Aplicação de tratamento enzimático para recuperação de compostos bioativos da cachopa do urucum e avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos obtidos

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, compostos bioativos, tratamento enzimático, *Bixa orellana* L.

Autores(as):
Giovanna Gagliardo de Campos, FEA – UNICAMP
Simone Alves Monteiro da Franca (coorientadora), FEA – UNICAMP
Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A produção do urucum (*Bixa orellana* L.) figura entre as cadeias produtivas de matrizes vegetais de grande relevância econômica, mas também na geração de resíduos agroindustriais, especialmente durante o beneficiamento dos frutos e o processamento industrial das sementes. Nesse contexto, o reaproveitamento dessas biomassas tem ganhado destaque, impulsionado pelo interesse em práticas mais sustentáveis e na valorização de coprodutos. O valor comercial do urucum é determinado com base no teor de pigmentos bixina e norbixina, extraídos de suas sementes, que possuem baixo custo de produção e baixa toxicidade (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015). Essas características conferem ao urucum uma posição de destaque entre os aditivos naturais, sendo considerado um corante alimentar seguro por entidades como a Food and Drug Administration (FDA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Diversos estudos têm investigado as propriedades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias e antimicrobianas dos compostos bioativos presentes nas sementes (DOS SANTOS RAMOS et al., 2021; RAJU et al., 2023). No entanto, ainda são escassos os estudos relacionados à composição e às propriedades bioativas de outras partes da planta. Dentre as técnicas convencionais e emergentes já aplicadas às sementes do urucum para a recuperação desses compostos bioativos, o tratamento enzimático se apresenta como uma alternativa por sua simplicidade, aspecto sustentável, eficiência e alta especificidade. A utilização de enzimas, como celulases e proteases, visa à hidrólise dos componentes da parede celular vegetal, promovendo maior liberação dos compostos bioativos, que podem estar complexados a carboidratos e proteínas (PURI; SHARMA; BARROW, 2012).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar as melhores condições de tratamento enzimático para a recuperação de compostos bioativos da cachopa de urucum, avaliando-se as propriedades antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos.

METODOLOGIA:

Os frutos do urucum provenientes de Lagoa de Dentro (PB) foram processados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UNICAMP, onde as cachopas foram separadas manualmente, moídas e submetidas a análise granulométrica.

Para o tratamento enzimático, foram utilizados os complexos FoodPro CBL (celulases) e FoodPro PXT (proteases), conforme delineamento composto central rotacional (Tabela 1), variando-se concentração da enzima (%, v/v) e a concentração de substrato (mg/mL), totalizando 11 ensaios para cada tratamento enzimático. As condições fixas dos ensaios foram estabelecidas em estudos anteriores são: pH 4,5 para FoodPro CBL; pH 8,5 para FoodPro PXT; a temperatura de incubação de 60°C e o tempo de reação de 30 minutos foram aplicados para ambos os tratamentos enzimáticos.

Os efeitos destas variáveis foram avaliados em função das respostas de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides) e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP (PEREIRA; ARRUDA; PASTORE, 2018; ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999; RE et al., 1999; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; BENZIE e STRAIN, 1999).

Tabela 1. Delineamento experimental com duas variáveis independentes (2^2) e níveis para determinação das condições ideais do tratamento enzimático da cachopa de urucum.

Tratamentos enzimáticos		Valores codificados		Valores reais	
Ensaios CBL	**Ensaios PXT**	**Enzima**	**Substrato**	**Enzima (%, v/v)**	**Substrato(mg/mL)**
CBL1	PXT1	-1,00000	-1,00000	0,50	5,00
CBL2	PXT2	-1,00000	1,00000	0,50	15,00
CBL3	PXT3	1,00000	-1,00000	1,00	5,00
CBL4	PXT4	1,00000	1,00000	1,00	15,00
CBL5	PXT5	-1,41421	0,00000	0,40	10,00
CBL6	PXT6	1,41421	0,00000	1,10	10,00
CBL7	PXT7	0,00000	-1,41421	0,75	2,93
CBL8	PXT8	0,00000	1,41421	0,75	17,07
CBL9	PXT9	0,00000	0,00000	0,75	10,00
CBL10	PXT10	0,00000	0,00000	0,75	10,00
CBL11	PXT11	0,00000	0,00000	0,00	10,00
Controle (C)		---	0,00000	---	10,00

A atividade antimicrobiana do extrato resultante do ensaio com melhores respostas foi analisada por métodos qualitativo (difusão em ágar) e quantitativo (CIM), utilizando cepas padrão de bactérias patogênicas (BEARGIE; BRACKEN; RILEY, 1965; - NCCLS, 2003). A análise do delineamento experimental e dos modelos estatísticos foi realizada utilizando o software Statistica® 13 da TIBCO Software Inc. (Palo Alto, Califórnia, EUA). Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software Minitab® 19 da Minitab Inc. (Palo Alto, Califórnia, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A farinha da cachopa apresentou granulometria variando entre 0,05 e 0,71 mm (peneiras de Mesh n 24 a 270). As Tabelas 2 e 3 apresentam as variáveis dependentes dos ensaios conduzidos com os complexos enzimáticos CBL e PXT aplicados à farinha da cachopa, respectivamente.

Tabela 2. Compostos bioativos totais e propriedades antioxidantes dos extratos de farinha de cachopa de urucum hidrolisada com a enzima CBL conforme o DCCR.

	ABTS (µmol TE/g)	**DPPH (µmol TE/g)**	**FRAP (µmol TE/g)**	**FEN (mg AGE/g)**	**FLAV (mg CE/g)**	**FLAV (mg QE/g)**
C	550,49 ± 15,80	250,08 ± 1,68	438,71 ± 2,00	74,32 ± 0,80	8,09 ± 0,48	14,32 ± 1,46
CBL1	572,72 ± 14,12c	344,52 ± 2,88b	715,04 ± 43,40a	117,93 ± 8,72a	10,10 ± 0,60def	21,01 ± 0,77a
CBL2	468,69 ± 11,60de	246,80 ± 2,92d	458,64 ± 12,62c	63,07 ± 1,32cde	8,76 ± 0,31fg	15,49 ± 0,74cd
CBL3	602,85 ± 19,39c	323,14 ± 9,54c	592,39 ± 31,51b	101,66 ± 4,83b	8,87 ± 0,38efg	18,02 ± 0,11bc
CBL4	479,87 ± 17,45de	191,33 ± 3,17e	459,98 ± 40,28c	69,58 ± 1,95cd	10,44 ± 0,87cde	14,80 ± 0,97d
CBL5	334,86 ± 4,13f	197,93 ± 4,36e	328,77 ± 17,63d	72,77 ± 4,95c	12,11 ± 0,98ab	19,84 ± 0,64ab
CBL6	502,77 ± 8,77d	254,92 ± 6,91d	491,04 ± 6,36c	56,96 ± 0,23e	7,47 ± 0,18g	14,51 ± 0,32d
CBL7	**702,41 ± 33,55a**	**376,51 ± 17,11a**	**710,38 ± 40,99a**	**123,62 ± 9,14a**	**12,93 ± 0,62a**	**22,16 ± 1,45a**
CBL8	451,50 ± 5,17e	188,88 ± 3,99e	441,50 ± 25,45c	59,13 ± 5,88de	8,08 ± 0,55g	17,84 ± 0,99bc
CBL9	679,88 ± 9,19ab	96,09 ± 4,53f	253,01 ± 5,45e	32,47 ± 0,31f	11,86 ± 0,68abc	22,57 ± 1,17a
CBL10	665,61 ± 19,44ab	100,68 ± 1,19f	247,79 ± 3,46e	30,76 ± 0,28f	11,78 ± 0,36abc	21,82 ± 1,75a
CBL11	653,32 ± 8,75 b	100,91 ± 4,70f	244,95 ± 5,26e	34,75 ± 0,89f	10,97 ± 0,64bcd	20,34 ± 1,72ab

Os resultados são apresentados como média (n = 3) ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Siglas: TE - equivalente Trolox; AGE - Ácido gálico equivalente; CE - Catequina equivalente; QE - Quercetina equivalente.

Dentre os ensaios avaliados, o CBL7 destacou-se por apresentar os maiores valores de atividade antioxidante nos métodos ABTS (702,41 µmol TE/g), DPPH (376,51 µmol TE/g) e FRAP (710,38 µmol TE/g), evidenciando elevada capacidade de eliminação de radicais livres e poder de redução de íon férrico. Esse resultado está diretamente associado aos altos teores de compostos fenólicos (123,62 mg AGE/g) e flavonoides totais (12,93 mg CE/g e 22,16 mg QE/g), que reforçam o potencial funcional deste extrato. Embora outros tratamentos, como

CBL1 e CBL3, também tenham apresentado desempenho expressivo, especialmente em FRAP e teor de fenólicos (FEN), a performance geral do tratamento CBL7 foi superior e mais equilibrado entre todos os parâmetros analisados. Por outro lado, tratamentos como CBL9 a CBL11, apesar de apresentarem elevados teores de flavonoides, mostraram baixa atividade antioxidante em DPPH e FRAP, sugerindo que a composição qualitativa dos flavonoides ou a presença de outros compostos bioativos pode influenciar a eficiência antioxidante. Assim, o tratamento CBL7 (0,75% (v/v) de enzima e 2,93 mg/mL de substrato) se configurou como o mais promissor para aplicações voltadas ao aproveitamento de compostos bioativos com ação antioxidante.

Para o tratamento enzimático com a enzima PXT (Tabela 3), as condições adotadas no ensaio PXT7 apresentou o desempenho mais expressivo, com maior capacidade antioxidante para ABTS (728,33 µmol TE/g), DPPH (159,24 µmol TE/g) e FRAP (469,85 µmol TE/g), além de ter resultado em extratos com elevados teores de fenólicos (89,44 mg AGE/g) e flavonoides (19,38 mg CE/g e 49,51 mg QE/g). Esses resultados indicam que o tratamento PXT7 promoveu uma liberação mais eficiente de compostos bioativos da matriz vegetal. Em contraste, os tratamentos PXT9, PXT10 e PXT11, embora tenham alcançado os maiores valores de ABTS (superiores a 840 µmol TE/g), apresentaram baixas respostas em DPPH e FRAP, além de teores fenólicos reduzidos, sugerindo que os compostos gerados nesses extratos possivelmente têm menor eficácia como sequestradores de radicais livres. De forma geral, o equilíbrio entre os parâmetros antioxidantes e os teores de compostos fenólicos (FEN) e flavonoides (FLAV) reforça o potencial dos extratos obtidos na condição do ensaio PXT7, que se mostrou mais promissor para aplicações funcionais em comparação aos demais.

Tabela 3. Determinação de compostos bioativos e propriedades antioxidantes dos extratos de farinha de cachopa de urucum hidrolisada com a enzima PXT conforme o DCCR.

	ABTS (µmol TE/g)	**DPPH (µmol TE/g)**	**FRAP (µmol TE/g)**	**FEN (mg AGE/g)**	**FLAV (mg CE/g)**	**FLAV (mg QE/g)**
C	**550,49 ± 15,80**	**250,08 ± 1,68**	**438,71 ± 2,00**	**74,32 ± 0,80**	**8,09 ± 0,48**	**14,32 ± 1,46**
PXT1	654,22 ± 23,06c	141,38 ± 2,60b	383,08 ± 15,38b	72,95 ± 7,52b	7,89 ± 0,57e	30,84 ± 0,58b
PXT2	294,74 ± 7,50e	72,91 ± 0,73g	283,63 ± 3,10de	49,57 ± 1,79cd	10,31 ± 0,99d	21,08 ± 0,88f
PXT3	644,65 ± 13,02c	125,42 ± 3,48c	385,19 ± 16,77b	58,93 ± 3,28c	4,59 ± 0,39f	29,55 ± 1,32bc
PXT4	301,13 ± 0,20e	72,70 ± 0,76g	284,72 ± 7,70d	44,69 ± 0,97de	11,13 ± 0,64cd	20,94 ± 1,48f
PXT5	444,36 ± 5,62d	96,30 ± 1,14e	317,46 ± 19,19d	55,10 ± 0,32c	14,87 ± 0,41b	27,93 ± 0,84bcd
PXT6	451,17 ± 1,56d	84,63 ± 1,28f	370,83 ± 4,22bc	41,80 ± 2,90de	7,56 ± 0,49e	24,06 ± 1,13def
PXT7	**728,33 ± 57,17b**	**159,24 ± 2,29a**	**469,85 ± 56,03a**	**89,44 ± 7,64a**	**19,38 ± 0,65a**	**49,51 ± 4,58a**
PXT8	266,16 ± 0,16e	64,14 ± 0,94h	330,13 ± 11,45cd	38,98 ± 0,78ef	10,95 ± 0,51cd	23,23 ± 0,66ef
PXT9	**858,91 ± 8,92a**	105,23 ± 2,09d	232,50 ± 1,59ef	32,23 ± 1,51f	9,72 ± 0,29d	25,61 ± 0,24cde
PXT10	**847,69 ± 9,87a**	101,13 ± 1,28de	217,34 ± 0,25f	29,73 ± 0,32f	10,78 ± 0,21d	28,59 ± 0,14bc
PXT11	**867,62 ± 7,18a**	103,08 ± 1,44d	227,50 ± 5,20f	30,38 ± 1,25f	12,43 ± 0,80c	25,94 ± 0,31cde

Os resultados são apresentados como média (n = 3) ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. Siglas: TE - equivalente Trolox; AGE - Ácido gálico equivalente; CE - Catequina equivalente; QE - Quercetina equivalente.

A partir do DCCR, foi possível identificar condições ótimas para extração de compostos bioativos nos ensaios CBL e PXT. Analisando as Tabelas 2 e 3, pode-se verificar que as condições do ensaio 7, assim como dos pontos centrais 9, 10 e 11 obtiveram os melhores resultados. Pode-se observar que a concentração de enzima entre as quatro formulações não variou, sendo 0,75% (v/v) (ensaios 7, 9, 10 e 11) a ideal e que a concentração de substrato variou de 2,93 (ensaio 7) a 5 mg/mL (ensaios 1 e 3). Os tratamentos CBL7 e PXT7 apresentaram os melhores desempenhos globais, com elevada atividade antioxidante e altos teores de fenólicos e flavonoides. Já os tratamentos nas condições do ponto central (CBL9–11 e PXT9–11), apesar dos altos valores de ABTS, mostraram respostas inferiores em DPPH, FRAP e FEN, indicando menor equilíbrio entre os parâmetros. Assim, os dados sugerem que as condições intermediárias são mais eficazes para maximizar a extração de compostos antioxidantes. A aplicação de ferramentas multivariadas, como a função de desejabilidade, pode auxiliar na definição precisa das melhores condições experimentais.

A partir dos resultados da determinação de compostos bioativos e das propriedades antioxidantes, aplicou-se a análise de componentes principais (PCA). As Figuras 1a e 1b exibem os dados da análise de componentes principais (PCA) para os dois conjuntos experimentais, os quais permitiram identificar padrões distintos de associação entre os ensaios e as variáveis bioativas.

1.a) 1.b)

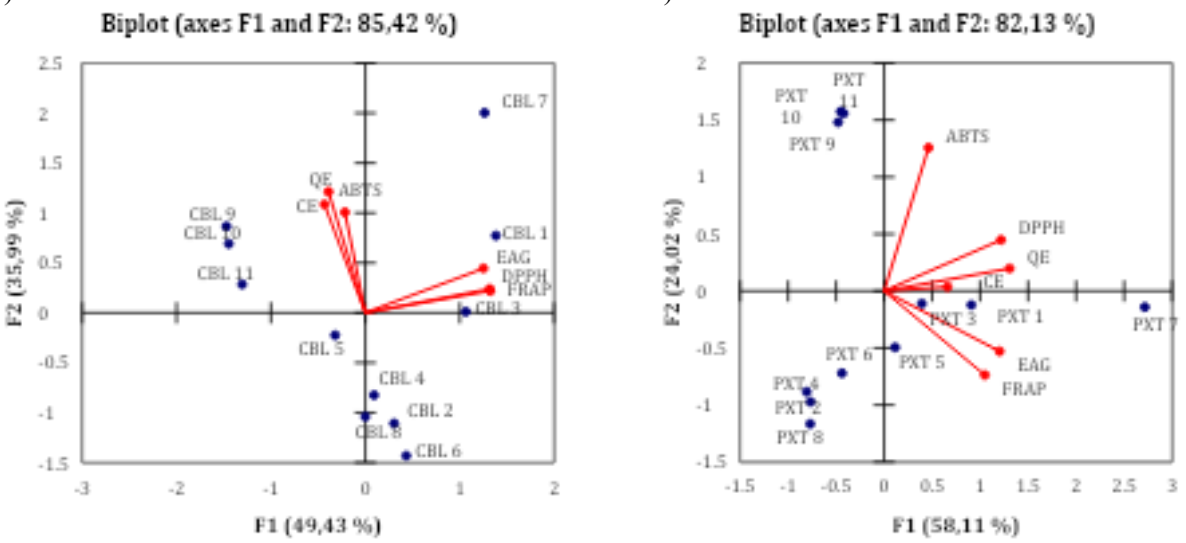

Figura 1. a) Gráfico Bi-plot de Análise de Componentes Principais para o complexo enzimático CBL; b) Gráfico Bi-plot de Análise de Componentes Principais para o complexo enzimático PXT.

No conjunto CBL, os eixos F1 e F2 explicaram 85,42% da variância, com destaque para o tratamento CBL7, posicionado de forma isolada e fortemente correlacionado às variáveis ABTS, CE e QE, indicando predominância de flavonoides na resposta antioxidante. Já os tratamentos CBL1 e CBL3 foram associados a EAG, DPPH e FRAP, sugerindo maior influência dos fenólicos totais. No conjunto PXT, os eixos F1 e F2 explicaram 82,13% da variância, e o tratamento PXT7 também se destacou por sua separação clara dos demais, com forte correlação com quase todas as variáveis, especialmente EAG e FRAP, além de CE e QE, refletindo um perfil mais equilibrado de compostos bioativos. Em contraste, PXT9 a PXT11, mesmo com altos valores de ABTS, mostraram fraca correlação com as demais variáveis, situando-se em região oposta no gráfico, sugerindo menor contribuição fenólica e menor eficácia antioxidante global.

Esses resultados gráficos reforçam que as condições de ensaio adotadas em CBL7 e PXT7 representaram os pontos ótimos de extração, com perfis bioativos distintos, mas com alto desempenho em múltiplas variáveis. A PCA, portanto, confirmou visualmente os achados quantitativos, evidenciando a influência específica dos grupos de compostos nas diferentes respostas antioxidantes.

Os extratos hidrolisados CBL7, CBL10, PXT7 e PXT10 foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana. Inicialmente, verificou-se a sensibilidade das cepas bacterianas aos extratos padronizados pelo teor de fenólicos totais. Observou-se que a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) foi resistente a todos os extratos testados.

Por outro lado, os demais micro-organismos apresentaram sensibilidade variável. Para o extrato CBL10, foi determinada uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,31 mg AGE/mL contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235). Já contra *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), as CIMs foram de 0,18 mg AGE/mL para o extrato CBL7 e 0,15 mg AGE/mL para o CBL10.

Nos ensaios com os extratos da série PXT, tanto o PXT7 quanto o PXT10 apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, com CIMs de 0,13 mg AGE/mL e 0,15 mg AGE/mL, respectivamente.

A atividade antimicrobiana observada nos extratos pode ser atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos e outros metabólitos bioativos liberados ou concentrados durante a hidrólise dos resíduos de urucum. Bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, possuem uma parede celular com fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos e lipoproteínas. Essa estrutura favorece a interação com compostos lipofílicos presentes nos extratos. Por outro lado, bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, apresentam parede espessa composta por peptidoglicanos porosos, que permitem a difusão de compostos polifenólicos hidrossolúveis, como catequinas e ácidos fenólicos. Esses compostos podem inibir a síntese de ácidos nucleicos, comprometer a integridade da membrana citoplasmática e afetar o metabolismo energético, resultando na inibição do crescimento microbiano (Quiroz et al., 2019).

CONCLUSÃO:

Os tratamentos enzimáticos CBL7 e PXT7 demonstraram maior eficiência na liberação de compostos bioativos da farinha da cachopa, refletindo-se em altos teores de fenólicos e flavonoides e elevada atividade antioxidante e antimicrobiana. A análise multivariada confirmou esses tratamentos como os mais equilibrados e eficazes. Esses resultados indicam além das melhores condições de processamento enzimático, o potencial de aplicação funcional dos extratos obtidos em condições intermediárias de hidrólise, especialmente para formulações com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, despontando a cachopa como um possível conservante natural.

BIBLIOGRAFIA

AOAC. **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists.** 18th Edition, Washington, DC, 2010.

BEARGIE, R. A.; BRACKEN, E. C.; RILEY, H. D. Micromethod (Spot-Plate) Determination of in Vitro Antibiotic. **Applied microbiology**, v. 13, n. 2, p. 279–280, 1965.

DJIBERSOU, D. et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of aqueous extracts of leaves, barks and roots of *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) on acetaminophen-induced liver damage in mice. **Avicenna Journal of Phytomedicine,** v. 10 (4), p. 428-439, 2020.

DOS SANTOS RAMOS, F. et al. Soybeans agroindustrial residues as Staphylococcus epidermidis and S. aureus biofilm inhibitors. **Industrial Crops and Products**, v. 170, n. November 2021.

FRANCA, S. A. M. DA et al. Technical-economic evaluation of lipo- and water-soluble fractions from annatto seeds by green technology. **British Food Journal**, v. 126, n. 3, p. 1032–1049, 2024.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 37-44, 2012.

QUIROZ, J. Q., DURAN, A.M.N., GARCIA, M.S., GOMEZ, G.L.C., CAMARGO, J. J. R. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. **International Journal of Food Science**, (4): 1 – 9, 2019.

RAJU, S. K. et al. Review on phytochemical composition and pharmacological activities of Bixa orellana. **Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 57–67, 2023.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2015.

VIUDA-MARTOS, M. et al. In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (Bixa orellana L.) Leaves and Seeds. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 4, p. 399–406, 2012.

ZABOT, G. L.; MORAES, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Process integration for producing tocotrienols-rich oil and bixin-rich extract from annatto seeds: A techno-economic approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 122–138, 2018.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.