*), ácaros, bezourinho (*Capsus sp*) e as formigas cortadeiras (*Atta sp*), trips (*Selenothrips sp*). O percevejo (*Leptoglossus sp*), chupão dos frutos (hemíptero da família Coreidae), e o caruncho do urucum (inseto da ordem Coleóptera e família Bruchidae), atacam diretamente os seus frutos, causando danos às sementes e prejudicando sua comercialização (FRANCO et. at, 2002 apud MANFIOLLI, 2004).

A principal doença que ataca o urucueiro é causada pelo fungo oídio bixa (*Oidium sp*), pertencente à subdivisão Ascomycotina, família Erysiphaceae. Um ataque intenso nas folhas pode prejudicar as funções metabólicas normais da planta, provocando deficiência no seu desenvolvimento. A doença se manifesta com

aparecimento de bolores brancos nas folhas e nos pêlos dos frutos da variedade bico de pato (figura 3).



Figura 3- Aspecto da folha de *Bixa orellana* com Oídio (RUSSOMANO et.al, 2012): (A) Oídio incidente em folhas jovens das partes mais baixas da planta de urucum ; (B) Sintomas iniciais de Óídio na folha de urucum; (C) Crescimento em folhas de urucum; (D) Sintomatologia avançada de *O.bixae* em folha de urucum.

Outra espécie causadora de doença no urucueiro é a *Rhizoctonia solani*, que atinge a planta somente no estágio de muda, provocando a queda do colo das mudas, por perderem sua sustentação. Caso não haja controle, as perdas podem chegar à totalidade da plantação (FRANCO et. al, 2002 apud COSTA, 2007).

A cescosporiose, causada por *Cescospora bixae* Allesch e Noack, afeta apenas folhas maduras. Seus sintomas são manchas irregulares de cor marrom avermelhada a marrom escura, circundadas por um halo amarelo (figura 4). Se não houver controle, as folhas secam e caem. (FRANCO et. al, 2002 apud COSTA, 2007).

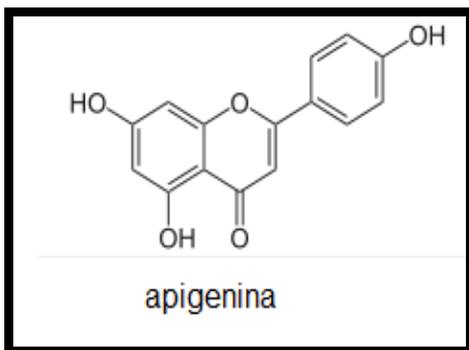
O fungo *Pythium*, causa a podridão da raiz, pequenas lesões necróticas de cor marrom escuro. Nas partes aéreas, aparecem manchas amarelas generalizadas, e que quando atingem um estágio avançado, causam a morte da planta (FRANCO et. al, 2002 apud COSTA, 2007).



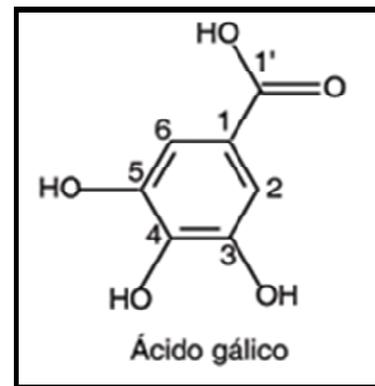
Figura 4- Aspecto da folha de *Bixa orellana* com cercosporiose (RUSSOMANO et. al, 2012 p.47)

4. COMPONENTES QUÍMICOS

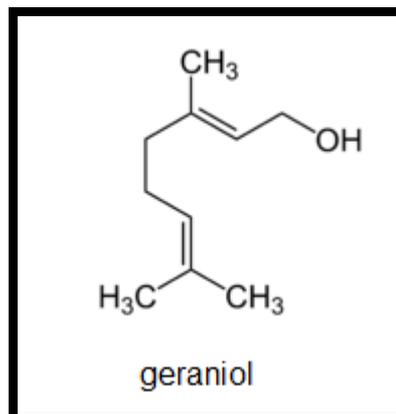
A *Bixa orellana* é constituída por muitos compostos químicos dentre eles o grupo dos flavonóides, destacando-se o glicosídeo de apigenina (figura 5 a), bisulfato de apigenina e hipoaletina. Tendo também ácido gálico (figura 5 b), ácido alfitólico, óleo essencial, diterpenos (geraniol, geranil) (figura 5c), além de vestígios de alcalóides. Dentre os carotenóides estão a bixina, norbixina, (que compõem a maior parte do pigmento vermelho extraído das sementes, tendo maior valor comercial) orelina, tocotrienóis, tocoferóis, caroteno, criptoxantina, metilbixina, luteína, vitaminas (A, B e C), proteínas, açúcares, celulose, gorduras, cálcio, ferro e fósforo (ALONSO, 2004).



(a)



(b)



(c)

FIGURA 5- Estrutura química: a) ácido gálico b) apigenina e c) geraniol (COUTINHO; MUZITANO; COSTA 2009)

Segundo Alonso (2004) o urucum tem trinta e cinco componentes que foram identificados, entre eles: pirofosfato de farnesilo (11,6%) (figura 6), acetato de occidentalol (9,7%), a bixina e a norbixina, que são os principais constituintes. Sua quantidade total varia significativamente, os valores comuns são de 2-5%, mas seu conteúdo pode chegar a cerca de 7% do peso seco das sementes. Outros componentes são acetona, achiotina, ácido tomentósico, éster metílico de trans-bixina apocarotenoides.

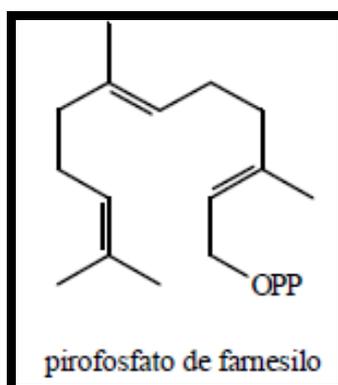


FIGURA 6- Estrutura química do pirofosfato de farnesilo (JUNIOR, 2002, p.10)

4.1 CAROTENÓIDES PRESENTES NO URUCUM

Os carotenóides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, muito utilizado como corantes e um grande precursor da vitamina A. Estima-se que sua produção mundial anual de biomassa seja de 100 milhões de toneladas (FRANCO,2008)

Os carotenóides formam um tipo incomum de agentes redutores biológicos, pois reduzem os produtos de oxidação a baixos níveis de oxigênio, pois altos níveis de oxigênio levam à destruição dos carotenóides. Na maioria dos tecidos biológicos, o nível de oxigênio é baixo, então os carotenóides adquirem importância como antioxidante. Os carotenóides agem como seqüestradores dos radicais peroxila reduzindo a oxidação do DNA e lipídios ou desativando o oxigênio singlete, essa desativação pode se dar de duas formas, pela reação química do carotenóide com

$^1\text{O}_2$ ou pela transferência física da energia de excitação do $^1\text{O}_2$ para o carotenóide (DAVID; BARREIROS; DAVID, 2006).

As respectivas colorações dos carotenóides vão desde o amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho intenso. Isso acontece pela multiplicidade de duplas ligações conjugadas na estrutura mais freqüente do tipo C40. A caracterização de cada variante estrutural é por meio da espectrofotometria com comprimento de onda na região do ultravioleta (UV) e do visível (FONTANA et. al, 1997). A bixina e seus isômeros têm absorvância máxima á cerca de 500nm e 470nm. Já o β -caroteno absorve na faixa 450nm (ZERAIK; YARIMAKE, 2008)

Os carotenóides oxidam com facilidade, pois contem um grande número de ligações duplas conjugadas. Esta oxidação ocasiona a perda de cor dos carotenóides em alimentos, sendo Ester os principais mecanismos de degradação. A estabilidade á oxidação de um pigmento é altamente dependente do seu ambiente (SCHAWARTZ; ELBE et. al,2010).

4.1.1 Bixina e Norbixina

A primeira vez que a bixina foi isolada das sementes de *Bixa orellana* ocorreu em 1875, mas somente em 1961 a sua estrutura completa foi estabelecida através de estudos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze (BARBOSA, 2006).

A bixina é um apocarotenóide (um grupo derivado dos carotenóides, os apocarotenóides, é oriundo da clivagem oxidativa dos carotenos) com uma cadeia de 25 carbonos que constitui, em média, 2,5% das sementes secas da *Bixa Orellana*, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, ocorrendo naturalmente na forma *cis*. Porém, durante o processo de extração, quando submetido à alta temperatura, é isomerizada conduzindo à forma *trans* mais estável, a qual é denominada isobixina. Retirando-se o grupo metil éster da bixina, tem-se a norbixina, um ácido dicarboxílico (figura 7) (BARBOSA, 2006).

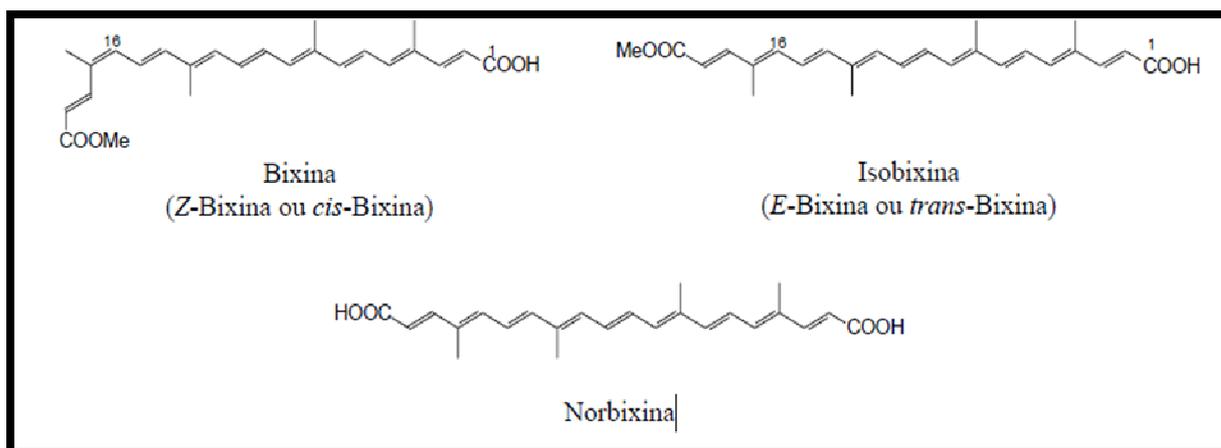


Figura 7- Estrutura química da Bixina, Isobixina e Norbixina
(In: BARBOSA, 2006, p.7)

Os isômeros *cis*-bixina, *trans*-bixina, *cis*-norbixina e *trans*-norbixina diferem em algumas características físicas. A *cis*-bixina é solúvel na maioria dos solventes orgânicos polares, onde apresenta uma coloração mais alaranjada, porém insolúvel em óleos vegetais e água, podendo se converter rapidamente em *trans*isômeros devido a sua instabilidade. A *trans*-bixina tem propriedades semelhantes ao isômero *cis*, porém apresenta coloração vermelha em solução e é solúvel em óleo vegetal (SATYANARAYANA et.al , 2003).

A bixina (monometiléster do ácido dicarboxílico norbixina) é o principal componente colorido de *B.orellana* (80% dos carotenóides totais), estando sujeita a isomerização devida á intensa insaturação. O composto presente em maior quantidade nas plantas são os isômeros *cis* metil-hidrogênio (CUSPIRENA et. al 2002, apud COSTA 2007).

No mecanismo de biossíntese da bixina estão envolvidas as enzimas como dioxigenases, metiltransferases e aldeído desidrogenases que participam de uma série de reações a partir de um precursor com 40 carbonos. Por já terem identificado traços de derivados de licopeno acumulados na planta, acredita-se que esse seja o precursor, no caminho proposto para biossíntese da bixina (figura 8) (BOUVIER et.al,2003 apud COSTA 2007).

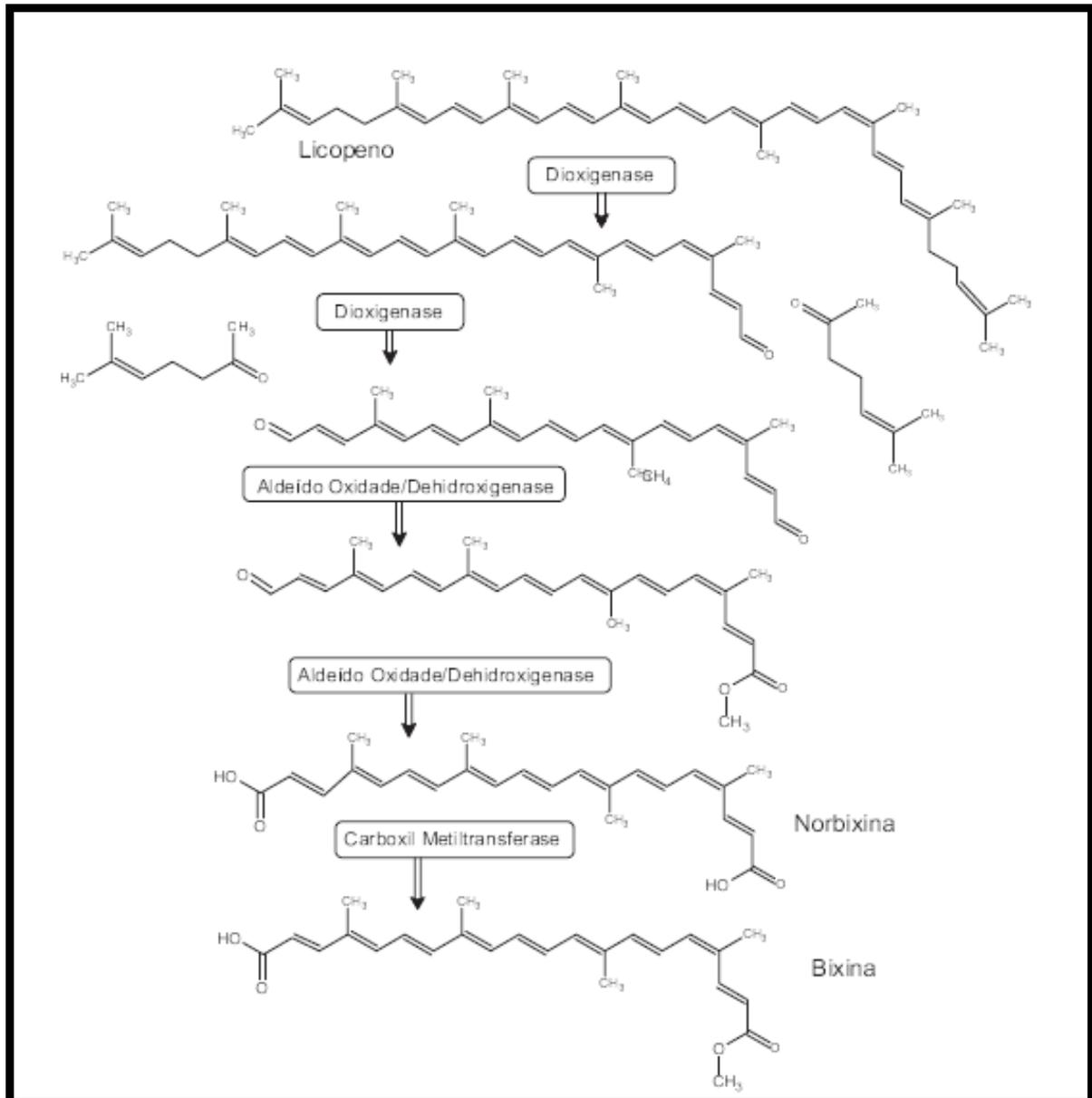


Figura 8- Biossíntese da bixina (In: OLIVEIRA, 2005, p.27)

4.1.2 Licopeno e β -caroteno

O β -caroteno é considerado o caroteno mais abundante nos alimentos sendo o mais interessante economicamente, pois apresenta maior atividade vitamínica. Sendo o único carotenóide que apresenta dois radicais β -ionona, que ao romper-se forma

duas moléculas de pró-vitamina A (figura 9). (AMBRISIO et. al, 2006 apud OLIVEIRA, 2010).

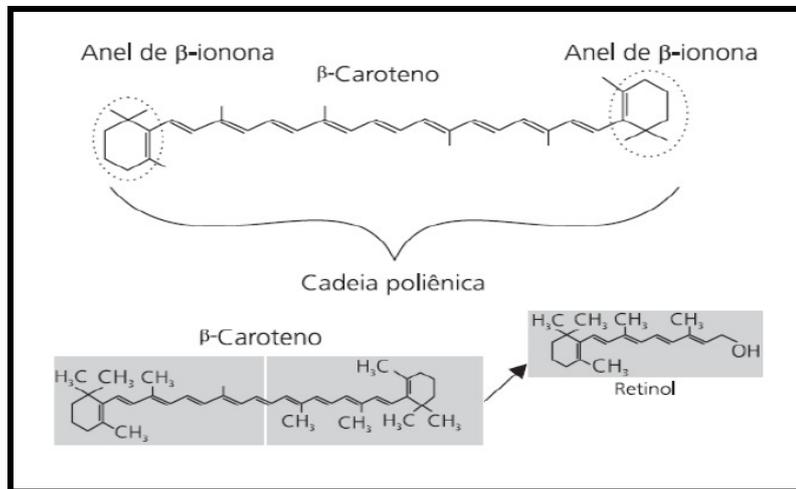


Figura 9- Estrutura química e clivagem do β Caroteno (In: AMBRISIO et. al, 2006 apud OLIVEIRA, 2010, p.6)

A obtenção do betacaroteno se dá por diversas espécies de fungos, leveduras e algas. Entretanto, certas espécies são capazes de sintetizar em quantidade suficiente para sua produção em escala industrial (OLIVEIRA, 2010).

O estudo da produção de betacaroteno é recentemente incentivado, pois a utilização de corantes artificiais vem sendo questionada devido aos possíveis problemas que podem ocasionar à saúde, levando a FAO (Food And Agriculture Organization), órgão da ONU, a tomar medidas restritivas ao seu uso, fato que contribui para o aumento da utilização de corantes naturais. No Brasil, o Ministério da Saúde fica responsável pela legislação de alimentos e cosméticos. As normas brasileiras para corantes e aditivos têm por base as americanas, especificadas pelo FDA (Food and Drug Administration) (OLIVEIRA, 2010).

4.1.3 Tocoferóis e Tocotrienóis

Os tocoferóis e tocotrienóis são conhecidos por inibir os processos de oxidação dos lipídios em alimentos e sistema biológico. Esses são encontrados em sementes de oleaginosas, folhas e outras partes verdes das plantas (VANCONCELLOS, 2005).

As denominações α , β , γ e δ dependerão dos radicais ligados na base dos tocoferóis e tocotrienóis (figura 10).

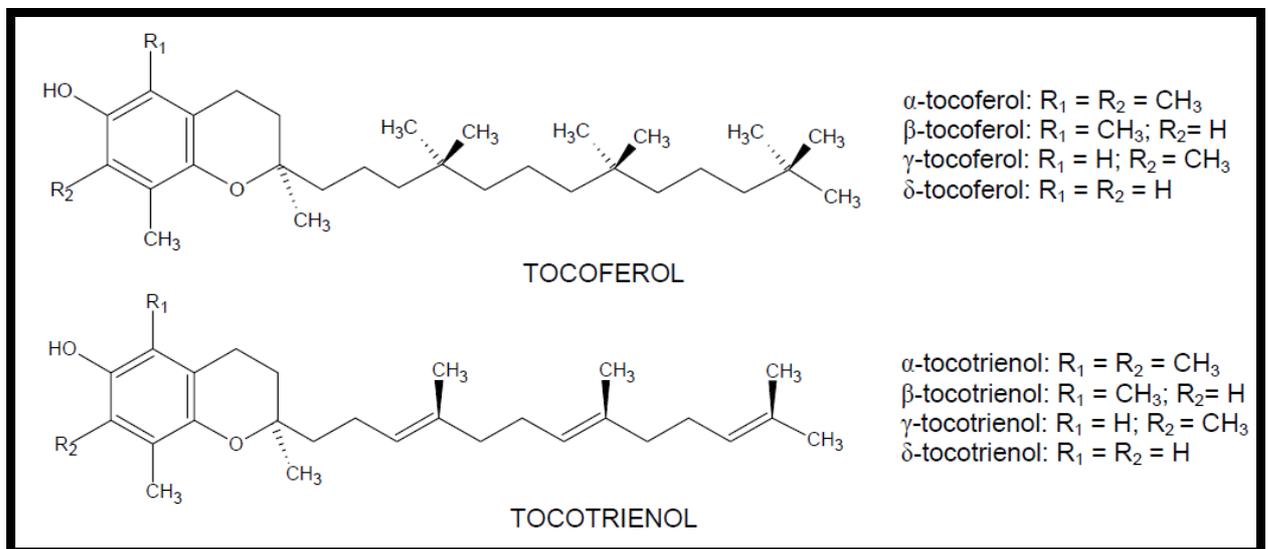


Figura 10- Estrutura química do tocoferol e tocotrienol (In: COSTA, 2007, p.31)

A função do tocotrienol é a inibição do crescimento de células cancerosas nas glândulas mamárias, enquanto o tocoferol não inibe este efeito. Estudos sugerem que as funções biológicas do tocoferol e tocotrienol não parecem estar relacionadas uma com a outra (VASCONCELLOS, 2005).

Esses compostos são importantes não somente para os sistemas biológicos e alimentos, mas também para impedir a auto-oxidação do óleo nas sementes vegetais. Estudos comprovam a atividade oxidante dos tocoferóis, já os estudos sobre o tocotrienóis são escassos, provavelmente pela dificuldade de encontrá-lo na natureza, estando presente em poucas espécies (COSTA, 2007). A ação antioxidante desses dois compostos é devido a sua capacidade de doar hidrogênios

fenólicos ao radical livre, assim, impedindo a ação dos radicais livres nos lipídios (VANCONCELLOS, 2005).

5. AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS CAROTENOS

Em nosso sistema biológico são formadas constantemente espécies reativas, para isso, o nosso organismo desenvolveu defesas antioxidantes de forma a proteger-se dos possíveis danos causados por essa espécie. Denomina-se antioxidante qualquer molécula que inibi ou minimiza um processo de oxidação. Do ponto de vista biológico, um antioxidante protege estruturas celulares e biomoléculas contra os efeitos deletérios de substâncias que promovem a oxidação (HALLIWELL et. al, 2007 apud ANGELI 2011)

5.1 RADICAIS LIVRES

Um radical livre é uma estrutura que apresenta um elétron desemparelhado, ou seja, por estar ocupando um orbital atômico sozinho o torna mais instável e conseqüentemente mais reativo. Por razões quânticas, esta molécula tende a emparelhar esse elétron com algum outro elétron de outra molécula. Em geral, os radicais livres são formados por absorção de radiação (ultravioleta ou visível), por processo de catálise enzimática ou reações redox (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

O oxigênio é a molécula iniciadora do processo de formação dos radicais livres por sua facilidade em reagir. O oxigênio reduz-se a água ao final da respiração anaeróbica, nessa fase originam-se espécies altamente reativas, como a hidroxila ($\dot{\text{O}}\text{H}$), radical superóxido (O_2^-), radical hidroperóxido (HO_2^\cdot). (GUERRA FILHO; FANAN, 1994 apud COSTA, 2007).

O processo de formação dessas espécies reativas de oxigênio (ERO) esta demonstrada pela (figura 11).

Ao absorver energia o oxigênio molecular em seu estado fundamental, pode se converter ao estado singlete excitado ($^1\text{O}_2$). O oxigênio tanto em sua forma

fundamental como singlete, ao absorver um elétron, pode se converter em superóxido (O_2^-). Numa segunda etapa de redução, a partir do superóxido a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela absorção de mais um elétron e de $2 H^+$. Ao receber um terceiro elétron e mais $1 H^+$, reduz-se ao radical hidroxila ($\cdot OH$), após receber o quarto elétron e $1 H^+$, forma finalmente a molécula de água (H_2O) (VOEGELI et al., 1992, apud COSTA, 2007).

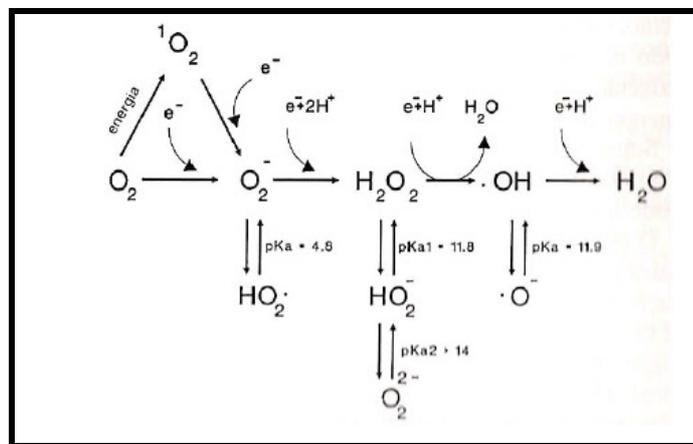


Figura 11- Formação da espécie reativa de oxigênio (In: VOEGELI et. al, 1992, apud COSTA, 2007, p. 24).

6. CORANTE

As cores têm papel notadamente dominante em nossa vida, porém na maioria das vezes acaba passando despercebido. A maior parte da raça humana tem a habilidade de perceber as cores, e desde as primeiras civilizações o homem tenta reproduzir as cores da natureza, seja por questões estéticas ou puramente funcionais. Para isto, é feito uso de pigmentos e corantes (DIAS; GUIMARÃES; MERÇON, 2002).

A cor é o primeiro critério utilizado na aceitação ou rejeição, por isso, na indústria de alimentos a cor é um atributo importante. A adição de corantes nos alimentos é, muitas vezes, uma exigência do consumidor. Se a cor for atraente, dificilmente o alimento não será ingerido ou, pelo menos, provado (HARDER; BRAZACA; ARTHURI, 2007).

Os pigmentos são compostos químicos que absorvem luz na faixa de comprimento do visível. A cor produzida é devida uma estrutura específica de uma molécula. Essa estrutura captura energia e sua excitação, a energia não absorvida é refratada para ser capturada pelo olho, onde impulsos são encaminhados para o cérebro onde esse interpreta como uma cor. São substâncias insolúveis e oferecem cobertura, opacidade, tingimento e cor, por exemplo, são utilizados em tintas para residências e produtos de maquiagens cosméticas. Em aplicações industriais, bem como nas artes, sua permanência e estabilidade são propriedades desejáveis (ALVES, 2005).

Corantes é qualquer produto químico, natural ou sintético que confere cor, podendo geralmente serem aplicados em solução ou ainda puros. Fixam-se de alguma maneira a um substrato, podendo ser um tecido, papel, cabelo, couro e muitos outros materiais. Estes atuam absorvendo a luz em um determinado comprimento de onda chamado de luz visível 380-770 nm. O ideal é que os corantes apresentem fixação uniforme com as fibras em todo o substrato e que sejam estáveis à luz e aos processos de lavagem (DIAS; GUIMARÃES; MARÇON, 2002).

A utilização de corantes e pigmentos naturais vem despertando interesse em pesquisas teóricas e empíricas das relações entre cor, estrutura molecular e propriedades de aplicação e conservação (ESCOLA INTERATIVA, 2012)

Até a metade do século XIX, os corantes em quase totalidade eram isolados de fontes naturais, de origem principalmente animal ou vegetal. As necessidades de busca a substâncias mais próximas do ideal para as aplicações pretendidas, assim como o desenvolvimento das pesquisas encorajaram a busca por corantes sintéticos com propriedades superiores (ESCOLA INTERATIVA, 2012).

Na legislação brasileira são permitidas três categorias de corantes para o uso em alimentos, os corantes naturais, o corante caramelo e os artificiais. Segundo o artigo 10 do Decreto nº 55 871, de 26 de março de 1967, que considera corante natural ou pigmento extraído de substância vegetal ou animal. Corante caramelo é o produto obtido a partir da reação de Maillard de açúcares. Já o corante artificial é a substância obtida por processo de síntese. Segundo a legislação vigente, em produtos que contêm corantes deve vir descritos em seu rótulo a Classe do aditivo (corante) e o nome por extenso, além disso, os corantes artificiais devem apresentar no rótulo a indicação "colorido artificialmente" (TENORIO, 2010).

Os corantes naturais são obtidos a partir da extração de vegetais, e muito empregado pelas indústrias alimentícias. São exemplos (figura 12) o urucum, carmim de cochonilha, curcumina, antocianinas e betalaínas (ADITIVOS&INGREDIENTES, 2009).

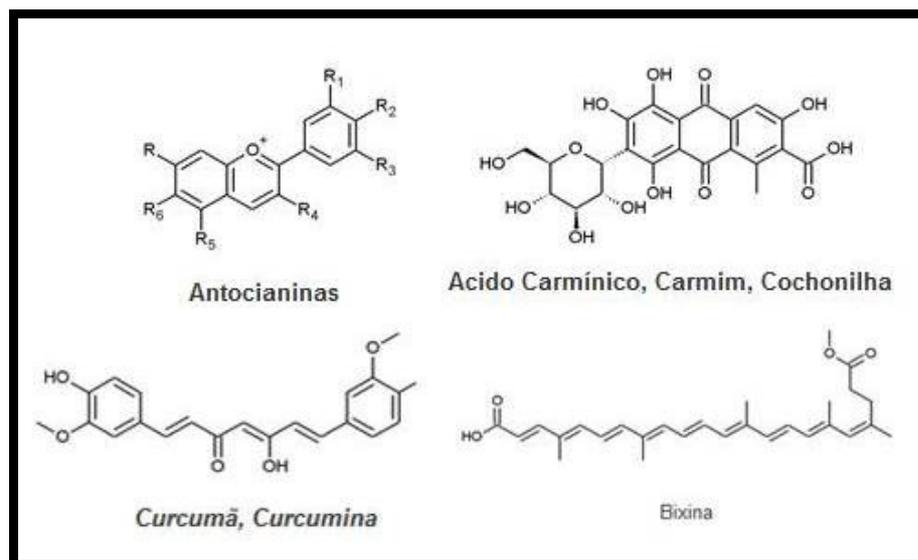


Figura 12- Estrutura química dos corantes naturais (antocianina, carmim de cochonilha, curcumina e bixina) (In: TENORIO, 2010, aprimorado)

Os corantes sintéticos são semelhantes aos naturais quanto à estrutura química, porém são obtidos sinteticamente em laboratório. São exemplos a tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina e eritrosina (figura 13) (ADITIVOS&INGREDIENTES, 2009).

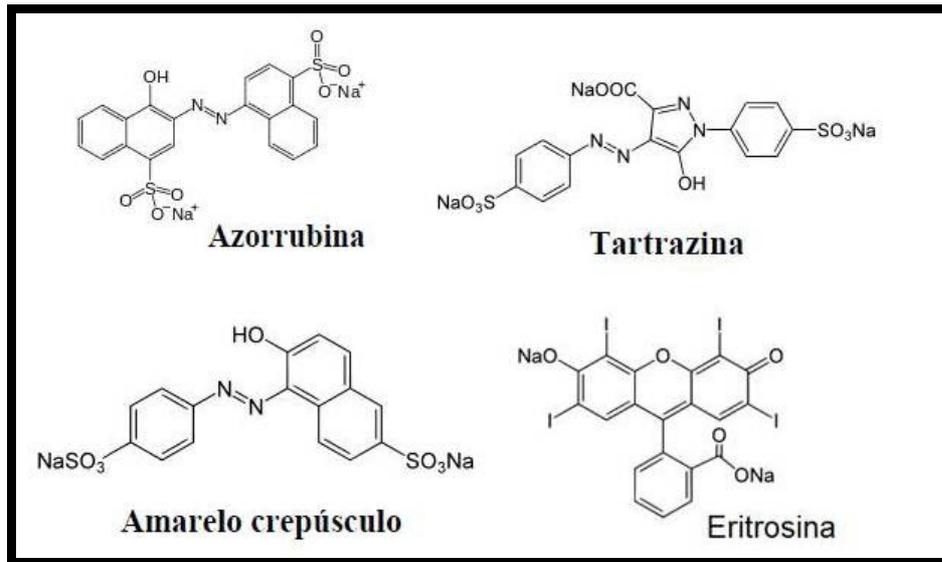


Figura 13- Estrutura química dos corantes sintéticos (azorrubina, tartrazina, amarelo crepúsculo e eritrosina) (In: PRADO; GODOY, 2003, aprimorado)

7. CORANTES NATURAIS, EXTRAÇÃO E APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO.

Um dos grandes desafios atuais do ensino da ciência nas escolas é construir uma ponte entre o conhecimento ensinado e o cotidiano dos alunos. Muitos alunos têm em vista a química como uma disciplina difícil e complexa, criando distanciamento e apatia pela matéria (VALADARES, 2001).

Tradicionalmente o conteúdo ministrado no ensino da química é respaldado por definições, regras, fórmulas, nomenclaturas, classificações, obrigando o aluno à decorar conteúdos sem relação prática com seu cotidiano. Pensando desta maneira, o aluno perde o interesse nas aulas e torna ainda mais problemática a intensa necessidade de assimilação dos conteúdos ensinados pelo professor, o que dificulta ou até impossibilita que os alunos e a sociedade, por consequência, compreendam que muitos eventos e objetos cotidianos são oriundos de fenômenos que envolvem reações químicas (SOUZA, 2007).

Tanto o professor quanto o aluno conhecem as dificuldades de conciliar os conceitos químicos expostos em sala de aula com a vivência do cotidiano do aluno. Nem sempre é possível fazer essa ligação, principalmente na realidade da educação brasileira, onde a maioria das escolas em, especial as públicas, não possuem materiais didáticos adequados e nem laboratórios para que o professor consiga desenvolver os conceitos de forma simples e a partir de observações de fatos experimentais (DIAS; GUIMARÃES; MERÇON, 2002).

A implantação de aulas práticas seria ideal para despertar o interesse na participação dos alunos, associando os conceitos a partir da observação, tornando o aprendizado mais significativo, permitindo que eles compreendam as transformações químicas que ocorrem no mundo físico de forma mais abrangente, construindo um conhecimento científico, aplicações tecnológicas e implicações ambientais, sociais, políticas e econômicas (DIAS; GUIMARÃES; MERÇON, 2002).

O uso de corantes como objeto de estudo justificou-se pelo fato da cor ser uma propriedade marcante. Todos possuímos cores preferidas que refletem em variados

objetos que adquirimos. Dessa forma, a cor é um tema que motiva os alunos a aprender química. (DIAS; GUIMARÃES; MERÇON, 2002).

O experimento realizado neste trabalho, ou seja, extração da pigmentação a partir do urucum proporciona a abordagem dos seguintes conteúdos da Química: característica polar e apolar de substâncias, solubilidade, funções orgânicas, métodos de separação de misturas, equilíbrio ácido-base, corantes e pigmentos e indicadores de pH. (JUNIOR; BISPO, 2010).

Para iniciar o estudo desse tema, pode-se definir corante e pigmento. Corante é “qualquer produto químico, natural ou sintético que confere cor.” (DIAS; GUIMARÃES; MERÇON, 2002). Já os pigmentos são somente “substâncias naturais que conferem cor” (FAZENDA, 1995 apud OLIVEIRA; KONISHI; ALMEIDA, 2011).

Ao abordar a estrutura química da bixina obtida na extração, podem ser exploradas as funções orgânicas encontradas na substância, ácido carboxílico e éster, fazendo uma revisão sobre este tema (figura 14).

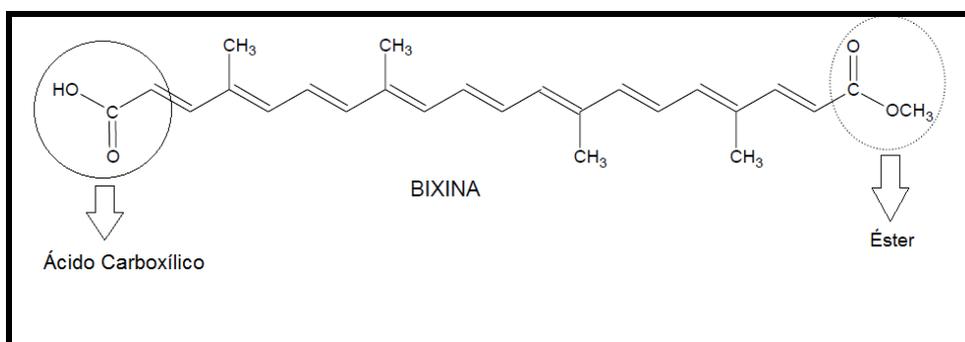


Figura 14- Estrutura química da bixina (In: OLIVEIRA, 2010, p.18)

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. MATERIAIS E REAGENTES

- Semente de urucum
- Erlemeyer 250 mL
- Agitador magnetico
- Balão de 100 mL
- Bécker 600 mL
- Bécker 250 mL
- Bécker 100 mL
- Proveta 100 mL
- Espectro (Femto cirrus 80)
- Balança digital (Marte AY220)
- Pipeta graduada
- Pipeta volumétrica
- Bastão de vidro
- Bastão magnético
- pHmetro (MPA-210)
- Funil de vidro
- Papel filtro
- Espátula de ferro
- Termômetro
- Papel sílica 0,20 mm (Macherey- nagel, alugram sil g/ uv)

- Coluna
- Suporte
- Tubo de ensaio
- Sílica
- Capilar
- Água destilada
- Etanol
- Hidróxido de potássio (Quimex QX 505.1000)
- Clorofórmio (Dinâmica química contemporânea Ltda)
- Ácido cítrico (Synth)
- Álcool metílico (Dinâmica química contemporânea Ltda)

8.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

8.2.1. Extração do pigmento

Preparou-se uma solução extratora com concentrações 5%. Para isto pesou-se 5g de hidróxido de potássio e avolumou-se em um balão de 100 mL, sendo 90 mL de água deionizada e 10 mL com etanol.

Preparou-se uma solução de ácido cítrico 20% para ser utilizado posteriormente para correção de pH. Pesou-se 20,09g de ácido cítrico e avolumou-se em um balão de 100 mL com água deionizada

Retirou-se as sementes de urucum de suas cápsulas e pesou-se 10g de semente para cada concentração de solução, adicionou-se 60 mL do solvente extrator. Após a adição do solvente, a amostra foi submetida à agitação em banho maria por duas horas, em chapa de aquecimento em temperatura de 50°C. A temperatura foi

monitorada com um termômetro (figura 15). Após a extração a amostra foi filtrada em papel filtro (figura16). (NACHTIGALL; SILVA et. al,2008)



Figura 15 – Extração do pigmento com agitador e aquecimento.



Figura 16 – Filtração da amostra

Após a filtração o pH foi corrigido pH 8 com solução de ácido cítrico (figura 17). Após a correção do pH foi realizada a cromatografia de camada delgada (TLC).



Figura 17 – Realizando a correção do pH

8.2.2. Cromatografia de TLC

Em uma placa de sílica (papel sílica) foram aplicados com auxílio de um capilar algumas gotas da amostra do pigmento extraído do urucum. A placa foi eluída com uma mistura de clorofórmio e álcool metílico na proporção (95:5), colocou-se essa fase móvel em um pote com tampa. Em seguida, deixou-se secar e a placa foi adicionada na fase móvel como apresentado na figura 18 (LOTFI; HASSAN; HABIB, 2008) .



Figura 18 – Cromatografia TLC

8.2.3. Cromatografia de coluna

A coluna de sílica gel foi empacotada empregando como eluente o clorofórmio; álcool metílico (19:1) (figura 19). Colocou-se 4 mL da amostra de urucum extraída na coluna. E procedeu-se a eluição. Obteve-se 32 frações para análise em tubo de ensaio devidamente numerado.



Figura 19 – Cromatografia de coluna

8.2.4. Espectro

As frações de número 1 até 32 foram identificadas por espectrofotometria. Utilizou-se clorofórmio com solvente e procedeu-se a leitura entre 300 a 700nm.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do corante do urucum foi feita seguindo a metodologia NACHTIGALL; SILVA (2008) obtendo-se 100 mL do extrato.

Para a identificação da bixina nesse extrato foi realizado uma cromatografia de camada delgada (figura 20).

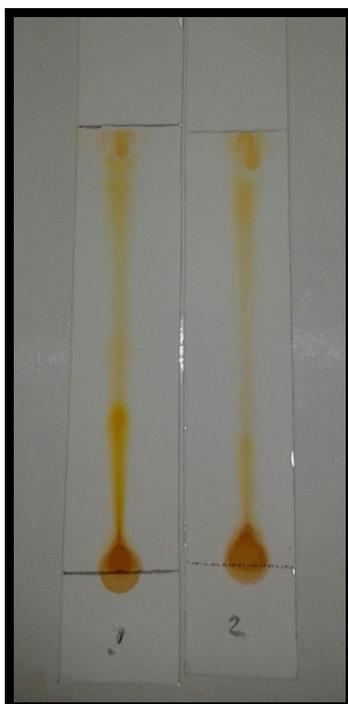


Figura 20 – Resultado cromatografia de TLC

Essa cromatografia indicou a presença de 4 substâncias diferentes, sendo observada a presença da bixina através da comparação de seu fator de referência (Rf) encontrado na literatura LOTFI et, al.(2008). Os cálculos do fator de referencia de cada substância observadas na TLC de acordo com a equação 1 estão apresentados abaixo.

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pela mancha desde a origem } (d_s)}{\text{Distância percorrida pelo solvente desde a origem } (d_m)} \quad (1)$$

- Rf (1) : $\frac{6,4}{6,6} = 0,97$
- Rf (2) : $\frac{5,6}{6,6} = 0,85$
- Rf (3) : $\frac{3,2}{6,6} = 0,48$
- Rf (4) : $\frac{2,2}{7,8} = 0,33$

Observou-se que após os cálculos dos Rfs a segunda mancha era a mais próxima do padrão, pois esta exibiu valor de Rf 0,85, valor próximo ao obtido por LOTFI et, al.(2008), que obteve um valor de Rf é igual a 0,8.

Com a técnica de cromatografia em coluna (figura 21), pode-se isolar as frações que continham a bixina, a qual foi identificada por análise espectrofotométrica, verificando-se um $\lambda_{\text{máx}} \sim 470 \text{ nm}$.

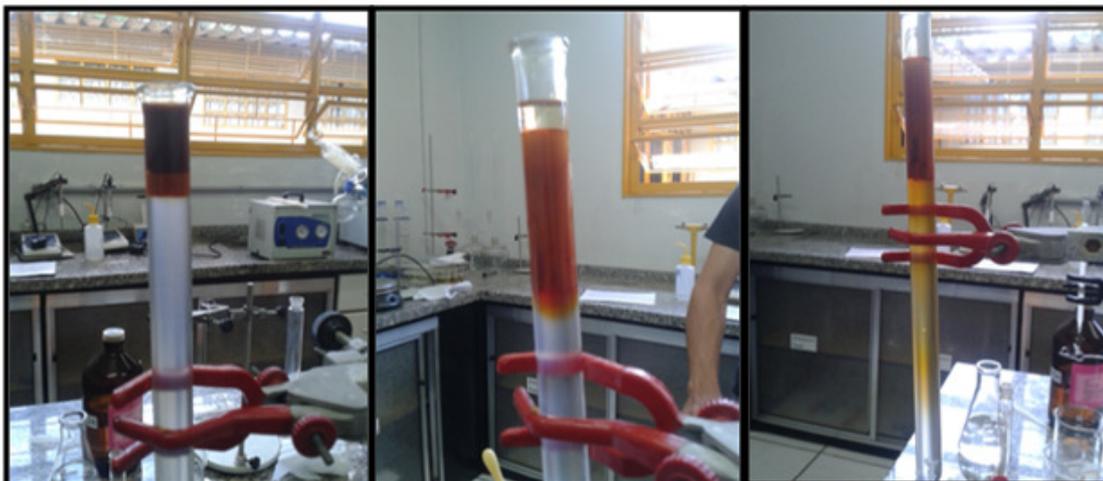


Figura 21 – Etapas da cromatografia de coluna

Obteve-se 32 frações. Os espectros das frações 4 a 31 apresentaram grande similaridade com o padrão do espectro da bixina obtido por Alves (2005) (figura 22).

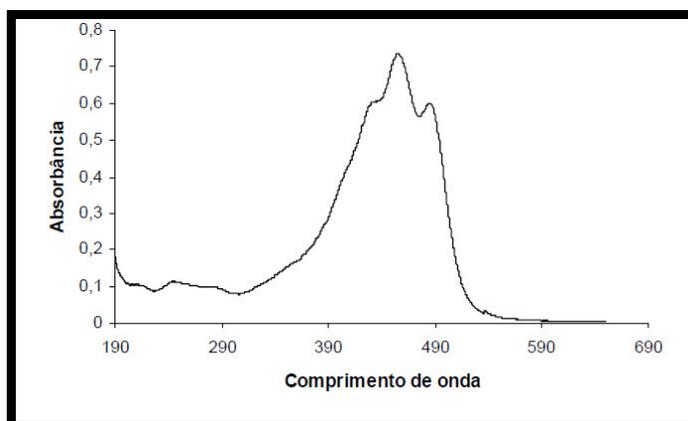


Figura 22 – Espectro Padrão da bixina (ALVES,2005)

Na fração 4 observou-se $\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm , característico da bixina, porém com baixa concentração (figura 23).

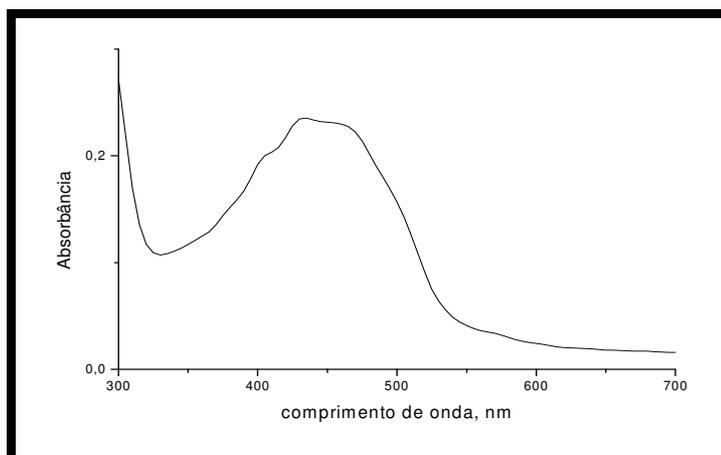


FIGURA 23 – Espectro da fração 4

A amostra que apresentou o melhor espectro com um pico próximo ao padrão da literatura descrito por ALVES(2005) (figura 24) foi a fração obtida no tubo 22. Na figura 24 pode-se verificar um pico máximo de absorção $\lambda_{\text{máx}} \sim 470$ nm.

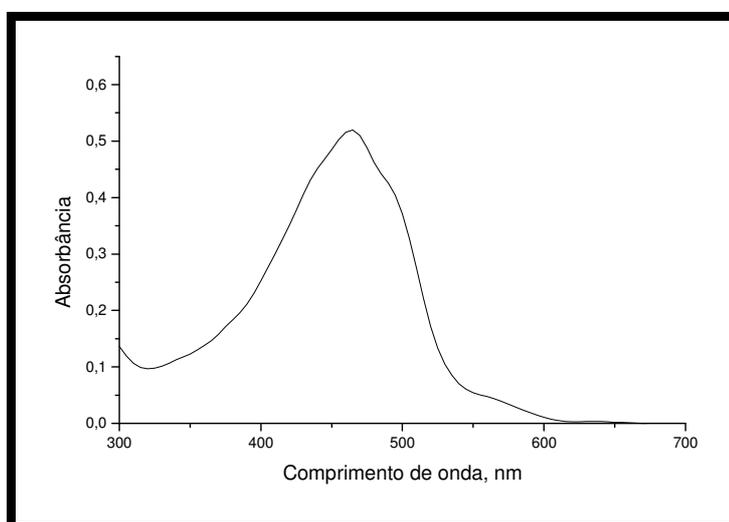


FIGURA 24 – Espectro da fração 22

Para uma análise quantitativa, as frações de número 4 até 31, poderiam ser agrupadas e o solvente evaporado obtendo-se a bixina mais pura possível. Em

seguida esta amostra poderia ser submetida a uma nova cromatografia de camada delgada para verificar sua pureza.

10. CONCLUSÃO

Conclui-se que pela metodologia empregada pode-se obter a bixina das sementes de urucum. Através de purificação do extrato em cromatografia em coluna foi possível isolar e em seguida identificar por espectrofotometria a bixina existente no extrato.

Os pigmentos do urucum tem se destacado por possuírem muitas aplicações em diversos segmentos, pois estes além de serem naturais não alteram as características dos produtos em que são empregados, não são tóxicos, são grandes precursores da vitamina A e E.

REFERÊNCIAS

ADITIVOS & INGREDIENTES. **OS CORANTES ALIMENTÍCIOS**. Editora Insumos: n.62, p.28-39, maio/junho 2009. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/119.pdf> Acesso em: 29 ago de 2012.

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**, 1. ed. Rosário: Corpus, 2004.

ALVES, Ricardo Wissimann. **Extração de corantes de urucum por processos adsorptivos utilizando argilas comerciais e *colloidal gás aphrons***. 2005. 146p. Pós graduação– Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Florianópolis, 2005.

ANGELLI, João Pedro Friedmann. **Hidroperóxido de lipídios como fonte de oxigênio molecular singlete, detecção e danos biomoléculas**. 2011. 234p. Pós graduação- Universidade de São Paulo, SP, São Paulo, 2011.

BARBOSA, José Maria *Bixaorellana L.*: Retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. In: Palestra apresentada no “**SIMBRAU – Simpósio Brasileiro do Urucum**”, 2006. João Pessoa-Pb, Brasil.04, 2006, p1-14.

Correa, M.P; Penna, L.A. Dicionário **das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, 138p.

COSTA, Camila Klocker. **Estudo fitoquímico de *BixaorellanaL.*, Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética**. 2007. 155p. Mestrado– Universidade Federal do Paraná, PR, Curitiba, 2007.

COSTA, Luis; Chaves, Mariana. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa Orellana L.* : Uma alternativa para disciplinas de química orgânica. **Química Nova na Escola**, n. 28, setembro, 2004, p. 149-152.

COUTINHO, Marcela; MUZITANO, Michelle; COSTA, Sonia; Agentes terapêuticos para o processo inflamatório. v.1, n.3, 2009, p. 241-256.

DAVID, Jorge M; BARREIROS, Andre; DAVID, Jucenil. Extresse oxidativo relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova na Escola**, n. 29, agosto, 2006, p. 113-123.

DIAS, M. V.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERÇON, F. Corantes Naturais: Extração e Emprego como indicadores de PH. **Química Nova na Escola**, n.17, maio, 2003, p.27-31.

ESCOLA INTERATIVA. **Química dos corantes**. Disponível em:<http://www.escolainterativa.com.br/canais/18_vestibular/estude/quimi/tem/qui_tem045.asp>. Acesso em: 08 out de 2012.

FARIA José Odel de. **A Cultura do Urucum**. Disponível em:<<http://www.emater.mg.gov.br/doc%5Csite%5Cserevicoseprodutos%5Clivraria%5CCulturas%5CCultura%20do%20Urucum.pdf>>. Acesso em: 09 out de 2012.

FERREIRA, V. L. P.; NETO, R. O. T.; MOURA, C. S. R.; SILVA, M. S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.19, n.1, jan/abr, 1999, p. 37-42.

FIGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L. FLORA E VEGETAÇÃO DO BRASIL NA CARTA DE CAMINHA. **Acta bot. bras.** v.16, n.3, 2002, p. 263-272.

FONNEGRA, R.J; RAMIREZ, S.L.J. **PLANTAS MEDICINALES EM COLOMBIA**. 2. Ed. Colombia: Editora Universidad de Antioquia, 2007

FONTANA, Jose; MENDES, Sabrina; PERSIKE, Daniele; PERACETTA, Luis. Carotenóides. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, 1997, p.40-45.

FRANCO, Camilo Flamarion de Oliveira. **Corantes naturais de urucum (*Bixa orellana* L.) no tratamento da hipilerpidemia e câncer em animais**. 2008, 193p. Pós graduação- Universidade Federal de Viçosa, MG, Minas Gerais, 2008.

HARDER, Marcia Nalesco; BRAZACA, Solange; ARTHUR, Valter. Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentada com urucum. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**, 2007, p. 339-342.

JUNIOR, G. W.; BISPO, L. M. Corantes Naturais Extraídos de Plantas para Utilização como Indicadores de pH. **Instituto rã-bugio**, 2010, 10p.

JUNIOR, Anildo. **Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosae***. 2002, 125. Pós graduação- Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Florianópolis, 2002.

JUNIOR, Cezário. **Química dos cosméticos**. Disponível em <<http://professorcezariojr.blogspot.com.br/2011/09/quimica-dos-cosmeticos-quimica-dos.html>>. Acesso em: 21 ago de 2013.

LOFTI; Wegdan; HASSAN, Rasmira; HABIB, Amira. Determination of natural colors by thin layer chromatography. **Compounds Journal of the A.O.A.C**, v.4, n.12, 2008, p. 2013-2017.

MANFIOLLI, Marcelo Hussar. 2004. **ANÁLISE TÉCNICA E ECONÔMICA DA ATIVIDADE AGROPECUÁRIA DO URUCUZEIRO (*Bixaorellana*L.) NO MUNICÍPIO DE PARANACITY**. Disponível em: <http://www.emater.pr.gov.br/arquivos/File/Comunicacao/Premio_Extensao_RurRu/2_Premio_2006/06_An_Tec_Econ_Urucun.pdf>. Acesso em: 05 agosto. 2012.

OLIVEIRA, Danilo Hildebrando; KONISHI, Ivan; ALMEIDA, Rômulo; **Desenvolvimento de pigmentos óxidos através da sintetização de suas sucatas de ferro e aço carbono**. 2011.44p. Monografia- Centro técnico estadual Lauro Gomes, São Bernardo, 2011.

OLIVEIRA, Caroliny Gomes; **Extração e caracterização do betacaroteno produzido por *Rhodotorula glutinis* TENDO COMO SUBTRATO O SUCO DE CAJU**. 2010.44p. Monografia- Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2010.

PRADO, Marcelo Alexandre; GODOY, Helena Teixeira. Corante artificial em alimentos. v.14, n.2, p.237-250.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**, 2. ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2001.

RODRIGUEZ, Amaya. **Evaluation of assay procedures for the bixinoid pigments in annatto seeds and their derivatives.** Interim Report. Natural resources institute, Kent, UK. 1998. 31p

RUSSOMANO, Olga Maria; KRUPA P.C; FABRI E.G; Doenças fúngicas do Urucum. v.74, n.1, 2012, p. 45-49.

SALVADOR, Mirian; HENRIQUES, João. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**, 1ªed., Canoas, Editora Ulbra, 2004.

SILVA, Pollyanna Ibrahim. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.).** 2007. 138p. Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, MG, Viçosa, 2007.

SOUZA, Kelley Cristina Fernandes de. **O plástico como uma unidade temática de ensino: estrutura, propriedades e aplicações.** 2007. 74p. Monografia – Faculdade de Educação – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SCHWARTZ, Steven; ELBE, Joachim; GIUSTI, M. **Química de alimentos de Fennema.** 4. ed. Porto Alegre: Editora ARTMED, 2010.

TENORIO, Ernesto. **Corante.** 2010. 8p. Trabalho de graduação – Universidade federal do Mato Grosso, Mato Grosso, 2010.

VALADARES, Eduardo de Campos. Propostas de experimentos de baixo custo centradas no aluno e na comunidade. **Química Nova na Escola**, n. 13, maio, 2001, p. 38-40.

VASCONCELLOS, J. A. **Alimentos funcionales:** conceptos y beneficios para la salud. The World of Food Science. Disponível em: <http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm> Acesso em: 23 ago de 2013.

ZERAIK, Maria Luiza; YARIMAKE, Janete Harumi. Extração do beta-caroteno da cenoura: Uma proposta para disciplinas experimentais de química. **Química Nova na Escola**, n. 5, v. 31, abril, 2008, p. 1259-1262.