

## Identificação de $\delta$ tocotrienol e de ácidos graxos no óleo fixo de urucum (*Bixa orellana* Linné)

COSTA, C.K.<sup>1\*</sup>; SILVA, C.B.<sup>2</sup>; LORDELLO, A.L.L.<sup>3</sup>; ZANIN, S.M.W.<sup>1</sup>; DIAS, J.F.G.<sup>1</sup>; MIGUEL, M.D.<sup>1</sup>; MIGUEL, O.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, CEP 80210-170, Curitiba, Brasil, \*camilacosta@ufpr.br, <sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-991, Curitiba, Brasil.

**RESUMO:** *Bixa orellana* é uma planta nativa do Brasil, conhecida popularmente como urucum. O objetivo desse estudo foi extrair o óleo das sementes de *B. orellana* e, a partir dele, isolar e identificar o tocotrienol e quantificar seus ácidos graxos. A extração do óleo realizou-se em aparelho Soxhlet utilizando hexano como solvente extrator. O tocotrienol foi isolado por meio de métodos cromatográficos e identificado por espectrometria de ressonância magnética nuclear RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C. Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. Os resultados demonstraram a presença de  $\delta$ -tocotrienol e, dentre os ácidos graxos, a ocorrência do ácido aracdônico, que até o presente momento não havia sido relatada na espécie em estudo.

**Palavras-chave:** *Bixa orellana*, antioxidante, tocotrienol, ácido aracdônico.

**ABSTRACT:** Identification of  $\delta$  tocotrienols and fatty acids in fixed oil of annatto (*Bixa orellana* Linné). *Bixa orellana* is a native plant of Brazil, popularly known as annatto. The purpose of this study was to isolate the oil from the seeds of *B. orellana* and from it, identify the antioxidant tocotrienol and quantify its fatty acids. The extraction of the oil was performed in a Soxhlet apparatus using hexane as solvent. The tocotrienol was isolated by chromatographic methods and identified by spectrometric methods NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C. The fatty acids present in the oil were quantified by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Results demonstrated the presence of  $\delta$ -tocotrienol and among the fatty acids, the arachidonic acid was present, a substance which so far had not been previously reported.

**Keywords:** *Bixa orellana*, antioxidant, tocotrienol, arachidonic acid.

### INTRODUÇÃO

*Bixa orellana* L., conhecida popularmente como urucum, é nativa do Brasil, desenvolvendo-se também em outras regiões da América do Sul e Central (Alonso, 2004) e cultivada em países tropicais como Peru, México, Equador, Indonésia, Índia, Quênia e leste da África (Elias *et al.*, 2002).

Os índios das regiões do México, Peru e Porto Rico, onde essa espécie é conhecida como achiote, untavam-se com seu óleo e sementes para participar de ritos cerimoniais e usavam essa mistura como camuflagem, que os protegia de picadas de insetos e da ação solar (Alonso, 2004).

Flavonóides, carotenóides, ácido gálico, ácido alfitólico, diterpenos geraniol e geranil, orelina, mono e sesquiterpenos (Revilla, 2001) e os ácidos linoléico e palmítico estão entre os

principais constituintes desta espécie (Matos *et al.*, 1992; Alonso, 2004). Dentre os carotenóides, destacam-se a bixina e a norbixina, compostos de maior importância comercial, uma vez que compõem a maioria do pigmento vermelho extraído das sementes de *B. orellana* (Alonso, 2004).

Os corantes obtidos dessa espécie são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, especialmente de sorvetes, confeitos, massas, queijos, margarinas, manteiga, salsicha e produtos cárneos (Garcia *et al.*, 2010; Lima, 2001). Há ainda relatos de outras propriedades dos extratos de *B. orellana*, como antimicrobianas, hipoglicemiantes, antioxidante e de proteção solar (Coelho *et al.*, 2003; Alonso, 2004; Lima, 2001). Dentre as substâncias antioxidantes presente na semente pode-se citar o

tocopherol e tocotrienol (Frega *et al.*, 1998).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi extrair o óleo das sementes de *B. orellana* e deste isolar e identificar o tocotrienol, assim como quantificar seus ácidos graxos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e obtenção do óleo

Os frutos foram coletados, nos meses de junho e julho, no Instituto Ambiental do Paraná, município de Morretes, Paraná. A identificação foi realizada pelo curador do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba, Osmar dos Santos Ribas. Uma exsicata da planta encontra-se depositada sob o número 305810.

As sementes foram manualmente removidas dos frutos, secas em estufa a 40°C e o teor de umidade determinado em estufa a 100°C (Farmacopéia, 1988). Após secagem, as sementes foram fragmentadas em moinho de martelo até atingirem o tamanho de 0,2 a 0,6mm e extraídas com hexano em aparelho Soxhlet por 6 horas (Farmacopéia, 2010; Carvalho *et al.*, 2009). O processo extrativo foi repetido três vezes, utilizando-se no total 1,2Kg de semente fragmentada e aproximadamente 4,5 litros de solvente. O extrato obtido foi colocado em rotoevaporador para eliminação do excesso de solvente. Em seguida transferiu-se o material para um recipiente que permaneceu em banho-maria até atingir peso constante. Obteve-se por esse procedimento o óleo fixo da espécie, que foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração.

### Isolamento e identificação do tocotrienol

Realizou-se uma cromatografia preparativa em Sílica Gel SG-60 Merck® de 20 x 7 cm. A fase móvel constituiu-se de hexano:acetato de etila:ácido fórmico (85:20:3). Uma solução alcoólica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) 0,2% foi utilizada para revelação somente em uma pequena faixa de uma das extremidades da placa, permitindo a visualização da região onde se encontrava a substância antioxidante (Mohamad *et al.*, 2004). Removeu-se a sílica dessa região e para separá-la do composto, o resíduo foi solubilizado em clorofórmio e filtrado em funil sinterizado G3. Após evaporação do solvente realizou-se uma cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmar o isolamento da substância.

Métodos espectrométricos de Ressonância Magnética Nuclear de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e DEPT, em conjunto com técnicas bidimensionais COSY <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H e HMQC, foram utilizados na determinação estrutural da substância isolada, juntamente com a comparação com dados disponíveis em literatura.

As análises foram executadas em equipamento Spectrometer NMR Varian, Gemini. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram realizados a 300 MHz e 75MHz, respectivamente, com clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>). O padrão de referência de escala para a RMN <sup>1</sup>H foi o TMS, enquanto que para a RMN <sup>13</sup>C, teve-se como base os deslocamentos químicos do CDCl<sub>3</sub>.

### Identificação e quantificação dos ácidos graxos

O óleo foi esterificado com anidrido acético e a análise determinada por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) da marca Varian, modelo Saturno 2000R, em coluna capilar OV-225, temperatura inicial de 50 °C com elevação do aquecimento de 40 °C por minuto até 220 °C, que foi mantido durante 30 minutos, e temperatura do injetor de 250 °C.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As sementes de *B. orellana* apresentaram 12,42% de umidade, valor considerado adequado pela Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia, 1988). Ao final das extrações obteve-se 57,6 g de óleo, o que resultou em um rendimento de 4,8%. Um estudo semelhante realizou este procedimento com a mesma espécie, nas mesmas condições experimentais, porém por um período de 2 horas, com um rendimento de 2,3% (Matos *et al.*, 1992). Considerando que o tempo de extração nesse trabalho foi superior, o resultado parece ser coerente com o encontrado por Matos e colaboradores (1992).

Dentre as inúmeras substâncias com poder antioxidante presente nas espécies vegetais estão o tocoferol e o tocotrienol, conhecidos pelo poder de inibição dos processos de oxidação de lipídios em alimentos e sistemas biológicos. A ação antioxidante dessas duas substâncias deve-se principalmente à capacidade em doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, e com isso impedir a oxidação dos lipídeos (Barreiros & David, 2006). Enquanto existem muitos estudos *in vitro* e *in vivo* comprovando a atividade antioxidante dos tocoferóis, as pesquisas com os tocotrienóis são escassas, provavelmente em razão da dificuldade de encontrá-los (Sookwong *et al.*, 2007; Frega *et al.*, 1998).

O radical DPPH, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico. Enquanto a reação se processa, ocorre alteração da cor violeta para amarela. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (Di Mambro *et al.*, 2005; Hirata, 2004). A presença de possíveis compostos com ação antioxidante no óleo de *B. orellana* foi

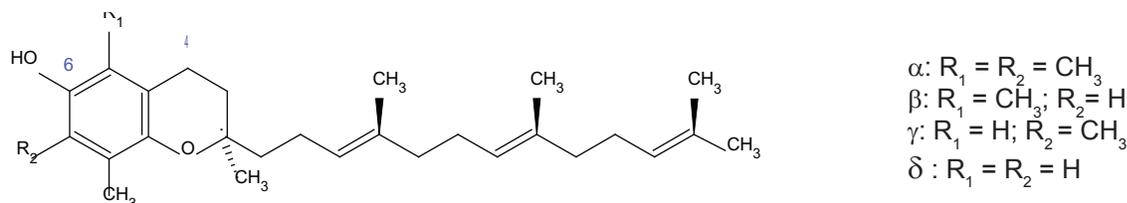
visualizada pelo perfil cromatográfico da CCD que revelou regiões de coloração amarela. Em razão do aparecimento de um composto em maior concentração que os demais no perfil cromatográfico (Rf 0,47), realizou-se o isolamento e a identificação deste buscando confirmar sua identidade como sendo tocotrienol.

Esta substância apresenta quatro isômeros

(Figura 1), o que pode determinar diferenças nas propriedades antioxidantes e nas suas ações farmacológicas.

Os deslocamentos químicos de RMN confrontados com dados de literatura (Carvalho, 1998; Silva, 1997; Strohschein *et al.*, 1999) permitiram estabelecer a substância como sendo o  $\delta$  tocotrienol, o que foi possível pela presença

**FIGURA 1.** Estrutura química dos tocotrienóis e seus isômeros



**TABELA 1.** Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e correlação HMQC e COSY para substância isolada com dados de literatura

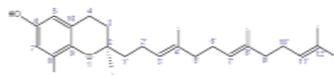
CARBONO*	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^1\text{H}^a$	$^1\text{H}^c$	$^1\text{H}^d$	COSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ )	HMQC ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ )
2	75,5	74,6					
3	32,1	32,4	1,70 – 1,84 m	1,6 – 1,8 m	1,75 m	$\text{H}_4$	31,5
4	26,9	25,7	2,69 t	2,63 t	2,69 t	$\text{H}_3$	22,7
5	112,7	114,9	6,37 d	6,31 d	6,37 d		112,7
6	146,2	144,4					
7	115,8	119,5	6,47 d	6,41 d	6,47 d		115,8
8	127,6	122,2					
9	147,9	145,5					
10	121,4	122,2					
1'	31,5	31,9	1,48 – 1,56 m				
2'	24,2	24,5	1,94-2,09 m	1,90 – 2,20 m		$\text{H}_3$	26,9
3'	124,6	124,0	5,05 – 5,15 m				124,5
4'	135,3	135,2					
5'	39,93	37,4	1,48 – 1,56 m				
6'	26,8	25,7	1,94 -2,09 m	1,90 – 2,20 m		$\text{H}_7$	39,93
7'	124,5	124,0	5,05 – 5,15 m	5,04 m			124,6
8'	135,2	135,2					
9'	39,9	37,5	1,48 – 1,56 m				
10'	26,8	25,7	1,94 -2,09 m	1,90–2,20 m		$\text{H}_{11'}$	39,9
11'	124,4	124,1	5,05 – 5,15 m				124,4
12'	131,5	131,0					
12' – Me	17,9	17,0	1,68 s	1,60 s			17,9; 5,9
12' – Me	25,9	26,0	1,59 s	1,52 s			
8' – Me	14,3	14,1	1,59 s	1,52 s			
4' – Me	16,0	14,0	1,59 s	1,52 s			
2 – Me	22,7	23,5	1,25 s	1,18 s	1,25 s		24,2; 1,5
8 – Me	16,1	11,8	2,12 s	2,06 s	2,12 s		22,7
n – Me			0,8 – 0,9 m		0,8–0,9m		14,3

<sup>a</sup> Os dados do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  realizados a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente,  $\text{CDCl}_3$ , TMS, ppm.

<sup>b</sup> CARVALHO, 1998.

<sup>c</sup> SILVA, 1997.

<sup>d</sup> STROHSCHNEIN *et al.*, 1999.



de um dubleto em 6,37 ppm e em 6,47 ppm, correspondendo aos hidrogênios nas substituições R1 e R2, respectivamente (Tabela 1).

A importância que se tem dado aos tocotrienóis deve-se às suas atividades biológicas. Há estudos que sugerem a inibição do crescimento de células cancerígenas em glândulas mamárias e redução do risco de doenças cardíacas por essas moléculas, que podem também prevenir outras patologias que se originam de estresse oxidativo (Nakagawa *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2008).

Com relação às propriedades farmacológicas atribuídas ao isômero delta, Michihara e colaboradores (2009) estudaram seu efeito na produção de melanina e comprovaram que esse composto diminui os níveis de tirosinase e, por consequência, a formação de melanina, indicando que pode ser utilizado para tratamento de hiperpigmentação cutânea. Esse isômero também demonstrou ser promissor agente quimioterápico por inibir a angiogênese tumoral, pois apresentou efeitos supressores da proliferação de carcinomas pancreáticos (Shibata *et al.*, 2008; Hussein & Mo, 2009). O  $\delta$ -tocotrienol é o isômero mais potente da vitamina E e representa o composto com maior destaque quando se refere às suas propriedades farmacológicas (Hussein & Mo, 2009).

Assim como os antioxidantes, os ácidos graxos representam compostos de importância farmacológica, pois participam de reações inflamatórias que podem estar relacionadas à resistência imunológica, distúrbios metabólicos e doenças neoplásicas. Com exceção dos saturados e monoinsaturados, os poliinsaturados, em especial o linoléico e  $\alpha$ -linolênico, pertencentes à família do ômega 6 e ômega 3, respectivamente, não são sintetizados endogenamente pelos humanos e são chamados de ácidos graxos essenciais. Eles produzem outros poliinsaturados no organismo e desempenham importantes funções nos processos metabólicos (Hirayama *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006; Tinoco *et al.*, 2007).

No óleo de *B. orellana*, o composto presente em maior concentração é o ácido linoléico (19,5%), seguido do ácido palmítico (15,5%), oléico (8,1%) e esteárico (7,1%). As concentrações obtidas foram comparadas com os resultados de Matos e colaboradores (1992) e, em especial para os ácidos oléico e esteárico, algumas diferenças foram notadas. Uma possível explicação é a existência de diversas variedades da espécie em estudo e a época em que os frutos foram colhidos, que pode interferir nas quantidades de seus componentes.

O ácido aracdônico identificado neste estudo é um ácido poliinsaturado que se destaca por ser precursor de prostaglandinas e tromboxanos, produzidos pelos tecidos em situações de inflamação,

infecção, lesão tecidual e agregação plaquetária (Hirayama *et al.*, 2006). Está relacionado com o desenvolvimento do cérebro e retina nos primeiros períodos de vida (Martin *et al.*, 2006) e é essencial pela sua função de sinalização e divisão celular (Tinoco *et al.*, 2007).

Assim, a presença de tocotrienol, em especial o isômero  $\delta$ , no óleo de *B. orellana* é relevante não somente pelos seus comprovados efeitos terapêuticos, mas por ser encontrado em um número restrito de espécies vegetais. A presença do ácido aracdônico não havia sido relatada em outros estudos e representa um composto de importante atividade farmacológica. Nesta perspectiva, este estudo apresenta a espécie *B. orellana* como fonte de duas substâncias com relevância científica em atividades biológicas.

## REFERÊNCIA

- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. 1.ed. Rosário: Corpus, 2004. 1144p.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- CARVALHO, M.G. *et al.* Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v.21, n.6, p.740-743, 1998.
- CARVALHO, J.L.S. *et al.* Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1031-1035, 2009.
- COELHO, A.M.S.P. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (urucum). **Revista Lecta [Bragança Paulista]**, v.21, n.1/2, p.47-54, 2003.
- DI MAMBRO, V.M.; MARQUELE, F.D.; FONSECA, M.J.V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetic & Toiletries**, v.17, n.4, p.74-78, 2005.
- ELIAS, M.E.A. *et al.* Mineral nutrition, growth and yields of annatto trees (*Bixa orellana*) in agroforestry on an Amazonian ferralsol. **Experimental Agriculture**, v.38, p.277-289, 2002.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- FREGA, N.; MOZZON, M.; BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, p.723-727, 1998.
- GARCIA, C.E.R. *et al.* Pigmentos do urucum. **Revista Nacional da Carne**, v.401, n.14-22, 2010.
- HIRATA, L.L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. 2004. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- HIRAYAMA, K.B.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. **The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Disease**, v.10, n.3, september 2006.
- HUSSEIN, D.; MO, H.  $\delta$ -[delta]-Tocotrienol-Mediated Suppression of the Proliferation of Human PANC-1, MIA PaCa-2, and BxPC-3 Pancreatic Carcinoma Cells. **Pancreas**, v.38, n.4, p.124-136, 2009.
- LIMA, L.R.P. *et al.* Bixin, Norbixin and Quercetin and lipid metabolism effects in rabbits. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.196-200, 2001.
- MARTIN, C.A. *et al.* Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.
- MATOS, F.J.A. *et al.* Ácidos graxos e algumas oleaginosas tropicais em ocorrência no nordeste do Brasil. **Química Nova**, v.15, n.3, p.181-185, 1992.
- MICHIHARA, A. *et al.* Delta-tocotrienol causes decrease of melanin content in mouse melanoma cells. **Journal of Health Science**, v.55, n.2, p.314-318, 2009.
- MOHAMAD, H. *et al.* DPPH free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.59, n.11-12, p.811-815, 2004.
- NAKAGAWA, K. *et al.* In vivo angiogenesis is suppressed by unsaturated vitamin E, tocotrienol. **Journal of Nutrition**, v.137, p.1938-1943, 2007.
- REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. 3.ed. Manaus: SEBRAE, 2001. 405p.
- SHIBATA, A. *et al.* Tumor anti-angiogenic effect and mechanism of action of  $\delta$ -tocotrienol. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.330-339, 2008.
- SILVA, D.H.S. **Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lacifolia***. 1997. 147p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SOOKWONG, P. *et al.* Quantitation of tocotrienol and tocopherol in various rice brans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.461-465, 2007.
- STROHSCHHEIN, S. *et al.* Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC – MS and HPLC – NMR coupling. **Analytical Chemistry**, v.71, n.9, p.1780-1785, 1999.
- TINOCO, S. M. B. *et al.* Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos trans do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.3, p.525-534, 2007.