



LIARA MACEDO RODRIGUES

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM BIXINA A PARTIR DE
SEMENTES DE URUCUM DESENGORDURADAS: estudo dos
parâmetros de processo**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LIARA MACEDO RODRIGUES

**“OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM BIXINA A PARTIR DE
SEMENTES DE URUCUM DESENGORDURADAS: estudo
dos parâmetros de processo”**

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Maria Ângela de Almeida Meireles

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
LIARA MACEDO RODRIGUES E ORIENTADA PELA
PROF.^a DR.^a MARIA ANGELA DE ALMEIDA MEIRELES**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

R618o Rodrigues, Liara Macedo, 1987-
Obtenção de extratos com bixina a partir de sementes de Urucum
desengorduradas : estudo dos parâmetros de processo / Liara Macedo Rodrigues.
– Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Ângela de Almeida Meireles.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1. Bixina. 2. Extração(Química). 3. Urucum. 4. Ultrassom. 5. Carotenóides. I.
Meireles, Maria Ângela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Obtaining extracts with bixin from defatted Annatto seeds : study of
process parameters

Palavras-chave em inglês:

Bixin

Extraction(Chemistry)

Annatto

Ultrasound

Carotenoids

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Maria Ângela de Almeida Meireles [Orientador]

José Roberto Delalibera Finzer

Julian Martinez

Data de defesa: 20-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida por **Liara Macedo Rodrigues** aprovado pela Comissão Julgadora em ____ de _____ de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Ângela de Almeida Meireles
DEA/FEA/UNICAMP
Orientadora

Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer
UNIUBE
Titular

Prof. Dr. Julian Martinez
DEA/FEA/UNICAMP
Titular

Dr.^a Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque
FEA/UFPB
Suplente

Dr.^a Losiane Cristina Paviani Diehl
DEA/FEA/UNICAMP
Suplente

A Deus,

A toda a minha família, em especial a minha mãe,
Regina Helena, que sempre esteve ao meu lado
com todo seu amor e incentivo, sem os quais
não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Ângela de Almeida Meireles, pela oportunidade, confiança, compreensão e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e, junto com a FAPESP, pelo apoio financeiro neste projeto.

À UNICAMP, por oferecer toda estrutura necessária para a realização deste trabalho;

À Dra. Eliane Gomes Fabri (IAC/APTA), por disponibilizar a matéria-prima urucum utilizada neste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e seus professores pelo aprendizado e conhecimento interdisciplinar, e também aos funcionários da secretaria de pós-graduação sempre prestativos.

Ao Dr. Julian Martínez pela predisposição em ajudar, sempre que precisei.

Ao professor Dr. José Roberto Delalibera Finzer (FAZU) pelo constante apoio, respeito e amizade desde sempre.

A Dra. Mirian Dupas Hubinger (Laboratório de Engenharia de Processos - FEA) e

Dr. Ranulfo Monte Alegre (Laboratório de Tratamento de Resíduos - FEA) pela disponibilidade e uso das instalações.

Ao Ariovaldo Astini, pela paciência e companheirismo.

À Sylvia C. Alcázar-Alay e Carolina Albuquerque pela parceria, companheirismo e amizade, sem os quais tudo teria sido mais difícil.

Às minhas queridas amigas Ana Paula Machado, Maria Thereza Gomes e Jenny Sobenes por dividirem comigo os momentos mais agradáveis, e os mais angustiantes também.

Aos demais colegas do LASEFI e do departamento de engenharia de alimentos pela companhia e apoio.

Aos meus pais que, mesmo sempre longe são inspiração para acreditar que tudo é possível quando se tem fé;

Ao meu irmão pelo incentivo em sempre buscar o melhor.

Ao meu querido e amado Luís Fernando com quem dividi esses dois anos de incalculável crescimento pessoal e emocional e por sempre me fazer encontrar motivos para me superar.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autora: Liara Macedo Rodrigues

Título: Obtenção de extratos com bixina a partir de sementes de Urucum desengorduradas: estudo dos parâmetros de processo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Ângela de Almeida Meireles

RESUMO

O consumo de produtos naturais e a demanda por tecnologias verdes estão crescendo a cada dia, então é imprescindível alcançar um processo viável de fabricação na indústria alimentícia para a produção de aditivos, tais como corantes naturais. O urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) é uma planta nativa da América tropical, cujas sementes são cobertas por uma resina vermelha que contém como pigmento principal o carotenoide bixina. O objetivo deste trabalho foi obter de extratos contendo bixina a partir de sementes de Urucum desengorduradas com CO₂ supercrítico. Com esse intuito foram feitas extrações com líquido pressurizado (PLE - Pressurized Liquid Extraction) usando etanol como solvente, variando as condições de temperatura, pressão e proporção solvente/matéria prima (S/F). Extrações com líquido a baixa pressão (LPSE – Low Pressure Solvent Extraction) foram realizadas com etanol e água, variando as condições de temperatura e proporção solvente/matéria prima (S/F), usando ou não o ultrassom (banho ultrassônico de frequência 40 kHz). A composição química dos extratos foi analisada quanto ao teor de bixina, por método espectrofotométrico. PLE apresentou maior rendimento em 60°C e 10 MPa, com valores de 7,22 (% b.s.) para rendimento global (X₀), e 9,07 (% b.s.) em rendimento de extração de bixina (RB). LPSE mostrou os melhores resultados com o uso de etanol como

solvente a 40 °C assistido por ultrassom, com valores de 13,6 % (b.s.) para X_0 e 31,6 % (b.s.) no BY, no entanto, a análise de variância indicou serem significativas as diferenças avaliadas somente para as variáveis temperatura e solvente. Então, finalmente, três condições foram selecionadas para o estudo cinético de extração usando o método LPSE com etanol como solvente: dois deles usando sementes desengorduradas, um a 60 °C e outro a 50 °C; e uma terceira extração usando sementes *in natura* a 60 °C para observar diferenças no rendimento de extração de bixina (sem empregar o ultrassom nessas cinéticas). O pré-tratamento (remoção da fração lipídica por SFE) das sementes facilitou a separação subsequente da bixina, com RB de aproximadamente 28 %, sem agitação ou atrito, simplesmente valendo-se de um sistema de extração com baixa pressão. Para auxiliar a interpretação dos resultados, algumas amostras de sementes de Urucum foram analisadas por MEV-Microscopia Eletrônica de Varredura. Muito embora o uso de banho ultrassônico não tenha afetado significativamente X_0 e RB, as micrografias indicaram modificações na estrutura da matriz.

Palavras-chave: Bixina, extração (química), Urucum, ultrassom, carotenoide.

MASTER THESIS

Author (a): Liara Macedo Rodrigues

Title: Obtaining extracts with bixin from defatted Annatto seeds: study of process parameter

Major Professor: Prof.^a Dr.^a Maria Ângela de Almeida Meireles

ABSTRACT

The consumption of natural products and the demand for green technologies is growing each day, so is a major concern to accomplish a viable manufacturing process in Food Industry for additives production, such as natural dyes. The annatto tree (*Bixa orellana* L.) is originally from American tropics, whose seeds are covered by a red resin that contains the main pigment, the bixin carotenoid. The aim of this study was to obtain extracts containing bixin from defatted annatto seeds by supercritical CO₂. Extractions were performed with pressurized liquid (PLE - Pressurized Liquid Extraction), using ethanol as solvent and temperature, pressure and ratio solvent/raw material (S/F) as variables. Extractions at low pressure (LPSE – Low Pressure Solvent Extraction) were also carried out, with ethanol and water, varying temperature, solvent/raw material (S/F) proportion and using or not using ultrasound (ultrasonic bath 40 kHz frequency). The spectrophotometric method was employed to quantify the amount of bixin. PLE showed higher yield at 60 °C and 10 MPa, with values of 7.22 (% d.b.) for overall yield (X₀), and 9.07 (% d.b.) in bixin yield extraction (BY). LPSE showed better results when using ethanol as solvent at 40 °C assisted by ultrasound, with values of 13.6% (d.b.) to X₀ and 31.6% (d.b.) in BY, however analysis of variance indicates significant differences only for temperature, and solvent. Thus, finally, three were the selected conditions for the kinetic extractions studies using LPSE method with ethanol as solvent: two of them using defatted seeds, one at 60 °C and the other at 50 °C; and a third extraction using *in nature* seeds at 60 °C for observing differences in bixin yield (without using the ultrasound for all these kinects). The pretreatment employed on seeds (removal of the lipid fraction by SFE) facilitated the

subsequent separation of bixin resulting in a BY of approximately 28%, with no agitation or friction, simply applying an extraction system at low pressure. In order to assist the interpretation of results some samples of Annatto seeds were analyzed by SEM-Scanning Electron Microscopy. Even though the use of the ultrasonic bath had not significantly affected X_0 and BY, the micrographs indicate changes in the vegetal matrix structure.

Keywords: Bixin, extraction (chemistry), Urucum, ultrasound, carotenoids.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
ABREVIATURAS E SIGLAS	xxv
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	3
2.1 – Objetivo geral	3
2.2 – Objetivos específicos	3
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 – Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	4
3.1.1 – Aplicações do Urucum	5
3.2 – Carotenoides	6
3.2.1 – Carotenoides de Urucum	8
3.3 – Extração	10
3.3.1 – Extração Assistida por Ultrassom (UAE)	11
3.3.2 – Extração com fluidos pressurizados	13
3.3.3 – Extração com líquidos pressurizados	15
3.3.1 – Extração de corantes do urucum	16
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 – Matéria-prima	21
4.1.1 - Origem	21

4.1.2 – Preparo e identificação da amostra.....	21
4.1.2.1 – Identificação	21
4.1.2.2 – Moagem e armazenamento.....	22
4.1.3 – Caracterização física.....	22
4.1.3.1 - Diâmetro das sementes.....	22
4.1.3.2 - Densidade aparente, densidade real e porosidade do leito	22
4.1.3.3 - Análise de microscopia eletrônica de varredura das sementes de Urucum....	23
4.1.4 – Caracterização química.....	24
4.1.4.1 - Análise da composição centesimal.....	24
4.1.4.2 – Carotenoides totais expressos em bixina (%)	25
4.2 – Extrações preliminares	26
4.3 - Processos de extração com líquido pressurizado (PLE).....	27
4.3.1 – Equipamento: Unidade PLE	27
4.3.2 – Procedimento de extração.....	28
4.3.3 – Planejamento experimental PLE	29
4.4 – Extrações em baixa pressão assistidas ou não por ultrassom	30
4.4.1 – Equipamento: banho ultrassônico a baixa pressão	30
4.4.2 – Procedimento de extração.....	31
4.4.3 – Planejamento experimental LPSE	32
4.5 – Estudo cinético de extração	34
4.6 – Cálculos	34
4.6.1 - Determinações do rendimento global (X_0).....	34
4.6.2 – Rendimento de extração de bixina RB (%)	35
4.6.3 – Análise estatística	35
4.6.4 – Parâmetros cinéticos	35

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 – Caracterização da matéria-prima	37
5.1.1 – Caracterização física.....	37
5.1.2 – Caracterização química.....	37
5.2 – Estudos preliminares de extração	38
5.3 – Processos de extração com líquido pressurizado.....	40
5.4 - Extrações em baixa pressão assistidas ou não por ultrassom.....	43
5.5 – Cinéticas de extração	47
5.5.1 – Cálculos cinéticos	50
5.5.2 – Rendimento de extração de bixina nas OECs.....	55
5.6 – Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	56
6 – CONCLUSÕES	68
7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9 – ANEXOS	77
9.1 – Resultados experimentais	77
9.1.1 – Cinéticas de extração	77
9.1.2 – Procedimento do ajuste dos dados experimentais	80
9.2 – Isotermas das extrações PLE	86
9.3 – Curvas de extração LPSE	87
9.4 - Galeria de fotos	88
9.4.1 – Equipamento de extração PLE	88
9.4.2 – Extratos obtidos nos experimentos LPSE.....	88
9.4.3 – Cinéticas	93
9.4.4 – Sementes de urucum.....	94

9.5 – Atividades acadêmicas	96
9.5.1 - Capítulo de livro aceito para publicação	96
9.5.2 – Trabalhos completos apresentado em congresso.....	96
9.5.3 – Artigo a ser submetido.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – (a) Fruto de urucum. (b) Sementes de urucum.....	4
Figura 3. 2 - Fórmula molecular de bixina e norbixina, (ROCHA <i>et al</i> , 2010).	8
Figura 3. 3 - Caminho proposto para a biossíntese da bixina mostrando etapas a partir da catálise do licopeno (BOUVIER, DOGBO e CAMARA, 2003).....	9
Figura 3.4 - Diagrama de equilíbrio de substância pura (adaptado de SANDLER, 2006) ..	15
Figura 4. 1 - Etapas experimentais realizadas.	20
Figura 4.2 – Equipamento de extração com líquido pressurizado (SANTOS, ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2011).....	28
Figura 4. 3 – (a) Célula de extração aberta. (b) Célula de extração fechada.....	29
Figura 4. 4 - Equipamento de extração por percolação a baixa pressão assistido por ultrassom	31
Figura 4. 5 - Leito de extração contendo o material inerte e a matriz vegetal.	32
Figura 5. 1 – Extratos obtidos dos testes preliminares. (a) água/120°C/20 MPa; (b) água/120°C/2 MPa; (c) água/60°C/2 MPa; (d) água/agitação manual/condições ambientes; (e) etanol/60°C/2 MPa; (f) etanol/agitação manual/condições ambientes; (g) acetato de etila/60°C/2 MPa; (h) acetato de etila/agitação manual/condições ambientes.	40
Figura 5. 2 - Curvas de rendimento global extração <i>versus</i> tempo (a) e rendimento global <i>versus</i> S/F (b) das sementes de Urucum desengorduradas a 50 °C (cin. I) e 60 °C (cin. II) e <i>in natura</i> a 60 °C (cin. III).....	49
Figura 5. 3 - <i>Spline</i> de três retas ajustadas aos dados experimentais da OEC da Cinética I (LPSE/50 °C/UM-D) em função do tempo de extração (a) e em função da razão S/F (b). ..	51
Figura 5. 4 - <i>Spline</i> de três retas ajustadas aos dados experimentais da OEC da Cinética II (LPSE/60 °C/UM-D) em função do tempo de extração (a) e em função da razão S/F (b). ..	52
Figura 5. 5 - (a) <i>Spline</i> de duas retas ajustadas aos dados experimentais da OEC da Cinética III (LPSE/60 °C/UM-IN) em função do tempo de extração (a) e em função da razão S/F..	53
Figura 5. 6 - Rendimento de extração de bixina RB (%) nas OECs usando sementes de Urucum (<i>Bixa Orellana</i> L.) em diferentes condições de processo.....	55
Figura 5.7 - Semente de Urucum <i>in natura</i> com aumento de 45x (a) e de 1000x (b).....	58

Figura 5.8 - Sementes de Urucum desengorduradas em extração com CO ₂ supercrítico (40 °C e 20 MPa), com aumento de 45x (a) e com aumento de 1000x (b).	59
Figura 5. 9 - Semente de Urucum desengordurada após extração com LPSE-C a 60 °C, com ultrassom contínuo durante toda a extração, com aumento de 45x (a) e com aumento de 1000x (b).	61
Figura 5. 10 - Semente de Urucum desengordurada após extração com PLE a 60 °C e 10 MPa, com aumento de 45x; (a) e com aumento de 1000x.	62
Figura 5. 11 - Semente de Urucum desengordurada após extração com etanol a 50 °C/LPSE por 95 minutos (Cinética I), com aumento de 45x; (a) e com aumento de 1000x (b).....	63
Figura 5. 12 - Semente de Urucum desengordurada após extração com etanol a 60 °C/LPSE por 95 minutos (Cinéticas II), com aumento de 45x; (a) e com aumento de 1000x.....	64
Figura 5. 13 - Semente de Urucum <i>in natura</i> após extração com etanol a 60 °C/LPSE por 95 minutos (Cinética III), com aumento de 45x (a) e com aumento de 1000x (b).....	65
Figura 9.1 - Isotermas de rendimento global (%) para extrações com etanol pressurizado.	86
Figura 9.2 - Isotermas de rendimento de bixina (%) para extrações com etanol pressurizado.	86
Figura 9.3 – X ₀ (%) em extração a baixa pressão (LPSE), com ultrassom em pulsos (LPSE-P) e com ultrassom contínuo (LPSE-C) usando etanol como solvente.	87
Figura 9.4 - Rendimento de bixina (%) em procedimentos de extração a baixa pressão (LPSE), com ultrassom em pulsos (LPSE-P) e com ultrassom contínuo (LPSE-C) usando etanol como solvente.	87
Figura 9.5 - Equipamento de extração com líquido pressurizado.	88
Figura 9. 6 – Extratos de Urucum obtidos com água à baixa pressão, com diferentes S/F e temperaturas.....	89
Figura 9. 7 - Extratos de Urucum obtidos com água LPSE-P a baixa pressão assistido por ultrassom em pulsos, em diferentes S/F e temperaturas.	89
Figura 9. 8 - Extratos de Urucum obtidos com água LPSE-C a baixa pressão assistido por ultrassom em toda extração, em diferentes S/F e temperaturas.....	90
Figura 9. 9 - Extratos de Urucum obtidos com etanol LPSE à baixa pressão, em diferentes S/F e temperaturas.	90

Figura 9. 10 - Extratos de Urucum obtidos com etanol LPSE-P à baixa pressão assistido por ultrassom em pulsos, em diferentes S/F e temperaturas.....	91
Figura 9. 11 - Extratos de Urucum obtidos com etanol LPSE-C à baixa pressão assistido por ultrassom durante toda extração, em diferentes S/F e temperaturas.....	91
Figura 9. 12 - Cinética LPSE/50°C (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85 e 95 min.).....	93
Figura 9. 13 - Cinética LPSE/60°C (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85 e 95 min.).....	93
Figura 9. 14 - Cinética LPSE/60°C/engorduradas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85 e 95 min.).....	93
Figura 9. 15 - Sementes de Urucum <i>in natura</i> (UM-IN).....	94
Figura 9. 16 - Sementes de Urucum por SFE (UM-D).....	94
Figura 9. 17 - Sementes de Urucum desengorduradas após Cinética I (50°C).	95
Figura 9. 18 - Sementes de Urucum desengorduradas após Cinética II (60°C).	95
Figura 9. 19 - Sementes <i>in natura</i> (UM-IN) após Cinética III (60°C).	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 - Alguns carotenoides encontrados na natureza.....	7
Tabela 3. 2 - Propiedades críticas de alguns fluidos com interesse em extração (MENDES <i>et al.</i> , 2003; BRUNNER, 2005).....	13
Tabela 3. 3 - Teores médios de bixina nas sementes esgotadas após extração com os diferentes solventes extratores e eficiência das extrações (SILVA, AMARAL e REBOUÇAS, 2010).	17
Tabela 4. 1 - Planejamento experimental dos ensaios de extração por PLE.	30
Tabela 4. 2 - Planejamento experimental dos ensaios de extração por percolação a baixa pressão assistidas ou não por ultrassom.	33
Tabela 5.1 – Características físicas das sementes de Urucum (média \pm desvio padrão).....	37
Tabela 5.2 - Composição centesimal (valor [%] \pm desvio padrão) das amostras de Urucum (b.s.).....	37
Tabela 5.3 - Resultados dos testes preliminares de extração usando sementes de Urucum (UM-D).....	39
Tabela 5. 4 - Rendimento global de extração X_0 (% , b.s.), quantidade de bixina no extrato (% , b.s.), rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.) pelo método PLE usando etanol.	41
Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global X_0 (% , b.s.) das extrações por PLE.....	42
Tabela 5.6 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.) das extrações por PLE.	42
Tabela 5.7 - Rendimento global de extração X_0 (% , b.s.), quantidade de bixina no extrato (% , b.s.), rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.) pelo método LPSE, usando água ou etanol.	44
Tabela 5.8 - ANOVA dos parâmetros estudados sobre X_0 (%), nas extrações LPSE.....	45
Tabela 5.9 - ANOVA dos parâmetros estudados sobre RB (%), nas extrações LPSE.....	45
Tabela 5.10 - Valores máximos obtidos nos métodos extrativos testados com etanol.....	47
Tabela 5. 11 - Condições de extração em que foram realizadas as cinéticas.	47
Tabela 5. 12 - Valores encontrados para os parâmetros cinéticos ajustados às OECs.	54

Tabela 5. 13 - Identificação da semente analisadas por MEV.....	56
Tabela 9. 1 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/50 °C.....	77
Tabela 9. 2 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/50 °C. (duplicata)	77
Tabela 9. 3 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60°C.....	78
Tabela 9. 4 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60 °C. (duplicata)	78
Tabela 9. 5 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60 °C/ <i>in natura</i>	79
Tabela 9. 6 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60 °C/engorduradas. (duplicata).....	79
Tabela 9. 7 - Rotina de programação usada no SAS 9.2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (60 °C/LPSE/UM-D) a um spline de 3 linhas retas: PROC REG	81
Tabela 9. 8 - Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS 9,2 (SAS.....	82
Tabela 9. 9 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (60 °C/LPSE/UM-D) a um spline de 3 linhas retas: PROC NLIN.....	83
Tabela 9. 10 - Dados de saída do procedimento PROC NLIN do software SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.).....	84
Tabela 9. 11 - Legenda para os experimentos.	92

ABREVIATURAS E SIGLAS

ASE = (*Accelerated Solvent Extraction*) extração acelerada com solvente

b.s. = Base seca

b_0, b_1, b_2, b_3 = parâmetros do modelo de ajuste de retas à OEC

CATP = Condições ambientes de temperatura e pressão

CER = (*Constant Extraction Rate*) taxa de extração constante

CO₂ = Dióxido de carbono

COM = (*Cost of Manufacturing*) estimativa do custo de produção

d_p = diâmetro médio

d_1, d_2, d_3 = medidas de altura, largura e espessura das sementes

DC = (*Diffusion Controlled*) período controlado por difusão

FER = (*Falling Extraction Rate*) período de taxa decrescente de extração

GLM = (*General Linear Model*) modelo geral de regressão linear

GRAS = (*Generally Recognized As Safe*) comumente reconhecido como seguro

HIU = (*High-Intensity Ultrasound*) ultrassom de alta intensidade

LIU = (*Low-Intensity Ultrasound*) ultrassom de baixa intensidade

LPSE = (*Low Pressure Solvent Extraction*) extração com solventes orgânicos a baixa pressão

LPSE-P = (*Low-Pressure Solvent Extraction*) extração com solventes orgânicos a baixa pressão com pulsos de ultrassom a cada 50 seg.

LPSE-C = (*Low-Pressure Solvent Extraction*) extração com solventes orgânicos a baixa pressão durante toda a extração.

M_{CER} = taxa de transferência de massa no período CER

M_{EXT} = Massa de extrato [g]

M_{MP} = Massa da amostra [g]

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MP = Matéria-prima

OEC = *Overall Extraction Curve* (curva global de extração)

P = Pressão [Mpa]

PLE = *Pressure Liquid Extraction* (extração com líquido pressurizado)

RB = Rendimento de extração de bixina [%]

R_{CER} = rendimento no período CER

S/F = *Solvent/Feed* (razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima de alimentação [g/g])

SFE = *Supercritical Fluid Extraction* (extração com fluido supercrítico)

T = Temperatura [°C]

t= tempo

t_{CER} = duração do período CER

UAE = *Ultrasound Assisted Extraction* (extração assistida por ultrassom)

UM-IN = Sementes de urucum *in natura*

UM-D = Sementes de urucum desengorduradas

X_0 = Rendimento global de extração [%]

Y_{CER} = Concentração de soluto no solvente na saída do extrator durante o período CER

ε = Porosidade do leito

ρ = Densidade

ρ_a = Densidade aparente do leito

ρ_r = Densidade real das partículas

1 – INTRODUÇÃO

O uso de aditivos com intuito de tornar os alimentos visualmente mais atraentes é muito comum, seja na indústria alimentícia ou no uso doméstico cotidiano.

Os carotenoides pertencem a uma classe de compostos que apresentam poder corante. Estes pigmentos têm sido largamente utilizados nas indústrias de alimentos, que procuram agregar maior valor a seus produtos, buscando substituir os corantes sintéticos por naturais. Devido ao fato de que há uma exigência e preferência do consumidor por compostos naturais, observa-se uma tendência mundial quanto ao aumento da utilização desses produtos em detrimento dos sintéticos.

O uso de colorantes contendo bixina e norbixina favorece a indústria nacional, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de sementes de urucum. Os colorantes podem ser usados como corante e como pigmento. A diferença básica está na solubilidade do colorante no meio em que é incorporado. O corante atribui cor através da alteração da cor do meio, onde o corante é solúvel. Enquanto que o pigmento confere cor através da sua dispersão neste meio (SARON; FELISBERTI, 2006). Assim, o colorante pode agir como corante ou pigmento, dependendo da aplicação e da natureza do meio (ALBUQUERQUE, 2013).

O Brasil possui uma imensa biodiversidade, contando com diferentes tipos de florestas, as quais possuem vasta riqueza genética devido a suas faunas e floras típicas. Este fato associado à tradição na produção agrícola garante a disponibilidade de matéria-prima a baixo custo para a obtenção de extratos de matrizes biológicas (ROSA e MEIRELES, 2005).

O urucueiro (*Bixa orellana* L.) é uma planta nativa da América tropical. Suas sementes são cobertas por uma resina vermelha que contém como colorante principal o carotenoide bixina.

Várias preparações comerciais com finalidades colorantes são preparadas com urucum e cada uma delas tem especificidade diferente, cujas aplicações são geralmente recomendadas pelo fabricante. O seu uso é permitido em 20 produtos como massas alimentícias, produtos extrusados, lácteos, salsichas, cereais matinais, doces, produtos de panificação, margarinas, cremes, sorvetes, molhos e condimentos.

O projeto de processos industriais, sob a ótica da sustentabilidade, visa a alterações substanciais na indústria atual. Para tanto, é exigido o desenvolvimento de novos processos baseados em matérias-primas renováveis, na utilização mínima necessária de energia e solventes sem restrições ambientais. Neste contexto, as tecnologias baseadas na utilização de fluidos pressurizados parecem oferecer soluções para essas demandas (SANTOS, ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2011).

O aprofundamento nos estudos de tecnologias limpas de extração, (livres de resíduos de processo: solventes orgânicos), e de colorantes e antioxidantes de urucum são necessários, uma vez que se observa uma tendência generalizada do mercado (indústria de alimentos, fármacos e cosméticos) pela busca por produtos que gerem vantagens econômica, social e ambiental (ALBUQUERQUE & MEIRELES, 2012).

Geralmente, tanto para os processos de extração com fluidos pressurizados, quanto para os processos de precipitação, solventes GRAS (*“Generally Recognised as Safe”*) são preferidos, sendo dióxido de carbono, água e etanol os mais utilizados (SANTOS, ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2011).

Novos métodos de extração da bixina de urucum têm sido amplamente estudados. Deseja-se que os processos atendam às exigências do mercado interno e externo. O incremento de tecnologias eficazes de processamento e o crescente conhecimento na química e bioquímica dos colorantes do urucum, e de seu comportamento em diferentes meios, podem contribuir significativamente na qualidade do produto final (corante ou pigmento), bem como no rendimento dos processos de extração.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Determinar o procedimento tecnicamente mais viável para extração de bixina do urucum usando sementes previamente desengorduradas com CO₂ supercrítico.

2.2 – Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos que foram definidos:

- Caracterizar a matéria-prima;
- Realizar extrações preliminares;
- Selecionar métodos e solventes para a extração;
- Avaliar os efeitos dos métodos selecionados para extração de bixina sobre o rendimento global e rendimento de extração de bixina;
- Realizar estudos cinéticos nas condições de melhores rendimentos para obter parâmetros de processo que auxiliem na escolha do melhor método, e posteriormente compará-lo com a extração das sementes de Urucum sem pré-tratamento.
- Avaliar o efeito dos processos nas superfícies das sementes de Urucum, por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), para auxiliar a interpretação dos resultados das extrações.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Urucum (*Bixa orellana* L.)

O urucuzeiro é originário da América tropical, pertence à família Bixaceae e responde pelo nome botânico de *Bixa orellana* L. Dependendo da região de cultivo e da idade da planta, apresenta-se como um arbusto perene grande ou como uma árvore pequena. A planta exibe grande variabilidade de coloração, com caule pardo-avermelhado, flores brancas e frutos verdes ou caule vermelho, flores rosas e frutos vermelhos-escuros (PRESTON e RICKARD, 1980). O urucuzeiro tem uma altura que varia entre 2 a 9 m, podendo ser considerada uma planta ornamental pela beleza e colorido de suas flores, além de ser produtora do corante natural de grande interesse comercial. Os frutos são cápsulas armadas por espinhos maleáveis que se tornam vermelhas quando maduras (Figura 3.1 (a) e (b)). Na maturidade, o interior das cápsulas contém pequenas sementes dispostas em série, envolvidas por arilo vermelho. Das sementes de cor avermelhada, extrai-se o corante natural que é muito utilizado pelas indústrias (GOMES e BRUNO, 1992).



(a)



(b)

Figura 3.1 – (a) Fruto de urucum. (b) Sementes de urucum.

A semente bruta apresenta como composição típica: 40 a 45 % de celulose, 3,5 a 5,5 % de açúcares, 0,3 a 0,9 % de óleo essencial, 3 % de óleo fixo, 1,0 a 4,5 % de pigmento, 13

a 16 % de proteína como também taninos e saponinas e destacando-se elevada concentração do delta-tocotrienol, 140 - 147 mg/100 g no extrato hexânico seco, sendo maior do que os teores normalmente encontrados em qualquer outra espécie vegetal (OLIVEIRA, 2005).

Sementes de urucum são consideradas sementes condimentares, mas com funções biológicas tais como efeito laxativo, cardiotônico, hipotensores, expectorantes e antibióticos, agindo como anti-inflamatório para as contusões e feridas, apresentando, ainda, emprego interno na cura das bronquites e externo nas queimaduras. As sementes dessa planta se destacam como importante matéria-prima para a obtenção dos corantes bixina, norbixina e norbixato, em razão das suas características de produto natural, não tóxico, elevado poder tintorial e amplo espectro de cores, utilizados para coloração de produtos alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e têxteis, além de serem usados como condimentos culinários (colorau) (SILVA, AMARAL e REBOUÇAS, 2010).

No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de sementes de urucum no ano de 2010 foi de 13.309 toneladas, destacando-se as regiões Sudeste, Norte e Nordeste que responderam, respectivamente, por 34, 34 e 18 % do total produzido. Os principais estados produtores brasileiros são: São Paulo, Rondônia, Pará, Minas Gerais, Paraná e Bahia. Em 2005, o Estado de São Paulo foi o maior produtor com 2.932 t de sementes, ou seja, aproximadamente 22 % da produção nacional, seguido de Rondônia e do Pará, com 2.342 e 2.108 t, respectivamente (IBGE, 2010).

Para as regiões Norte e Nordeste do país, a cultura do urucuzeiro é de grande importância. Cerca de 80% do seu cultivo têm origem na agricultura familiar (FRANCO, 2007).

3.1.1 – Aplicações do Urucum

O consumo de um alimento que possui em sua composição os aditivos corantes naturais é associado à imagem de um alimento de qualidade e saudável; além dos corantes

sintéticos possuem a tendência de serem vistos como indesejáveis e prejudiciais, alguns são responsabilizados por reações alérgicas e de intolerância (MONTES *et al.*, 2005).

O urucum é a mais importante fonte de corante natural empregada na indústria de alimentos, correspondendo a em torno de 90 % do total de consumo de corantes naturais no Brasil e em torno de 70 % de corantes naturais mundialmente empregados em alimentos (CANTO *et al.*, 1991).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) é o órgão que regulariza o uso dos corantes alimentícios, que determina em quais alimentos podem ser adicionados e os limites máximos permitidos. O MS segue as recomendações do Comitê da FAO/OMS “Joint Expert on Food Additives (JECFA)”, que nos anos 70, após uma série de estudos toxicológicos, reduziu a ingestão diária aceitável para os extratos de urucum de 1,25 mg/kg para 0,065 mg/kg de peso corpóreo, expressos em bixina (FAO, 2006). Na época, uma das alegações era de que pouco se conhecia sobre a composição do urucum e de suas preparações (MERCADANTE e PFANDER, 2001)

Após o 67º Encontro do JECFA, ocorrido em Roma em julho de 2006, os valores da IDA para os carotenoides presentes no extrato de urucum foram reavaliados, sendo estabelecida uma faixa de 0 a 12 mg/kg de peso corporal para bixina e de 0 a 0,6 mg/kg de peso corporal para norbixina e seus sais de sódio ou potássio (FAO, 2006)

3.2 – Carotenoides

Os carotenoides têm a estrutura básica de tetraterpenos de quarenta carbonos, formados por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro (MALDONADE, 2003). Este esqueleto básico pode ser modificado através de várias maneiras, como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação (STRAUB e PFANDER, 1987).

Os carotenoides são divididos em dois grandes grupos: os carotenos, que quimicamente são hidrocarbonetos, e as xantofilas que são derivados oxigenados. Neste último grupo estão incluídos colorantes que possuem em sua estrutura grupos hidroxílicos, carbonílicos, carboxílicos e/ou epóxidos, podendo ser também acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos. Muitas outras modificações estruturais ainda são possíveis, permitindo a obtenção de uma diversidade de compostos (BRITTON, LIAAEN-JENSEN e PFANDER, 1995).

Pigmentos das classes dos carotenóides, assim como os da classe dos flavonóides, têm sua degradação oxidativa acelerada pela luz, temperatura e/ou pH extremo na presença de oxigênio (SANTOS *et al.*, 2011). Os carotenoides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais estão na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 - Alguns carotenoides encontrados na natureza.

Carotenoide	Fonte
α-caroteno	Cenoura, caraguatá
β-caroteno	Cenoura, caraguatá, manga
Luteína	Gema de ovo
Criptoxantina	Milho amarelo, páprica
Zeaxantina	Gema de ovo, milho
Crocina	Açafrão
Bixina	Urucum
Capsantina	Pimenta vermelha
Capsorubina	Páprica
5,6-monoepoxi-β-caroteno	Caraguatá
5,6-diepoxi-β-caroteno	Caraguatá
Violaxantina	Amor perfeito
Licopeno	Tomate, melancia

Fonte: (BOBBIO e BOBBIO, 1992; FONTANA *et al.*, 2000).

O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (MALDONADE, 2003).

Aparentemente os carotenoides de cadeia curta, apo- ou diapocarotenoides, são formados por degradação oxidativa dos carotenoides com quarenta carbonos, embora nenhuma evidência detalhada tenha sido relatada em relação à biossíntese de bixina (MERCADANTE e PFANDER, 2001).

O mecanismo da biossíntese de bixina permanece não resolvido. Com base de semelhança estrutural entre o colorante bixina e crocetina (açafraão), a reação poderia implicar uma dioxigenase, um aldeído desidrogenase, e um metiltransferase em uma série de reações sequência iniciada no licopeno (Figura 3.3) (BOUVIER, DOGBO e CAMARA, 2003).

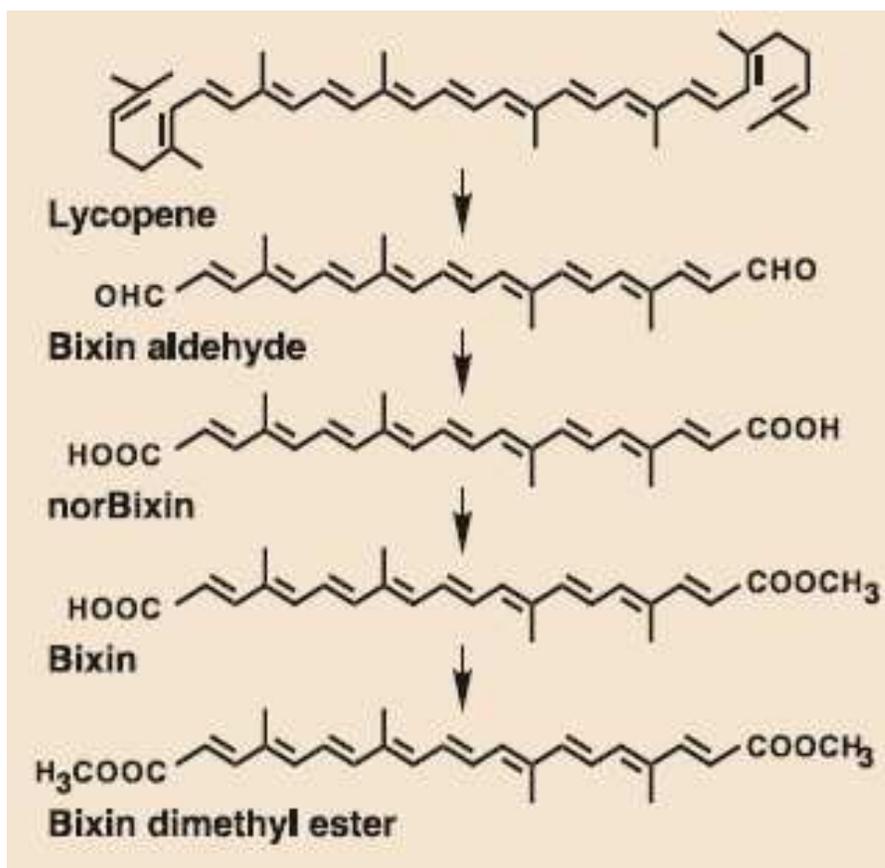


Figura 3. 3 - Caminho proposto para a biossíntese da bixina mostrando etapas a partir da catalisação do licopeno (BOUVIER, DOGBO e CAMARA, 2003).

Apesar de a bixina ser o único componente da *Bixa orellana* L. que apresenta importância comercial, a planta possui vários compostos exóticos, como o geranilgeraniol. Alguns destes compostos não são encontrados em nenhuma outra planta, e muitos deles foram descobertos há menos de dez anos (SILVA, 2007).

3.3 – Extração

Extração é uma operação unitária cujo principal objetivo é a separação de certos componentes de suas matrizes, ou de misturas. Essa operação pode ocorrer por métodos físicos, químicos ou mecânicos.

Extração sólido-líquido ocorre com a dissolução seletiva de um ou mais solutos de uma matriz sólida por um solvente líquido. Esta operação unitária é também chamada de lixiviação, decocção ou eluição. Na verdade, a terminologia pode ser especificada para um dado tipo de extração. Por exemplo, o termo lixiviação pode ser usado quando o objetivo é obter compostos alcalinos, decocção quando o solvente é usado na temperatura de ebulição, e eluição é usado quando os sólidos solúveis estão na superfície da matriz sólida. Independentemente do nome, essa técnica é uma das operações unitárias mais utilizadas na indústria química (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

A matriz vegetal apresenta uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, tamanho, localização e a ligação com outros componentes. As características químicas do solvente e a estrutura e composição distintas de cada planta asseguram que cada sistema matriz vegetal-solvente apresente comportamento peculiar, o qual não pode ser facilmente previsto (VEGGI, CAVALCANTI e MEIRELES, 2011). O rendimento da extração de compostos de plantas é influenciado pelas condições em que o processo é realizado. A escolha do processo mais adequado depende de parâmetros como temperatura, ação mecânica (agitação) e tipo do solvente empregado (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

Existem na literatura várias metodologias de obtenção de extratos de vegetais, utilizando vários solventes, empregando ou não altas pressões e temperaturas ou até mesmo associando metodologias no intuito de obter um extrato com o perfil fitoquímico desejável, com alto rendimento e que não possua características indesejáveis como a presença de compostos co-extraídos como ceras e clorofila e a presença residual de solventes (BRAGA *et al.*, 2003).

Os procedimentos de extração comuns utilizados no isolamento de compostos orgânicos de plantas medicinais são: hidrodestilação, maceração, extração com solvente a baixa pressão (LPSE), entre outros (VEGGI, 2013).

A extração com solventes orgânicos é limitada pela necessidade de selecionar um solvente que seja compatível com o emprego do produto final. Em produtos alimentícios, o corante estará sujeito a sérias restrições técnicas, pela toxicidade potencial de resíduos de solventes neles presentes. Esse fato vem diminuindo a utilização desse processo na produção de corantes (SILVA, 2007).

De acordo com a Resolução CNNPA nº 44, os produtos autorizados que devem ser usados na elaboração e processamento de corantes são: água, açúcares, álcool etílico, amidos, cloreto de sódio, dextrina, gelatina, glicerol, óleos e gorduras comestíveis (BRASIL, 1978).

3.3.1 – Extração Assistida por Ultrassom (UAE)

As técnicas tradicionais de extração sólido-líquido, em alguns casos, demandam tempos de extração elevados e proporcionam baixa eficiência. Além do mais, os compostos de interesse a serem extraídos podem ser termolábeis, o que requer a utilização de técnicas de extração em condições mais amenas a fim de evitar a degradação.

A energia ultrassônica tem sido descrita como um eficiente modo para melhorar o desempenho em diferentes aplicações da química analítica, como extração de compostos

orgânicos e inorgânicos, homogeneização, dispersão de suspensões, dentre outras aplicações (NASCENTES *et al.*, 2001).

A melhoria da eficiência de extração de compostos orgânicos devido ao emprego de ultrassom é atribuída ao fenômeno de cavitação produzido no solvente pela passagem de ondas ultrassônicas (ROSTAGNO *et al.*, 2009).

A origem da cavitação se deve ao fato de que, durante a expansão, os gases adsorvidos no líquido ao redor da cavidade ou na interface evaporam, resultando na expansão da cavidade. Durante a etapa de compressão estes gases ou vapores não retornam completamente ao estado líquido, resultando num aumento efetivo da cavidade. Ciclos periódicos de compressão e expansão causam aumento do tamanho da cavidade, que ao atingir um tamanho crítico implode, liberando grande quantidade de energia e aumento de pressão num curto período de tempo e em pontos localizados do líquido. No momento da implosão são gerados microjatos de altíssimas velocidades (próximo de 400 km/h), que fragmentam as partículas sólidas presentes no meio, aumentando assim suas superfícies de contato (MARTINES, DAVOLOS e JÚNIOR, 2000).

A amplitude (A) mede a extensão do movimento vibratório medido a partir da posição central até uma das extremidades. Este parâmetro está diretamente associado à intensidade do ultrassom e é o parâmetro utilizado para classificar as aplicações em ultrassom de baixa intensidade (LIU- Low-Intensity Ultrasound) com menos de 1 W/cm^2 e ultrassom de alta intensidade (HIU- High-Intensity Ultrasound) com $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$. Ultrassom de alta intensidade é aplicado em altas frequências para modificar processos ou produtos através da ruptura de tecidos, enquanto que ultrassom de baixa intensidade é utilizado para monitoramento da qualidade de processos e produtos (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

Para os estudos em química, os equipamentos mais comumente utilizados para produção de ultrassom são o banho de ultrassom e a sonda ultrassônica (NASCENTES *et al.*, 2001). Os banhos são constituídos de recipientes metálicos onde os transdutores piezoelétricos se encontram fixados no fundo. Já as sondas são fixadas na extremidade de

um amplificador transdutor. Nos banhos ocorre muita dispersão de energia ultrassônica devido às múltiplas reflexões nas paredes metálicas (KORN, PEREIRA e BORGES, 2005).

3.3.2 – Extração com fluidos pressurizados

Os fluidos supercríticos caracterizam-se por a sua temperatura e pressão serem superiores aos correspondentes valores críticos. Acima do ponto crítico, deixa de haver tensão superficial e separação entre as fases líquida e gasosa em equilíbrio, formando-se uma única fase supercrítica, cujas propriedades são intermediárias daqueles dois estados. Abaixo do ponto crítico o fluido pode existir como um líquido ou como um gás (SHIBATA e SANDLER, 1989).

Um dos fluidos supercríticos mais usados na indústria e na pesquisa é o dióxido de carbono (CO₂), que possui temperatura crítica (T_c) de 304,2 K e pressão crítica (P_c) de 7,38 MPa. Uma vez no estado supercrítico, este fluido, assim como qualquer fluido supercrítico em geral, apresenta propriedades intermediárias entre gás e líquido (BRUNNER, 2005). A Tabela 3.2 registra a pressão e temperatura críticas de alguns fluidos com interesse em processos de extração.

Tabela 3. 2 - Propiedades críticas de alguns fluidos com interesse em extração (MENDES *et al.*, 2003; BRUNNER, 2005).

Fluido	T_c (°C)	P_c (bar)
Etileno	9,4	50,4
Dióxido de carbono	31,1	73,8
Etano	32,4	48,8
Óxido nitroso	36,6	72,4
Propano	96,8	42,5
Água	374,4	22,06

A densidade se aproxima da de um líquido, enquanto a viscosidade é próxima da de um gás normal e a difusividade é cerca de duas vezes maior em magnitude do que a de um líquido característico (BRUNNER, 2005).

O poder de solvatação de um solvente aumenta não somente a solubilidade de certo produto, como o número de compostos solubilizáveis. Os aromas e óleos essenciais são extraídos utilizando o solvente em condições próximas ao seu ponto crítico, enquanto que oleoresinas de especiarias e óleos vegetais são extraídas em condições de altas pressões, acima do ponto crítico (BROGLE, 1982).

A extração com fluido supercrítico (SFE) aplicada à transformação de produtos naturais, tais como os pigmentos naturais, aromas, e assim por diante tem recebido muita atenção já há duas décadas. Nos países da América do Sul, ele foi utilizado em diversas aplicações, principalmente devido à rica biodiversidade desses países (ROSA e MEIRELES, 2005).

Na Figura 3.4 observa-se o comportamento de uma substância pura na mudança de fase. Para temperaturas menores que a temperatura crítica (isotermas T_1 e T_2) ocorre variação do volume específico durante a mudança de fase. Para temperaturas maiores que a temperatura crítica (isotermas T_4 e T_5) não se verifica variação brusca nas propriedades do fluido. Na temperatura crítica (T_3) e em temperaturas superiores a ela, o fluido recebe a classificação de supercrítico quando estiver submetido a uma pressão superior à pressão crítica (P_c).

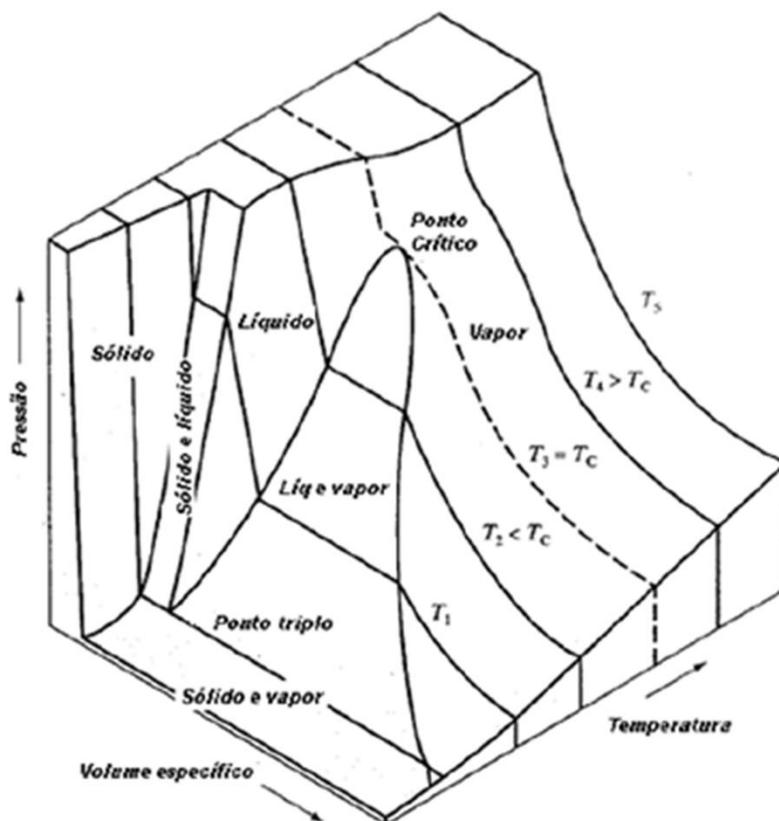


Figura 3.4 - Diagrama de equilíbrio de substância pura (adaptado de SANDLER, 2006)

3.3.3 – Extração com líquidos pressurizados

Extração com líquido pressurizado (PLE) ou extração acelerada com solvente (ASE) é um processo automatizado de extração de compostos orgânicos que pode ser aplicado a uma variedade de amostras sólidas e semisólidas. A PLE difere de um processo tradicional de extração porque utiliza solvente em temperatura e pressão elevadas às quais são aplicadas à uma quantidade de amostra conhecida inserida na célula de extração (ABAD, 2006).

O método de extração com líquidos pressurizados emprega menor volume de solvente que as extrações convencionais (Soxhlet, etc.) e é mais rápido, a extração varia entre 10 e 20 minutos (SANTOS *et al.*, 2011).

Um fluido pressurizado e aquecido a pressões e temperaturas abaixo das críticas pode existir como um líquido ou como um vapor. No caso de o fluido ser etanol ou água, por exemplo, a pressões menores que 20 MPa e temperaturas menores que 200 °C, este fluido se mantém no estado líquido, apesar da temperatura estar acima da sua temperatura de ebulição à pressão atmosférica. A utilização destes fluidos nestas condições em processos extrativos permite uma melhora da solubilidade dos compostos a serem extraídos, bem como uma aceleração da cinética de dessorção destes compostos da matriz vegetal (RICHTER *et al.*, 1997).

3.3.1 – Extração de corantes do urucum

De fato, a maioria dos carotenoides, e não apenas bixina, é suscetível à isomerização e oxidação devido à sua natureza altamente insaturada. Essas reações podem facilmente ocorrer durante a extração ou a análise de bixina. Para evitar a interferência na estrutura durante as análises, algumas medidas preventivas, como a redução do tempo de realização da análise, contato com oxigênio, proteção da luz, controle de temperatura, e a utilização de solventes de alta pureza são necessárias. Por outro lado, o método de extração do corante tem que ser muito bem documentado para estabelecer especificação de segurança (BITTENCOURT *et al.*, 2005).

Perda ou alteração na cor durante algum processo de extração ou processamento do Urucum pode ser indício de ocorrência de degradação ou modificação estrutural da bixina.

Os métodos de extração utilizados para a produção de colorantes de Urucum a partir da semente podem produzir bixina ou, por meio da hidrólise aquosa, a extração simultânea da norbixina. Talvez o fato que torna o Urucum uma das matérias-primas mais interessantes para a extração de corantes seja a possibilidade de se obter, do mesmo tipo de semente, corantes solúveis em água e corantes solúveis em óleo, alterando apenas o solvente de extração (LIMA *et al.*, 2001). Os métodos mais utilizados para extrair o pigmento das sementes são a extração alcalina (sal da norbixina), a extração em óleo (bixina) e a extração com solvente, obtendo-se produto com maior grau de pureza. Tais corantes diferem entre si

quanto à solubilidade e pigmentação (PRENTICE-HERNANDEZ, RUSIG e CARVALHO, 1992).

Foi avaliada a eficiência de distintos sistemas solventes na extração de pigmentos da semente de Urucum, e também as características dos corantes obtidos em cada processo (SILVA, AMARAL e REBOUÇAS, 2010). Os resultados da eficiência das extrações são encontrados estão na Tabela 3.3.

Tabela 3. 3 - Teores médios de bixina nas sementes esgotadas após extração com os diferentes solventes extratores e eficiência das extrações (SILVA, AMARAL e REBOUÇAS, 2010).

Solvente extrator	Teor de bixina* (g.100g ⁻¹)	Eficiência (%)
KOH 0,6 %	0,35 ± 0,01 b	77,14 b
NH ₄ OH 2 %	0,34 ± 0,03 b	79,41 b
NH ₄ OH 2 % em etanol	0,23 ± 0,02 c	84,00 a
Etanol	1,05 ± 0,03 a	60,00 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Média ± desvio-padrão.

Póvoa (1992), ao utilizar KOH 0,5%, 98% dos pigmentos da semente de Urucum foram extraídos. A maior retenção de pigmentos na semente ocorreu quando água foi utilizada como solvente, correspondendo a 4,3 vezes o teor encontrado nas sementes extraídas com o KOH 0,5%. Contrastando com estes resultados Silva, Amaral e Rebouças (2010), obtiveram extração de aproximadamente 77% dos pigmentos presentes nas sementes usando KOH 0,6%.

A grande demanda dos extratos de Urucum com características de elevada qualidade tem acentuado as deficiências dos processos comumente usados para produzir os corantes, incluindo riscos de degradação térmica dos extratos e de oxidação dos pigmentos. Também, as quantidades relativas de bixina e seus produtos de isomerização e de degradação em preparações comerciais de Urucum variam dentro de amplos limites, dependendo das condições de processamento (PRENTICE-HERNANDEZ, RUSIG e CARVALHO, 1992).

Ainda, de acordo com o solvente e com o pH da extração utilizados, podem coexistir no meio as várias formas dos pigmentos (SILVA, 2007).

Apesar de a extração dos colorantes das sementes de Urucum utilizando solventes orgânicos ser a mais eficiente em termos do teor de pigmentos extraídos e da pureza do extrato, não é muito utilizada em escala industrial, devido à possível presença de resíduos de solventes no produto processado (SILVA, 2007).

Um estudo foi realizado por Nobre *et al.* (2006), no qual o objetivo foi obter bixina através de extração supercrítica de Urucum. O solvente utilizado foi CO₂ e CO₂ + Etanol como cossolvente, em duas vazões para avaliar o efeito da temperatura, pressão e fluxo de solvente no rendimento da extração. Os autores observaram que o rendimento em pigmento aumentou com a temperatura em uma mesma pressão e também com a pressão em uma mesma temperatura para uma mesma vazão de solvente. Concluíram também que, quando o fluxo de solvente aumentou, o rendimento diminuiu possivelmente por causa da resistência a transferência de massa dentro do pericarpo da semente. Foi realizada uma modelagem capaz de representar adequadamente a extração supercrítica dos pigmentos a partir das sementes de Urucum. Quando somente o CO₂ foi usado, um coeficiente de transferência de massa interno foi determinado. Por outro lado, quando o etanol foi usado como cossolvente, a extração foi controlada por uma película de solvente. Nesse caso, o coeficiente de massa externo, que aumentou com o fluxo, foi calculado. Rendimento alto foi obtido com cossolvente que não sofreu mudanças com a vazão e aumentou com o aumento da pressão e da temperatura. O rendimento em pigmentos não aumentou com a moagem das sementes, possivelmente devido à localização desses compostos na superfície da semente.

Silva *et al.* (2008) determinaram a solubilidade em CO₂ supercrítico de uma solução com alta pureza, 93 % de bixina diluída em diclorometano e também da bixina presente no óleo das sementes. Eles determinaram isotermas de rendimento global para a bixina das sementes de Urucum e obtiveram rendimento aproximadamente dez vezes maior que o da bixina pura. A mesma magnitude de solubilidade entre a bixina das sementes e a bixina pura foi obtida por (DEGNAN, ELBE e HARTEL, 1991). Este comportamento indicou que a bixina têm baixa solubilidade em CO₂ supercrítico e que o óleo das sementes agiu como

cossolvente na extração da bixina das sementes. Foi observado também a interferência da presença dos sólidos insolúveis para o rendimento na extração de bixina. Esferas de vidro foram impregnadas com o óleo e bixina obtidos das sementes em extrações anteriores, percebeu-se que a matriz sólida teve pouquíssimo efeito no rendimento da bixina. Os autores concluíram que a solubilidade da bixina (lipossolúvel) foi sensivelmente melhorada com a presença de óleo nessas sementes.

Até recentemente, estudos de SFE de sementes de Urucum apenas com foco na obtenção de bixina eram encontrados na literatura (DEGNAN, ELBE e HARTEL, 1991; SILVA *et al.*, 2008; CHAO *et al.*, 1991).

Albuquerque e Meireles (2012) realizaram um estudo de SFE de óleo de sementes inteiras de Urucum, usando CO₂ como solvente, e obtiveram as condições de temperatura e pressão otimizadas de extração em relação ao óleo e à bixina 60°C/40 MPa. Embora o rendimento de bixina tenha sido muito baixo, aproximadamente 0,1 %, nesta condição, o processo obteve sementes desengorduradas como um pré-tratamento para a produção de bixina em resposta à demanda da indústria de corante a partir do Urucum, por sementes com menor teor de óleo possível. Ainda neste estudo, os autores observaram que é possível obter um extrato mais concentrado em tocotrienóis, antioxidantes naturais, em 40 °C/20 Mpa, com rendimento de 14,6 ± 0,4 %, mostrando a versatilidade do processo em obter vários produtos apenas modificações da T e P.

Não há estudos sobre extração de colorantes a partir de sementes de Urucum desengorduradas. Desta forma é importante o estudo da viabilidade técnica (e econômica) deste processo usando solventes GRAS para obter além de produtos livres de solvente, um resíduo que poderá ser reaproveitado em alimentação humana (o resíduo da semente de urucum é rico em proteína, e que representa mais de 95% da matéria-prima processada, e normalmente é utilizado em rações animais), e desta forma aumentar o valor agregado ao produto.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

A maior parte da pesquisa foi desenvolvida no LASEFI (Laboratório de Tecnologia Supercrítica, Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais – DEA/Unicamp). A Figura 4.1 ilustra as etapas realizadas.

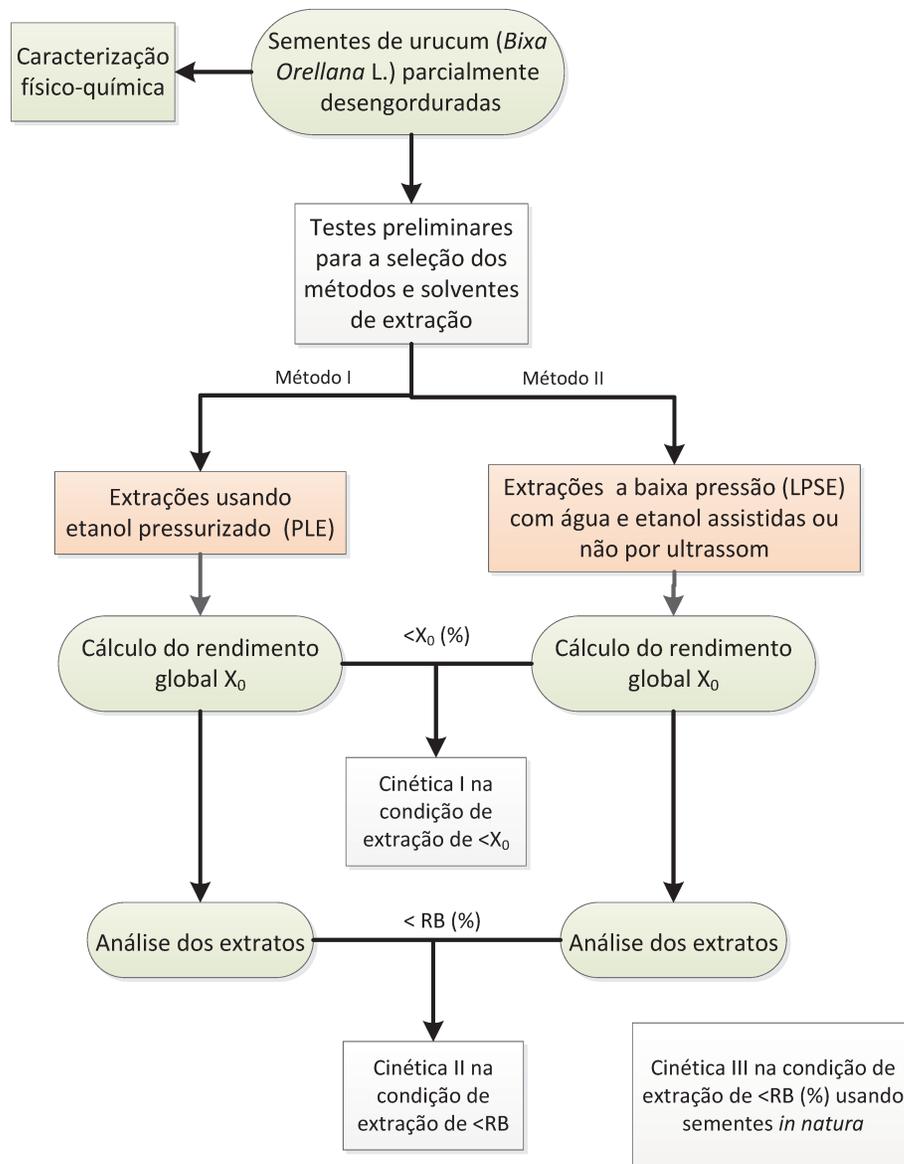


Figura 4. 1 - Etapas experimentais realizadas.

4.1 – Matéria-prima

4.1.1 - Origem

Neste trabalho foram utilizadas sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.), variedade Piave Vermelha (safra 2011) previamente desengorduradas em trabalho desenvolvido no Lasefi (Laboratório de Separações Físicas/DEA/UNICAMP) por Albuquerque (2013). Essas sementes foram utilizadas na obtenção de óleo rico em tocotrienóis, a 40 °C e 20 Mpa por CO₂ supercrítico, empregando a unidade comercial de SFE (Thar Technologies, SFE-2 x 5LF-2-FMC, Pittsburgh, EUA).

4.1.2 – Preparo e identificação da amostra

As sementes já foram beneficiadas anteriormente (ainda no campo) e, por isso, não foram necessárias operações de pré-tratamento ao processo de extração, como a secagem. Além disso, dados da literatura mostraram que a moagem das sementes não aumenta o rendimento do processo SFE (CHAO *et al.*, 1991; NOBRE *et al.*, 2006).

4.1.2.1 – Identificação

Neste estudo foram utilizados dois lotes distintos de sementes de Urucum. As sementes de Urucum parcialmente desengorduradas são da safra de 2011, e este lote foi identificado como UM-D. Sementes de Urucum *in natura* da safra 2012 foram utilizadas nos experimentos cinéticos como meio comparativo dos métodos estudados. Este lote foi identificado como UM-IN.

4.1.2.2 – Moagem e armazenamento

Somente para a realização das análises de composição centesimal, as amostras foram moídas em moinho de hastes (Tecnal, modelo TE- 631, Piracicaba, São Paulo, Brasil). As amostras moídas e também as sementes inteiras (parcialmente desengorduradas e *in natura*) foram acondicionadas em sacos de polietileno, identificadas e armazenadas em freezer doméstico (Metalfrio, DA420, São Paulo, São Paulo) em temperatura de -10 °C, até realização das análises e extrações.

4.1.3 – Caracterização física

4.1.3.1 - Diâmetro das sementes

O diâmetro médio (d_p) das sementes foi determinado seguindo metodologia adotada por (SILVA *et al.*, 2008). Foram retiradas duas amostras de sementes de cada lote para determinação do diâmetro médio. Vinte sementes de cada lote foram escolhidas aleatoriamente, e para cada semente foi medido o comprimento (d_1), largura (d_2) e espessura (d_3), usando paquímetro universal (0,05 mm de resolução). O diâmetro de cada semente foi calculado como sendo a média geométrica destas três medidas conforme a Equação 4.1.

$$d_p = (d_1 \times d_2 \times d_3)^{1/3} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

4.1.3.2 - Densidade aparente, densidade real e porosidade do leito

A determinação da densidade real (ρ_r) das sementes foi determinada seguindo metodologia de picnometria com gás hélio, utilizando picnômetro gasoso (Quantachrome,

Ultrapyc™ 1200e, Boynton Beach, Florida, EUA) na Central Analítica do Instituto de Química / Unicamp. A densidade aparente (ρ_a) foi calculada dividindo-se a massa de matéria prima utilizada para empacotar a célula de extração pelo volume ocupado por ela nesta célula.

A porosidade do leito com as partículas (ε) foi determinada por cálculo através da densidade aparente e da densidade real das partículas usando a Equação 4.2 (CHAO *et al.*, 1991).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

4.1.3.3 - Análise de microscopia eletrônica de varredura das sementes de Urucum

Foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) na Faculdade de Engenharia Química FEQ/UNICAMP. O objetivo foi analisar a superfície das sementes, avaliando o efeito das condições de extração utilizadas neste estudo na estrutura do pericarpo das sementes, onde se localiza a maior parte do carotenoide de interesse, a bixina.

As sementes analisadas foram: *in natura* (IN), desengorduradas (SFE), após a extração PLE/etanol/60 °C, após a extração LPSE-C/etanol/60°C, e após as cinéticas I (desengorduradas/LPSE/50 °C/etanol), II (desengorduradas/LPSE/60 °C/etanol) e III (*in natura*/LPSE/60 °C).

O recobrimento metálico foi feito em metalizador (Sputter Coater POLARON SC7620, VG Microtech, Uckfield, Inglaterra), com espessura de 92 Å, usando ouro como metal e argônio como gás inerte. Para obtenção das micrografias (Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, Leo 440i, 6070, LEO Electron Microscopy/Oxford, Cambridge, Inglaterra) utilizou-se tensão de aceleração igual a 20 kV e corrente do feixe igual a 100 pA.

4.1.4 – Caracterização química

A composição centesimal das sementes de UM-IN e UM-D foi determinada no Laboratório de Análises de Alimentos DCA/FEA/UNICAMP: proteína (GALVANI e GAERTNER, 2006), e no Laboratório de Tecnologia Supercrítica, Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais – LASEFI/DEA/UNICAMP: umidade e cinzas seguindo metodologia da (AOAC, 1997) e lipídios (LESS, 1979).

4.1.4.1 - Análise da composição centesimal

A umidade foi determinada pesando-se em balança analítica (Sartorius analytic A200S, $\pm 0,0001$ g, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha) 2 g de amostra em placa de petri previamente tarada e posteriormente colocando-a em estufa (Tencal, modelo TE-395-1, Piracicaba, São Paulo) a 105 °C.

A massa foi medida até valor constante, a umidade em base seca das sementes de Urucum foi calculada de acordo com a Equação 4.3:

$$U (\%) = \frac{W_u (g) - W_s (g)}{W_s (g)} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Onde: W_u e W_s são as massas úmidas e secas, respectivamente.

A determinação de resíduo mineral fixo (cinzas) foi realizada pela incineração em mufla (QUIMIS, Diadema, São Paulo, Brasil) a 550 °C. As proteínas foram determinadas pelo método micro-Kjeldahl utilizando fator de 6,25 para conversão do nitrogênio em proteína.

Os lipídios totais foram determinados utilizando éter de petróleo PA (Êxodo científica, lote: EP5904RA, Hortolândia, São Paulo, Brasil) como solvente sob-refluxo em aparelho de Soxhlet por 6 h. Os balões volumétricos de 500 mL contendo o óleo e o solvente foram colocados em rotaevaporador (Marconi, modelo MA120/TH, Piracicaba,

São Paulo, Brasil) a vácuo (Marconi, modelo MA057/1, Piracicaba, São Paulo, Brasil) até a evaporação total do solvente. Em seguida, as amostras foram colocadas em estufa (Tencal, modelo TE-395-1, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 105 °C durante duas horas. O extrato etéreo foi pesado em balança semi-analítica (Sartorius analytic A200S, ±0,0001 g, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha) e o teor de óleo calculado pela relação entre massa do óleo e massa das sementes. Os carboidratos e as fibras foram determinados por diferença.

4.1.4.2 – Carotenoides totais expressos em bixina (%)

A metodologia para determinação em extratos de carotenoides totais expressos em bixina descrita pela FAO – *Food And Agriculture Organization*, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2006) foi adaptada conforme ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2012.

Pesou-se aproximadamente 0,0050 g de extrato de Urucum em balança analítica (Sartorius analytic A200S, ± 0,0001, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha) e diluiu-se com acetona em balão volumétrico de 25 mL (V_1). Uma alíquota de 1 mL (v_a) foi pipetada em balão volumétrico de 10 mL (V_2) e completado com acetona PA ACS (Êxodo científica, lote: A8979RA, Hortolândia, São Paulo, Brasil). Em seguida esta diluição foi inserida em cubeta para leitura da absorbância, lida em duplicata, no comprimento de onda de 487 nm, em espectrofotômetro (HACH, DR/4000 U, Lovelend, Colorado, EUA).

Ensaio preliminares de determinação de teor de bixina total foram realizados com objetivo de testar a concentração do extrato que resultasse em absorbância entre 0,2 e 0,8. O teor de bixina total foi obtido aplicando a lei de Lambert-Beer através da Equação 4.4.

$$Bixina (\%) = \frac{A \times 10^4}{E_{1\%}^{1\text{cm}}} \times \frac{V_1 \times V_2}{m_{EXT}[\mu g] \times v_a} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Onde A é a absorvância no comprimento de onda adotado; $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ é a absorvância específica (FAO, 2006); V_1 e V_2 são os volumes das diluições. v_a é o volume da alíquota; e m_{EXT} é a massa de extrato.

A mesma metodologia (Eq. 4.4) foi usada para quantificar carotenoides totais expressos em bixina nas sementes (UM-D e UM-IN) adaptando o método descrito anteriormente, no qual as sementes foram lixiviadas com acetona até não se observar mais a presença do corante, e em seguida foi lida a absorvância dessa solução, considerando a massa de extrato como sendo a massa de semente utilizada (CHISTÉ, BENASSI e MERCADANTE, 2011; ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2012).

4.2 – Extrações preliminares

Foram realizados testes preliminares de extração em condições distintas de temperatura e pressão, com o objetivo de avaliar a eficiência de alguns solventes pré-selecionados. Os testes tinham o intuito de avaliar condições de extração de bixina das sementes desengorduradas e observar os efeitos da temperatura, pressão e solvente, e a partir dos resultados obtidos selecionar dois métodos com melhor eficiência para serem estudados usando análise estatística.

Inicialmente escolheu-se a água por ser um solvente GRAS, além de ser economicamente viável. Verificou-se que ao se usar água a pressão tinha efeito negativo nos rendimentos, optou-se então por utilizar outros solventes já relatados na literatura em extrações de bixina de Urucum, que foram: etanol (PA, Dinâmica, 52990, Diadema, SP, Brazil), acetato de etila (Merck KGaA, K40235423, Darmstadt, Germany) e água + NaOH (pHs 10 e 14). As condições de extração testadas por PLE foram temperatura de 30, 60, 80 e 120 °C; pressão de 2, 4 e 20 MPa em sistema semi-contínuo com vazão aproximada de 1,14, 1,31, e 1,45 g/min, para o etanol, acetato de etila e soluções de hidróxido de sódio, respectivamente.

Simultaneamente às PLEs foram realizadas LPSEs com agitação periódica (a cada 1 minuto). O tempo de extração e a razão S/F para ambos os métodos foram aproximadamente 20 minutos e S/F = 5,9, 6,8 e 7,5 (g)/(g) para o etanol, acetato de etila e soluções de hidróxido de sódio, respectivamente. As extrações por LPSE foram realizadas em batelada (as sementes e o solvente foram colocados em béqueres) em condições ambientes de temperatura e pressão (CATP), aproximadamente 0,1 MPa e 25 °C.

Analisando os resultados obtidos nos testes preliminares, foram selecionado dois métodos de extração de bixina a partir das sementes desengorduradas: PLE usando etanol e LPSE usando água ou etanol, assistida ou não por ultrassom. O uso do ultrassom foi selecionado como uma opção de extração pelo efeito de cavitação causado na superfície, considerando que a bixina se encontra no pericarpo da semente.

4.3 - Processos de extração com líquido pressurizado (PLE)

4.3.1 – Equipamento: Unidade PLE

A extração com líquido pressurizado foi realizada com o equipamento ilustrado na Figura 4.2. O solvente é bombeado por uma bomba tipo HPLC (Thermoseparation Products, Modelo 3200 ConstaMetric P/F, Fremon, EUA), para o interior da célula de extração (Thar Designs, CL 1373, Pittsburg, USA) de 5 cm³, 1,96 cm de diâmetro interno e 2,26 cm de altura (distância entre os filtros) que é acoplada em uma camisa de aquecimento elétrico, que mantém a célula na temperatura de extração até que a pressão requerida seja alcançada. Todas as ligações dentro do sistema são feitas de tubos de aço inoxidável (1/16 "e 1/8").

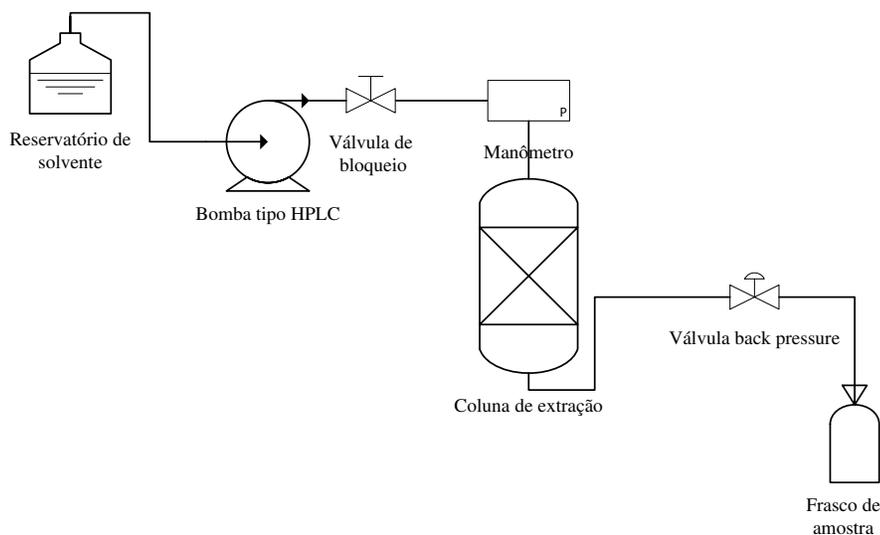


Figura 4.2 – Equipamento de extração com líquido pressurizado (SANTOS, ALBUQUERQUE e MEIRELES, 2011).

4.3.2 – Procedimento de extração

Para cada experimento, a célula de extração, Figura 4.3 (a) e (b), foi empacotada com aproximadamente 3 g de sementes de Urucum (UM-D), inteiras e parcialmente desengorduradas. Para prevenir o entupimento das linhas de entrada do solvente e de saída do extrato, lã de vidro foi colocada nas extremidades da célula, antecedendo os filtros. A célula de extração após ser empacotada com a amostra, foi acoplada à camisa de aquecimento que já se encontrava na temperatura de extração. Durante 5 minutos, a amostra foi aquecida para assegurar que a célula de extração estivesse à temperatura de extração durante os procedimentos de enchimento e de pressurização inicial do sistema com o solvente. Nestas condições a válvula de bloqueio foi aberta e parte do solvente foi bombeada para o interior da célula, elevando a pressão até a P de operação, iniciando-se um período de extração estática de 10 minutos. Após o período estático as válvulas de bloqueio e *back pressure* foram abertas e o solvente foi novamente bombeado para a célula. Neste período a pressão foi controlada pela válvula *back pressure*.

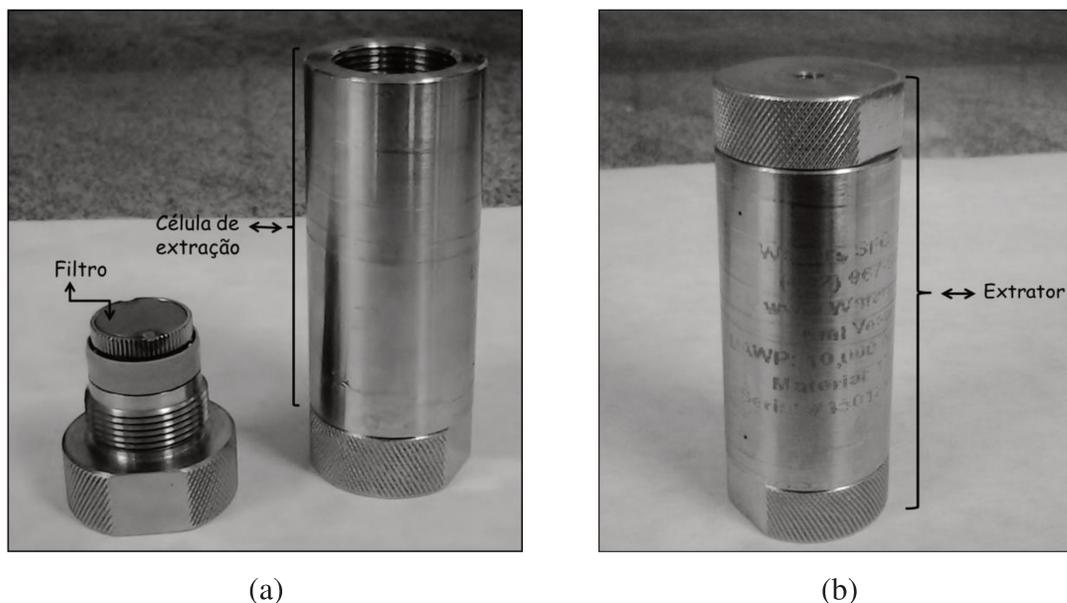


Figura 4.3 – (a) Célula de extração aberta. (b) Célula de extração fechada

O extrato foi coletado em frascos de vidro, previamente tarados, até um volume pré-definido. Os extratos alcoólicos (obtidos nos processos de extração com etanol) foram evaporados em rotaevaporador (Marconi, modelo MA120/TH, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a vácuo (Marconi, modelo MA057/1, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e banho termostático a temperatura de 40 °C, onde o solvente foi retirado. Os extratos livres de solvente foram armazenados a -10 °C até a realização das análises.

4.3.3 – Planejamento experimental PLE

Estudaram-se as variáveis: S/F (g/g), temperatura e pressão de operação. Avaliou-se a influência destes parâmetros para o rendimento global X_0 (%) e o rendimento de extração de bixina RB (%). Foi utilizado planejamento experimental fatorial completo (2×3×3) totalmente aleatorizado sem repetições (Tabela 4.1).

Tabela 4. 1 - Planejamento experimental dos ensaios de extração por PLE.

Extração	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)
S/F = 4		
1	2	40
2	6	40
3	10	40
4	2	50
5	6	50
6	10	50
7	2	60
8	6	60
9	10	60
S/F = 8		
10	2	40
11	6	40
12	10	40
13	2	50
14	6	50
15	10	50
16	2	60
17	6	60
18	10	60

4.4 – Extrações em baixa pressão assistidas ou não por ultrassom

4.4.1 – Equipamento: banho ultrassônico a baixa pressão

O equipamento de extração por percolação a baixa pressão assistida por ultrassom (Figura 4.4) consiste em um recipiente no qual o solvente está acondicionado e é bombeado através de uma bomba peristáltica (Cole-Parmer Instrument Co, número catálogo 7554-30, Chicago, IL, EUA), para dentro da célula de extração que se encontra acondicionada em um banho ultrassônico (frequência 40 kHz, potência 135 W) (Unique, modelo Max Clean 1400, Indaiatuba, SP, Brasil), que é mantido na temperatura de extração por um banho termostático (Marconi, modelo MA 127/BO, Piracicaba, SP, Brasil). A célula de extração é uma coluna de vidro (1,63 cm de diâmetro interno e 1,46 cm de comprimento) vedada por rolhas de silicone nas extremidades. Para manter as mesmas condições de extração, os

experimentos de extração sem ultrassom foram realizados no mesmo equipamento com o ultrassom desligado (VARDANEGA, 2013).

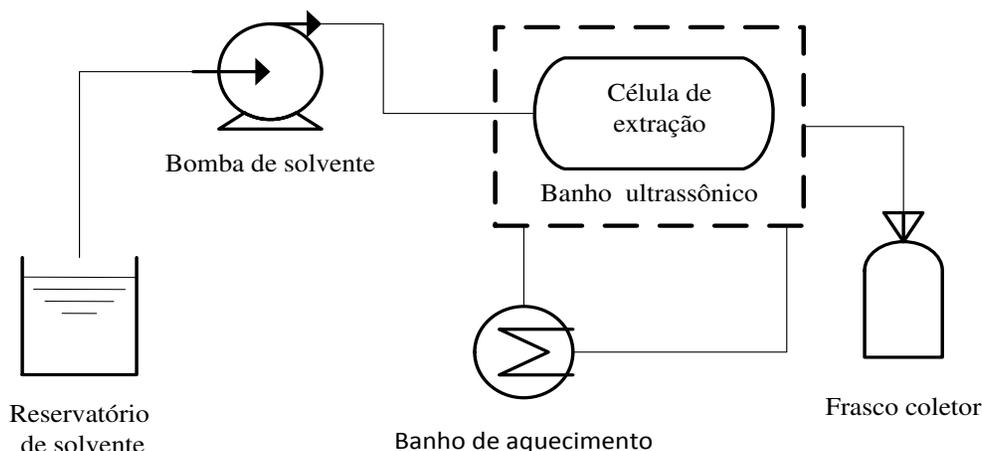


Figura 4. 4 - Equipamento de extração por percolação a baixa pressão assistido por ultrassom .

4.4.2 – Procedimento de extração

Após o empacotamento da célula de extração o solvente foi bombeado pela bomba peristáltica para dentro da célula de extração, Figura 4.5, acondicionada no banho ultrassônico, o qual foi mantido na temperatura do processo por um banho termostático. Os experimentos de extração sem ultrassom foram realizados no mesmo equipamento com o ultrassom desligado.

Os extratos alcóolicos (obtidos nos processos de extração usando etanol) foram evaporados em rota-evaporador (Marconi, modelo MA120/TH, Piracicaba, São Paulo, Brazil) a vácuo (Marconi, modelo MA057/1, Piracicaba, São Paulo, Brazil) em banho termostático a 40 °C onde o solvente foi retirado. Já os extratos aquosos (obtidos nas extrações com água) foram liofilizados (Liofilizador LIOTOP, L101, São Carlos, São Paulo, Brazil). Os extratos livres de solvente foram armazenados a -20 °C até a realização das análises.

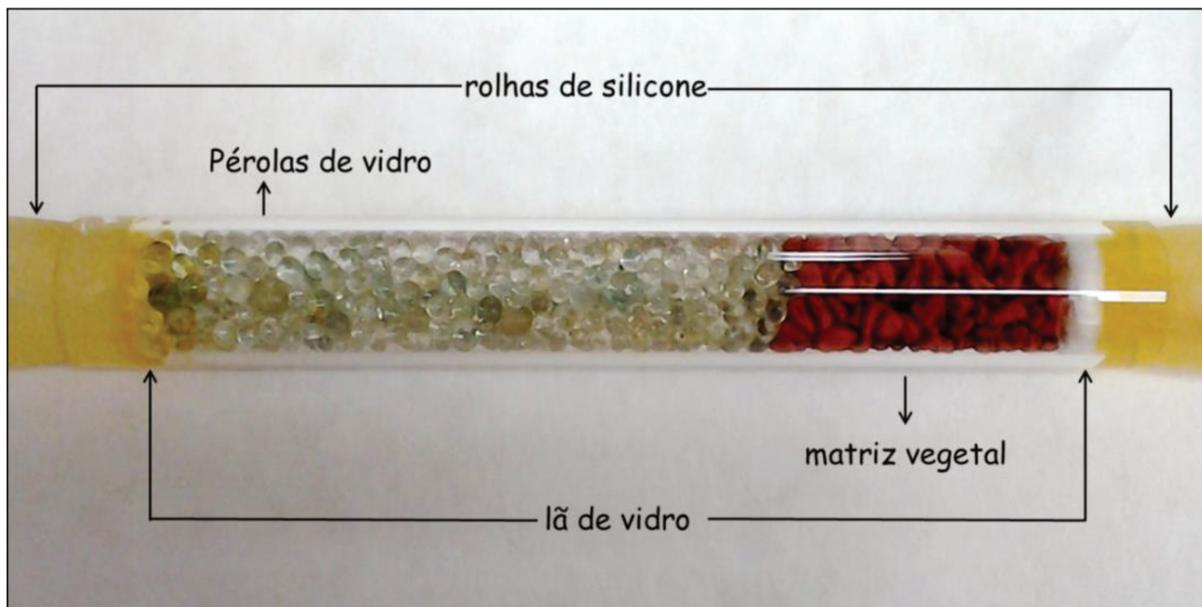


Figura 4. 5 - Leito de extração contendo o material inerte e a matriz vegetal.

4.4.3 – Planejamento experimental LPSE

O planejamento experimental foi fatorial completo ($2 \times 3 \times 3 \times 2$) totalmente aleatorizado sem repetições (Tabela 4.2).

Estudaram-se as variáveis independentes: S/F, temperatura, ultrassom e solvente. As variáveis respostas foram rendimento global X_0 (%), rendimento de extração de bixina RB (%).

Tabela 4. 2 - Planejamento experimental dos ensaios de extração por percolação a baixa pressão assistidas ou não por ultrassom.

Experimento	Solvente	Temperatura (°C)	Método de extração
S/F = 4			
1	Etanol	40	LPSE
2	Etanol	40	LPSE-C
3	Etanol	40	LPSE-P
4	Etanol	50	LPSE
5	Etanol	50	LPSE-C
6	Etanol	50	LPSE-P
7	Etanol	60	LPSE
8	Etanol	60	LPSE-C
9	Etanol	60	LPSE-P
10	Água	40	LPSE
11	Água	40	LPSE-C
12	Água	40	LPSE-P
13	Água	50	LPSE
14	Água	50	LPSE-C
15	Água	50	LPSE-P
16	Água	60	LPSE
17	Água	60	LPSE-C
18	Água	60	LPSE-P
S/F = 8			
19	Etanol	40	LPSE
20	Etanol	40	LPSE-C
21	Etanol	40	LPSE-P
22	Etanol	50	LPSE
23	Etanol	50	LPSE-C
24	Etanol	50	LPSE-P
25	Etanol	60	LPSE
26	Etanol	60	LPSE-C
27	Etanol	60	LPSE-P
28	Água	40	LPSE
29	Água	40	LPSE-C
30	Água	40	LPSE-P
31	Água	50	LPSE
32	Água	50	LPSE-C
33	Água	50	LPSE-P
34	Água	60	LPSE
35	Água	60	LPSE-C
36	Água	60	LPSE-P

4.5 – Estudo cinético de extração

Depois de selecionadas as condições operacionais de extração segundo os critérios pré-estabelecidos, X_0 (%) máximo e RB (%) máxima, os experimentos cinéticos foram realizados em duplicata. Durante o processo de extração, os frascos de coleta de extrato foram substituídos por outros limpos e previamente tarados em intervalos de tempo pré-determinados (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85, 95 min). A vazão empregada foi a mesma utilizada para a determinação do X_0 . Ao final do processo de extração, as curvas globais de extração (*OECs - Overall Extraction Curves*) foram construídas com a finalidade de determinar a quantidade de material solúvel extraído e parâmetros de processo (temperatura e pressão) em função do tempo. As curvas resultantes foram ajustadas a um spline contendo três linhas retas, que seriam os períodos CER (taxa de extração constante), o FER (queda da taxa de extração) e DC (difusão controlada), utilizando o procedimento PROC REG e PROC NLIN de pacote de *software* SAS (SAS Institute Inc., versão 9.3, Cary, EUA) de acordo com RODRIGUES *et al* (2002).

4.6 – Cálculos

4.6.1 - Determinações do rendimento global (X_0)

O estudo dos processos de extração foi realizado em diferentes condições de temperatura, pressão, solvente, relação de S/F e uso de ultrassom. O rendimento global (X_0), ao final de cada extração, foi calculado de acordo com a Equação 4.5, como a relação entre a massa total de extrato e a massa inicial de amostra, ambos em base seca.

$$X_0(\%) = \frac{m_{EXT}(g)}{m_{MP}(g)} \times 100 \quad (\text{Eq.4.5})$$

4.6.2 – Rendimento de extração de bixina RB (%)

O rendimento de extração de bixina foi calculado de acordo com a Equação. 4.6, que relaciona o rendimento global X_0 (%), bixina no extrato (%) e a % bixina na semente (%).

$$RB\% = \frac{X_0 (\%) \times \text{bixina extrato} (\%)}{\text{bixina semente} (\%)} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

4.6.3 – Análise estatística

Para os dois ensaios (PLE e LPSE) foram realizados o teste de variância (ANOVA) utilizando o Software Minitab® 16, pelo método de modelo geral de regressão linear (GLM), considerando um intervalo de confiança de 95% (p-valor $\leq 0,05$).

4.6.4 – Parâmetros cinéticos

Os parâmetros obtidos a partir da OECs ajustadas ao modelo de *spline* foram utilizados a Equação (4.7) descrita por MEIRELES (2008) para calcular a massa do extrato (M_{EXT}), ou o rendimento, num determinado tempo de extração (t):

$$M_{EXT} = (b_0 - C_1 \times b_1 - C_2 \times b_2) + (b_1 + b_2 + b_3) \times t \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Onde b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes lineares das linhas obtidas pelo ajuste, e C_1 é a intersecção da primeira linha (CER) e da segunda (FER) e C_2 é a intersecção da segunda (FER) e terceira linha (DC). C_1 e C_2 , obtidos pelo ajuste, representam a duração dos períodos (t_{CER}) e (t_{FER}), respectivamente. Para a determinação dos parâmetros cinéticos,

t_{CER} (duração do período de taxa constante de extração, [min.]); M_{CER} (taxa de transferência de massa do período CER, [g/min]); Y_{CER} (razão mássica de extrato na saída do leite, [g-ext/100g solvente]); e R_{CER} (rendimento do período da taxa constante de extração, [%]), utilizou-se o *software* SAS® 9.3 (SAS Institute Inc., version 9.2, Cary, USA), usando-se os procedimentos PROC REG e PROC NLIN conforme descrito na literatura por Rodrigues et al (2002).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização da matéria-prima

5.1.1 – Caracterização física

Os resultados das análises físicas referentes às sementes de Urucum estão expressos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Características físicas das sementes de Urucum (média \pm desvio padrão).

	Diâmetro médio (mm)	Densidade real (kg.m ⁻³)*	Densidade aparente (kg.m ⁻³)	Porosidade do leite
UM-IN	3,8 \pm 0,2	1450 \pm 0,01	650,9 \pm 7	0,55 \pm 0,0
UM-D	3,8 \pm 0,2	1400 \pm 0,01	580,0 \pm 20	0,59 \pm 0,01

*Resultados da média e estimativa do desvio padrão de 10 determinações

5.1.2 – Caracterização química

A Tabela 5.2 mostra os dados de caracterização referentes às sementes de Urucum.

Tabela 5.2 - Composição centesimal (valor [%] \pm desvio padrão) das amostras de Urucum (b.s.).

	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	Bixina
UM-IN	15,6 \pm 0,04	4,8 \pm 0,3	16,1 \pm 0,2	17,0 \pm 3	46,54	2,9 \pm 0,5
UM-D	12,8 \pm 0,7	5,8 \pm 0,2	9,7 \pm 0,0	2,7 \pm 0,01	68,85	2,4 \pm 0,2

Os valores da composição centesimal da literatura são similares, exceto para lipídios (UM-IN). Silva *et al.* (2008), usando sementes de Urucum *in natura* encontraram

aproximadamente 2,78 % de bixina, 3,14 % de lipídios, 11,3 % de umidade, 3,50 (mm) de diâmetro médio e 1220 (kg.m⁻³) de densidade real. Albuquerque e Meireles (2012), também encontraram valores semelhantes para sementes de Urucum *in natura* variedade Piave, (4,9 % ± 0,2) bixina, (12,3 % ± 0,1) de umidade, (6,2 % ± 0,1) de cinzas, (3,7 % ± 0,0) de lipídios, (12,1 % ± 0,2) de proteínas e 65,7 % de carboidrato.

5.2 – Estudos preliminares de extração

Foram realizados testes preliminares de extração com o objetivo de avaliar a eficiência de alguns solventes pré-selecionados em condições de temperatura e pressão distintas. Os experimentos não foram planejados previamente, e sim conduzidos por indução e dedução, pois tinham o intuito de confirmar ou descartar a hipótese de que a extração de bixina de sementes de Urucum desengorduradas seria possível usando somente água pressurizada, e que a condição de extração PLE favoreceria a extração.

Inicialmente escolheu-se a água como solvente por ser um solvente GRAS. O uso da água pressurizada resultou em baixos rendimentos de bixina, optou-se então por utilizar outros solventes já relatados na literatura em extrações de bixina de Urucum (etanol, acetato de etila e água + NaOH (pHs 10 e 14)). A Tabela 5.3 mostra os resultados X₀ (%) e RB (%).

Simultaneamente às PLEs foram realizadas LPSEs com agitação manual periódica (a cada 1 minuto). Os solventes, tempo de extração e S/F foram os mesmos, e o tempo de extração foi de aproximadamente 20 minutos que correspondeu a S/F = 5,9, 6,8 e 7,5 g/g para o etanol, acetato de etila e soluções de hidróxido de sódio, respectivamente. A extração por LPSE foi realizada em batelada, enquanto a extração por PLE em sistema semicontínuo com vazão aproximada de 3,4 g/min. O maior RB foi 24,02 % obtido em condições ambientes e agitação manual usando água como solvente. A água pressurizada produziu os menores resultados, o que pode ser justificado pela mudança de polaridade com o aumento da pressão.

Tabela 5.3 - Resultados dos testes preliminares de extração usando sementes de Urucum (UM-D).

Condições de extração			Rendimento global X ₀ (%.b.s.)	Bixina no extrato (%)	Rendimento de extração de bixina RB (%)
Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	Solvente			
Método: PLE					
120	20	Água	14,45	0,03	0,23
120	2	Água	13,61	0,06	0,42
80	2	Água	6,20	0,08	0,26
60	2	Água	19,62	0,1	0,92
30	2	Água	3,00	0,06	0,16
30	4	Água	3,00	0,1	0,09
80	2	Água(pH=10)	6,48	0,2	0,67
80	2	Água (pH=14)	17,90	0,05	0,47
60	2	Etanol	2,33	4,82	5,85
60	2	Acetatode etila	6,48	6,71	22,62
Método: Agitação manual					
*CATP	**LPSE	Água	3,32	13,89	24,02
CATP	LPSE	Água (pH=10)	2,61	8,95	12,17
CATP	LPSE	Água (pH=14)	15,20	0,43	3,40
CATP	LPSE	Etanol	3,61	5,83	10,94
CATP	LPSE	Acetato de etila	4,56	6,96	16,50

*CATP = Condições Ambientais de Temperatura e Pressão (Aproximadamente 25°C e 0,1 MPa); **LPSE = extrações com solvente a baixa pressão.

Usando líquidos pressurizados, o acetato de etila e o etanol em 60 °C e 2 MPa resultaram em rendimentos de RB de 22,62 e 5,85%, respectivamente, esses valores foram superiores ao rendimento obtido com água pressurizada, assim também seriam opções de solventes de extração. Por resultarem bons rendimentos de extração e serem permitidos no processamento de corantes, a água e o etanol foram escolhidos como solventes nos experimentos posteriores. A Figura 5.1 mostra alguns dos extratos obtidos nos testes preliminares.

Baseando-se nos resultados da Tabela 5.3 foram selecionados dois métodos de extração para estudo: (I) PLE usando o etanol como solvente e (II) LPSE assistida ou não por ultrassom usando água ou etanol como solvente.

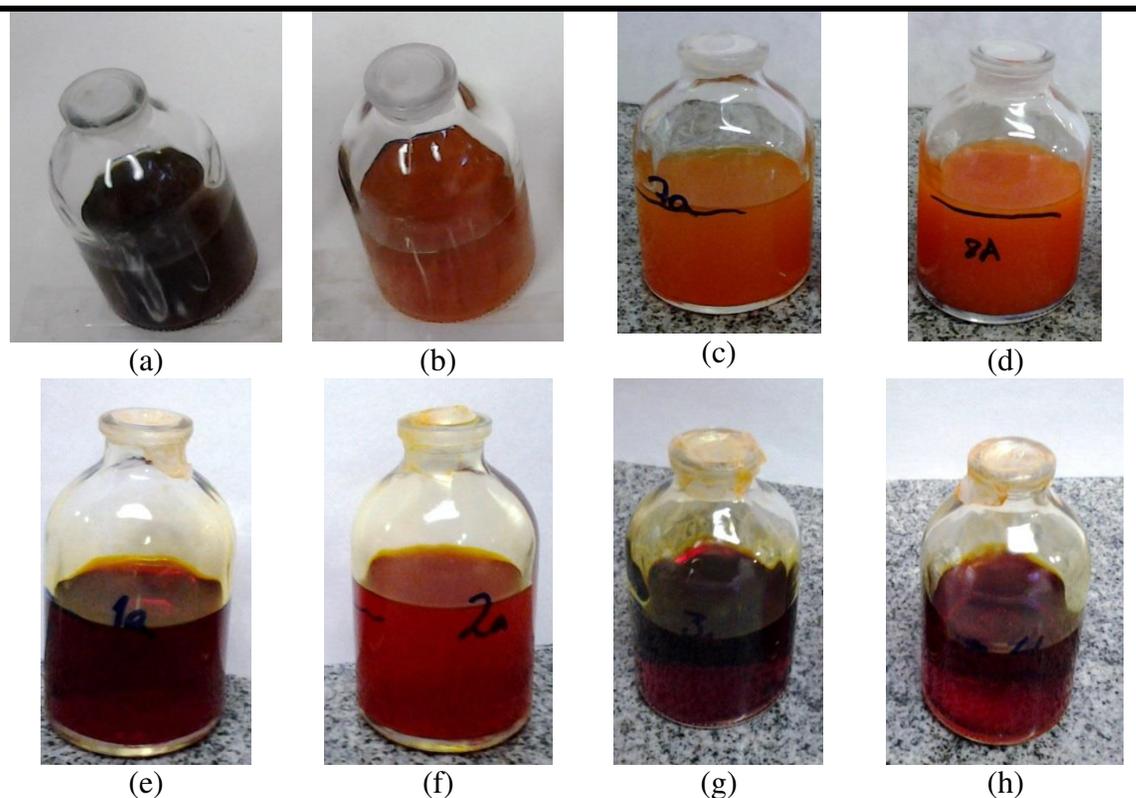


Figura 5. 1 – Extratos obtidos dos testes preliminares. (a) água/120°C/20 MPa; (b) água/120°C/2 MPa; (c) água/60°C/2 MPa; (d) água/agitação manual/condições ambientes; (e) etanol/60°C/2 MPa; (f) etanol/agitação manual/condições ambientes; (g) acetato de etila/60°C/2 MPa; (h) acetato de etila/agitação manual/condições ambientes.

A Figura 5.1 mostra os efeitos negativos da pressão, no qual é perceptível que a temperaturas e pressões altas (120 °C e 20 MPa) houve mudança na coloração dos extratos, o que indica degradação dos compostos colorantes. Então, temperaturas mais amenas e pressões menores foram usadas nos experimentos de determinação de X_0 (%).

5.3 – Processos de extração com líquido pressurizado

A Tabela 5.4 apresenta os resultados experimentais obtidos para as variáveis estudadas. Observa-se que usando etanol como solvente o rendimento global de extração (X_0) teve valores máximos e mínimos respectivamente de 7,22 % e 2,67 % (base seca -

b.s.), e os valores máximos e mínimos de rendimento de extração de bixina RB foram de 9,07 % e 1,75 % (b.s.).

Tabela 5. 4 - Rendimento global de extração X_0 (% , b.s.), quantidade de bixina no extrato (% , b.s.), rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.) pelo método PLE usando etanol.

Condições de extração				
Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	X_0 (% , b.s.)	Bixina no extrato (%)	RB (% , b.s.)
S/F = 4				
50	6	3,17	3,19	3,60
40	6	4,40	2,34	3,67
60	10	4,02	6,08	8,69
50	10	2,95	4,39	4,61
60	2	2,67	1,84	1,75
50	2	3,94	2,7	3,78
60	6	3,54	3,76	4,74
40	2	2,71	2,37	2,29
40	10	4,92	2,33	4,08
S/F = 8				
60	10	7,22	3,53	9,07
60	2	4,06	3,47	5,02
50	6	3,25	6,38	7,38
50	10	4,27	2,99	4,54
40	6	4,64	2,15	3,55
50	2	3,69	2,83	3,72
60	6	3,62	4,48	5,77
40	10	4,77	2,69	4,57
40	2	3,86	3,46	4,76

Observa-se que a 60 °C o aumento da pressão favoreceu o aumento do rendimento global (%), pois o maior valor foi obtido em 10 MPa. Esse fenômeno pode ser explicado pela mudança nas características do solvente, pois o aumento da pressão em processos extrativos permite uma ampliação da solubilidade dos compostos a serem extraídos, bem como uma aceleração da cinética de dessorção destes compostos da matriz vegetal.

As Tabelas 5.5 e 5.6 apresentam os resultados da análise de variância (ANOVA), na qual se avaliou a interferência das condições de temperatura e pressão no rendimento global de extração X_0 (% , b.s.), e no rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.).

Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global X_0 (% , b.s.) das extrações por PLE.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	<i>p</i> -valor
S/F	2,7691	1	2,7691	4,88	0,092
Pressão	4,7536	2	2,3768	4,19	0,104
Temperatura	1,7316	2	0,8658	1,53	0,322
S/F*Pressão	1,3144	2	0,6572	1,16	0,401
S/F*Temperatura	1,3424	2	0,6712	1,18	0,395
Pressão*Temperatura	4,5299	4	1,1325	2,00	0,260
Erro	2,2703	4	0,5676		
Total	18,7114	17			

Tabela 5.6 - Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.) das extrações por PLE.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	<i>p</i> -valor
S/F	6,932	1	6,932	4,05	0,114
Pressão	16,906	2	8,453	4,94	0,083
Temperatura	12,444	2	6,222	3,64	0,126
S/F*Pressão	2,218	2	1,109	0,65	0,570
S/F*Temperatura	0,283	2	0,142	0,08	0,922
Pressão*Temperatura	2,218	4	1,109	2,65	0,184
Erro	6,842	4	1,711		
Total	63,743	17			

A influência das variáveis nos valores respostas foi avaliada considerando estatisticamente significativa quando o *p*-valor foi menor ou igual a 0,05 (95% de confiança). Mas como *p*-valor maior que 0,05 e menor que 0,1 pode indicar influência nas variáveis respostas, estes também foram analisados. Em relação à X_0 não houve influência significativa ao se variar os parâmetros temperatura e pressão, no entanto, para S/F pode-se dizer que houve influência, pois o *p*-valor calculado foi de 0,092. Em relação à RB, as variáveis S/F e temperatura não resultaram em diferenças significativas, mas a pressão exerceu influência nos resultados de RB, o que foi indicado pelo *p*-valor de 0,083.

Piñeiro, Palma e Barroso (2004), realizaram extração com líquido pressurizado para extração de catequina e epicatequina em chá de folhas de uva e em sementes de uva. Os extratos obtidos foram então analisados por HPLC. Compararam diferentes tipos de métodos: extração por agitação magnética, extração assistida por ultrassom (UAE) e PLE. Nos três sistemas de extração, quatro diferentes solventes puros foram utilizados: água, metanol, etanol e acetato de etila. Extração com metanol líquido pressurizado como solvente produziu os resultados, em termos de recuperação de catequina e de epicatequina, notadamente superiores a qualquer uma das outras condições de extração testadas.

Plaza *et al.* (2012), avaliaram a extração de compostos bioativos de *Chlorella vulgaris* (carotenoides e ácidos graxos) usando PLE e UAE, em escala analítica. Os autores não encontraram grandes diferenças entre as técnicas de extração, no entanto o método PLE resultou em rendimentos mais elevados para composição de bioativos semelhantes.

5.4 - Extrações em baixa pressão assistidas ou não por ultrassom

A Tabela 5.7 apresenta os resultados experimentais obtidos para as variáveis estudadas. Observa-se que X_0 teve valores máximos e mínimos respectivamente de 13,06 % e 0,30 % (b.s.), e os valores máximos e mínimos de RB foram de 31,62 % e 0,2 % (b.s.). A análise da influência dos parâmetros estudados sobre o X_0 e RB nos procedimentos com LPSE estão na Tabela 5.8 e 5.9.

O efeito das variáveis S/F e método não resultaram em mudanças significativas nos valores de X_0 . Entretanto, as variáveis: temperatura, solvente e as interações temperatura*solvente e temperatura*S/F, exerceram influências significativas, de acordo com o teste de variância a um nível de 95 % de confiança.

Para RB somente a variação no tipo de solvente resultou em diferença significativa (95 % de confiança); as demais variáveis não exerceram influência nos resultados de RB.

Tabela 5.7 - Rendimento global de extração X_0 (% , b.s.), quantidade de bixina no extrato (% , b.s.), rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.) pelo método LPSE, usando água ou etanol.

.Condição de extração		Rendimento global (%, b.s.)	Bixina no extrato (%)	Rendimento de extração de bixina (%)
Temperatura (°C)	Método			
Solvente: Água; S/F = 4				
60	LPSE-C	7,97	1,93	5,48
40	LPSE-P	0,77	4,32	1,19
60	LPSE	0,70	0,8	0,20
60	LPSE-P	1,36	1,65	0,80
40	LPSE	1,30	5,02	2,31
50	LPSE-C	2,62	1,57	1,46
50	LPSE-P	7,24	1,09	2,81
50	LPSE	8,44	1,08	3,24
40	LPSE-C	7,03	0,32	0,80
Solvente: Água; S/F = 8				
40	LPSE-P	0,63	2,01	0,45
60	LPSE	8,75	0,97	3,02
50	LPSE	8,49	1,3	3,93
60	LPSE-C	6,96	0,91	2,25
50	LPSE-P	8,15	1,46	4,23
50	LPSE-C	7,68	3,53	9,65
40	LPSE-C	0,30	2,09	0,22
40	LPSE	1,08	0,66	0,25
60	LPSE-P	8,64	1,7	5,23
Solvente: Etanol; S/F = 4				
40	LPSE	10,58	3,21	12,09
40	LPSE-P	9,55	4,7	15,97
60	LPSE-P	11,31	5,96	23,99
60	LPSE-C	9,73	5,56	19,25
50	LPSE-P	10,19	6,49	23,54
40	LPSE-C	11,98	7,42	31,62
50	LPSE	12,54	2,57	11,46
50	LPSE-C	10,01	1,41	5,02
60	LPSE	9,07	3,87	12,50
Solvente: Etanol; S/F = 8				
40	LPSE-P	10,50	4,16	15,54
40	LPSE-C	9,51	5,76	19,49
60	LPSE-P	9,53	5,65	19,17
50	LPSE-P	10,33	4,13	15,18
50	LPSE-C	11,05	5,4	21,23
50	LPSE	10,11	4,48	16,12
40	LPSE	10,77	3,54	13,57
60	LPSE-C	13,06	5,14	23,89
60	LPSE	10,56	7,58	28,49

Tabela 5.8 - ANOVA dos parâmetros estudados sobre X_0 (%), nas extrações LPSE.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	p-valor
Temperatura	47,855	2	23,928	4,85	0,023
Solvente	290,532	1	290,532	58,89	0,000
Método	3,945	2	1,972	0,40	0,677
S/F	5,221	1	5,221	1,06	0,319
Temperatura*Solvente	41,319	2	20,660	4,19	0,034
Temperatura*Método	22,076	4	5,519	1,12	0,382
Temperatura*S/F	27,697	2	13,849	2,81	0,090
Solvente*Método	0,217	2	0,109	0,02	0,978
Solvente*S/F	4,544	1	4,544	0,92	0,351
Método*S/F	3,580	2	3,580	0,36	0,701
Erro	19,059	16	19,059		
Total	525,837	35			

Tabela 5.9 - ANOVA dos parâmetros estudados sobre RB (%), nas extrações LPSE.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	p-valor
Temperatura	46,19	2	23,10	0,85	0,446
Solvente	2187,12	1	2187,08	80,38	0,000
Método	46,91	2	23,46	0,86	0,441
S/F	22,06	1	22,06	0,81	0,381
Temperatura*Solvente	88,67	2	44,34	1,63	0,227
Temperatura*Método	55,32	4	13,83	0,51	0,730
Temperatura*S/F	71,49	2	35,75	1,31	0,296
Solvente*Método	18,93	2	9,46	0,35	0,711
Solvente*S/F	1,10	1	1,10	0,04	0,843
Método*S/F	44,60	2	22,30	0,82	0,458
Erro	435,37	16	27,21		
Total	3017,77	35			

Avaliando a única variável que interferiu significativamente nos resultados de RB, o solvente, observou-se que os maiores valores foram obtidos usando o etanol. Portanto, o etanol foi melhor solvente de extração, resultado que pode ser explicado pela insolubilidade da bixina em água; e relativa solubilidade da bixina em etanol, que é menos polar do que a água, mas mais polar do que a acetona, na qual a bixina é solúvel.

Os resultados (X_0 e RB) obtidos por PLE foram menores do que os de LPSE com o mesmo solvente, nas mesmas condições de temperatura e S/F. Uma possível explicação seria o aumento da constante dielétrica do etanol ao ser pressurizado, indicando um conseqüente aumento da polaridade, o que diminuiu a solubilidade da bixina no solvente. Onsager (1936) descreve uma relação empírica que relaciona a polarização e a constante dielétrica de líquidos. Esta relação é bastante satisfatória para variação da constante dielétrica ao se variar a temperatura e a pressão (Oster e Kirkwood, 1943).

Veggi et al (2013) estudaram a viabilidade do uso de ultrassom como assistente de extração ao obter extratos ricos em polifenóis da casca de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.var *stilbocarpa*); os resultados foram comparados aos obtidos por extração com agitação convencional. Foi observado um efeito estatisticamente significativo ($P < 0,05$) de ultrassom (cerca de 15% de aumento no teor total de compostos fenólicos), quando usado potência máxima (60 W). A extração assistida por ultrassom melhorou consideravelmente, tanto a cinética quanto a extração quantitativa dos compostos fenólicos presentes na casca do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.var *stilbocarpa*), comparado ao método de extração convencional.

Pingret et al (2012) usaram bagaço de maçã (*Malus domestica* Borkh) para uma extração assistida por ultrassom (UAE), a fim de produzir extratos ricos em antioxidantes. As condições otimizadas obtidas pela metodologia de superfície de resposta para extração de polifenóis usando água foram de 40°C, 40 min e 0,764 W/cm² (555 e 420 mg de catequina equivalentes por 100 g de peso seco, respectivamente) e ambos os métodos apresentam a mesma extração cinética. Além disso, os extratos obtidos por ultrassom apresentaram maior atividade antioxidante, o que foi confirmado pela análise de HPLC, que revelou que os principais polifenóis não foram degradados nas condições aplicadas.

Para as extrações por percolação a baixa pressão somente a variável solvente e temperatura foram significativas a 95% de confiança pelo teste de variância. Portanto, optou-se por fazer os estudos cinéticos nas condições de solvente e temperatura que resultaram em melhores valores de X_0 (% b.s.) e RB (% b.s.) e com o método mais simples: LPSE. Foram selecionados o etanol, e as temperaturas de 50 °C e 60 °C. A Tabela 5.10 relaciona os maiores valores de X_0 (%) e RB (%) obtidos pelos métodos avaliados.

Tabela 5.10 - Valores máximos obtidos nos métodos extrativos testados com etanol.

Método	Condições de extração	S/F (g/g)	Máximo X ₀ (% b.s.)	Máximo RB (% b.s.)
PLE	60°C/100bar	8	7,22	9,07
LPSE-C	40°C	8	11,98	31,62
LPSE	60°C	8	10,56	28,49
LPSE	50°C	4	12,54	11,46

5.5 – Cinéticas de extração

A partir dos resultados obtidos em relação a X₀ e RB, duas condições foram selecionadas para o estudo cinético (Tabela 5.11). Para definir as condições de extração, foram adotados níveis que maximizaram os parâmetros avaliados, máximo X₀ (Cinética I), e máximo RB (Cinética II). Considerando os resultados de todas as extrações e também os resultados da ANOVA, constatou-se que o uso do ultrassom nas extrações por LPSE não resultou em diferenças significativas nos valores respostas. Por isso foram escolhidos os métodos com menores gastos energéticos, que foram aqueles à baixa pressão e sem o uso de ultrassom (LPSE). Ainda foi realizado mais uma cinética (Cinética III) na condição escolhida de máximo RB (%), usando sementes *in natura* (UM-IN) com intuito de observar diferenças de rendimento de extração de bixina na presença do óleo na semente, considerando que a presença de óleo na semente é usada como auxiliar na extração de bixina, por esta ser lipossolúvel. A vazão utilizada nas cinéticas foi a mesma dos experimentos do planejamento, 3,4 g/min.

Tabela 5. 11 - Condições de extração em que foram realizadas as cinéticas.

OECs	Temperatura (°C)	Matéria-prima
Cinética I	50	UM-D
Cinética II	60	UM-D
Cinética III	60	UM-IN

Todas as cinéticas foram realizadas por LPSE, usando etanol.

Nas Figuras 5.2 (a) e (b) estão apresentadas as OECs para as condições de extração pré-determinadas para as Cinéticas I, II e III. Com objetivo de comparação, as OECs foram plotadas na mesma figura, pois todas foram realizadas com o mesmo solvente e diferiram apenas na temperatura e tipo de semente. A razão S/F foi estimada a partir da multiplicação do tempo de extração com a vazão mássica de etanol utilizada no processo, para uma massa de matéria-prima de alimentação.

Pode-se notar que ao variar a temperatura de 50 °C para 60 °C, usando o método LPSE com sementes desengorduradas, o rendimento global aumentou, o que corrobora com os resultados encontrados na ANOVA (Tabela 5.8. e 5.9), que indicou haver influência significativa no X_0 (%) ao se variar a temperatura.

Observando a Figura 5.2 (b) que ilustra a variação do X_0 em função do S/F, é possível visualizar que até S/F = 50, ainda há extração significativa de extrato, no entanto a partir de S/F = 60 a curva de extração diminui sua inclinação, o que indica uma redução da taxa de extração. O máximo X_0 nas condições das Cinéticas I, II e III, foi em S/F = 100 (Figura 5.2 (b)) em 95 minutos (Figura 5.2 (a)), no qual se obteve aproximadamente, 21, 25 e 15 % de X_0 para Cinéticas I, II e III respectivamente. Considerando os valores máximos de X_0 , em S/F = 11 (próximo de S/F = 8 que foi o maior valor utilizado nos experimentos de determinação de X_0 e RB), aproximadamente 27,9 % (cin. I), 13,9 % (cin. II) e 17,2 (cin. III) do rendimento máximo foi alcançado. O que indica que os valores selecionados de S/F (4 e 8) para os estudos anteriores de extração não foram suficientes para exaurir a matéria-prima.

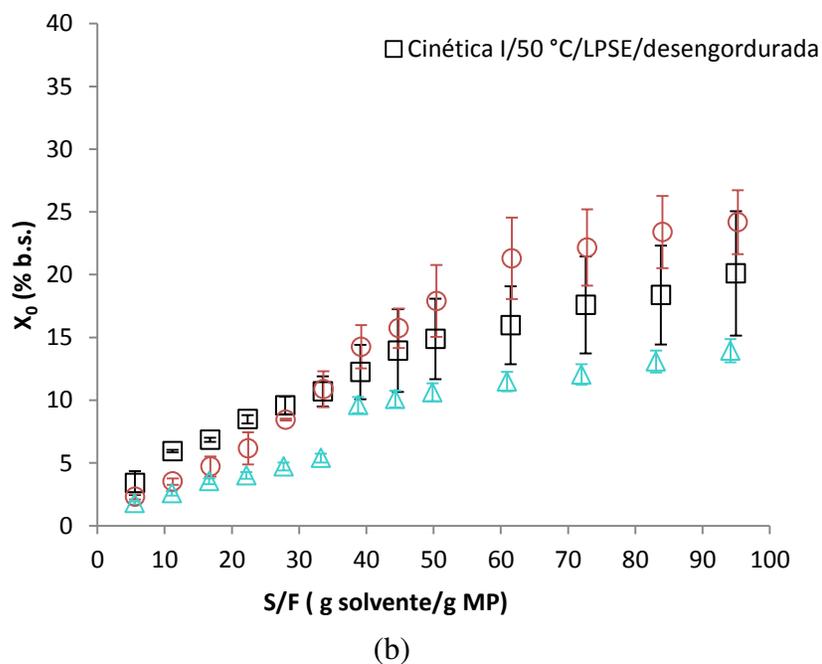
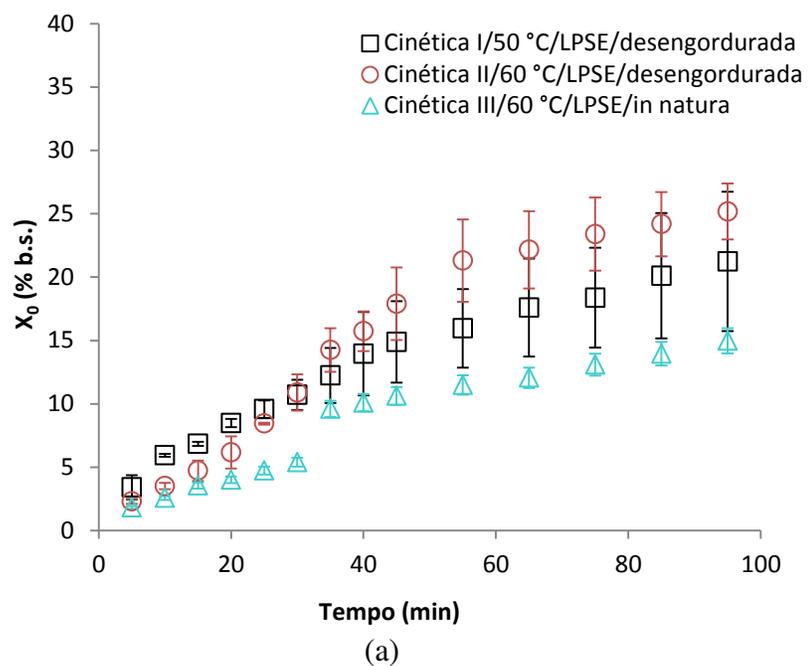


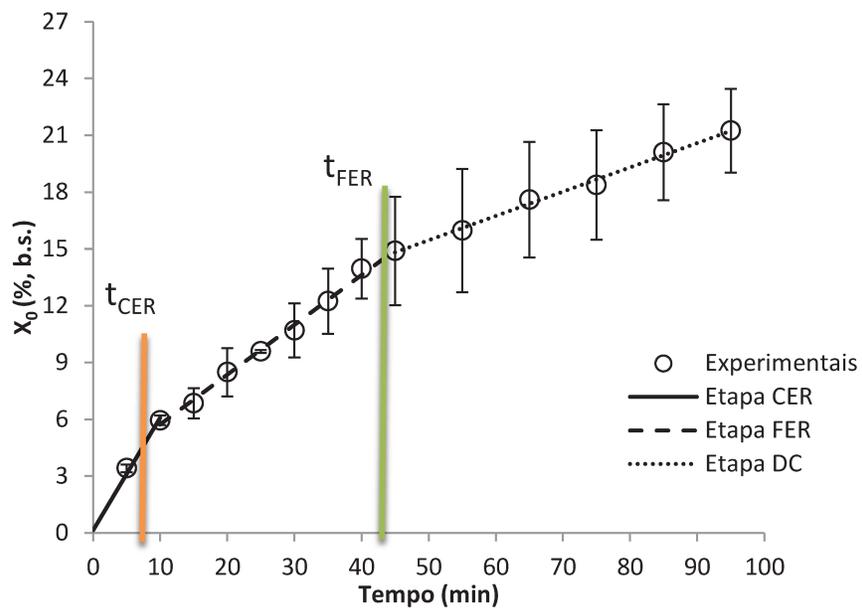
Figura 5. 2 - Curvas de rendimento global extração *versus* tempo (a) e rendimento global *versus* S/F (b) das sementes de Urucum desengorduradas a 50 °C (cin. I) e 60 °C (cin. II) e *in natura* a 60 °C (cin. III).

5.5.1 – Cálculos cinéticos

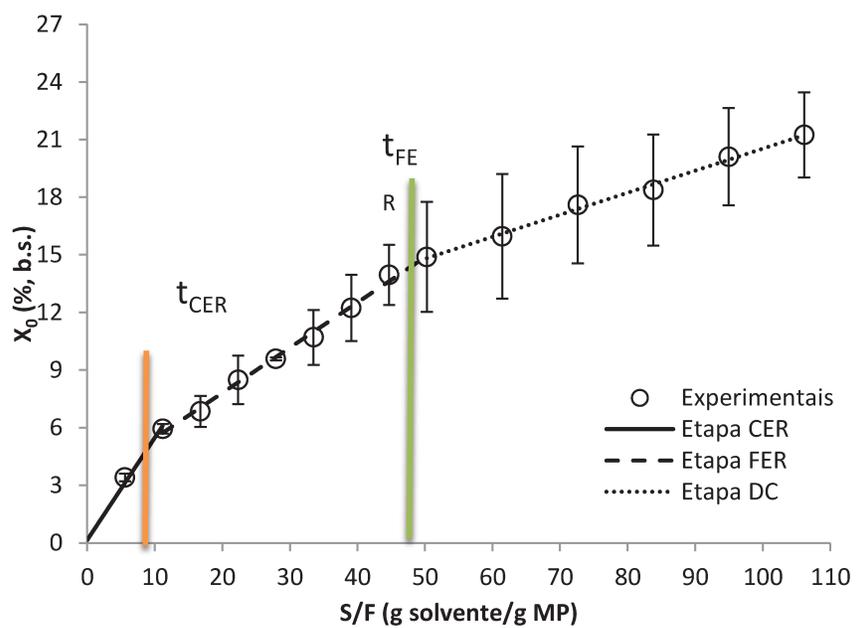
Os efeitos das variáveis de processo: pressão, temperatura, e vazão de solvente, não são facilmente visualizados pelas OECs, tanto para o rendimento global como no perfil químico do extrato. Então, para primeira aproximação, é interessante estabelecer um procedimento simples para avaliar os efeitos das variáveis de processo. A partir disso, as condições poderão ser otimizadas considerando um processo global. A OEC é obtida considerando a quantidade extraída (massa ou rendimento global) em função do tempo. A típica OEC descreve três etapas (MEIRELES, 2008):

1. O período de taxa de extração constante (CER)
2. O período de taxa de extração decrescente (FER)
3. O período de taxa de difusão controlada (DC)

O período CER é caracterizado pela extração do soluto contido na superfície das partículas sólidas de substratos ou nas células que são rompidas durante o processamento. A transferência de massa na camada externa próxima da superfície da partícula é controlada por convecção. O período CER é caracterizado pelos seguintes parâmetros cinéticos: (1) taxa de transferência de massa (M_{CER}), (2) duração do período CER (t_{CER}), (3) rendimento durante o período CER (Y_{CER}), e (4) razão da massa de soluto no solvente, na saída do vaso extrator (Y_{CER}), e é calculada como a razão entre M_{CER} e a vazão de solvente. No período FER, uma porção considerável de partículas sólidas não está mais revestida com soluto ou o número de células quebradas não é tão grande. Então, a taxa de transferência de massa diminui como resultado da diminuição da área efetiva de transferência de massa, com isso aumenta a importância do mecanismo de difusão. No período DC, o soluto que encobre as partículas sólidas foi completamente removido e, então, o processo de extração é controlado por difusão do solvente para o interior das partículas, seguido pela difusão da mistura soluto-solvente para a superfície das partículas (MEIRELES, 2008). O S/F_{CER} , é o respectivo S/F da etapa CER, calculado usando o t_{CER} , vazão mássica do solvente e a massa de matéria-prima que foi utilizada.

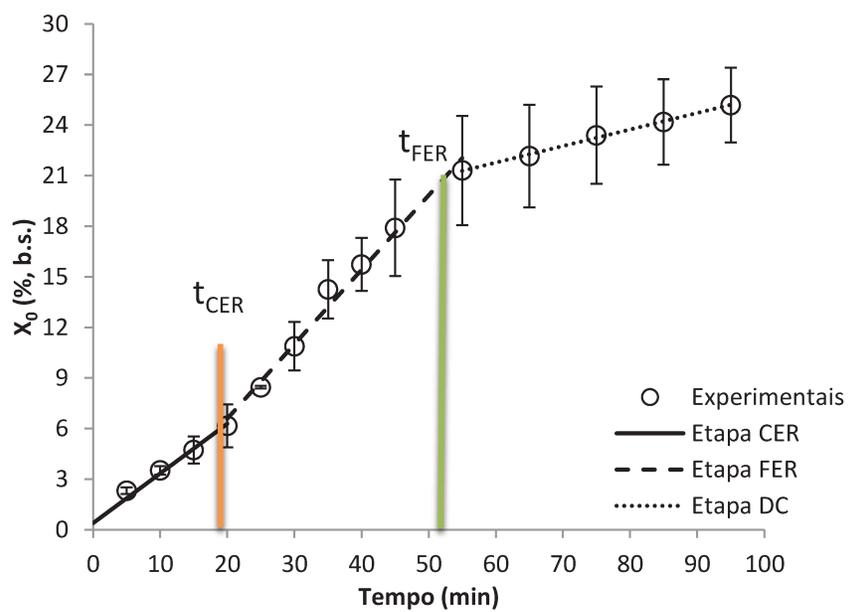


(a)

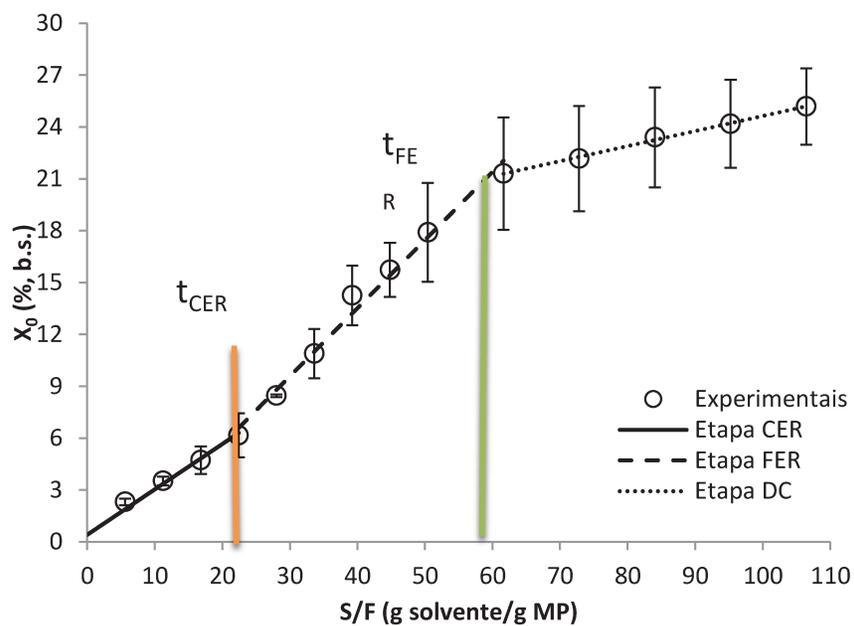


(b)

Figura 5. 3 - *Spline* de três retas ajustadas aos dados experimentais da OEC da Cinética I (LPSE/50 °C/UM-D) em função do tempo de extração (a) e em função da razão S/F (b).

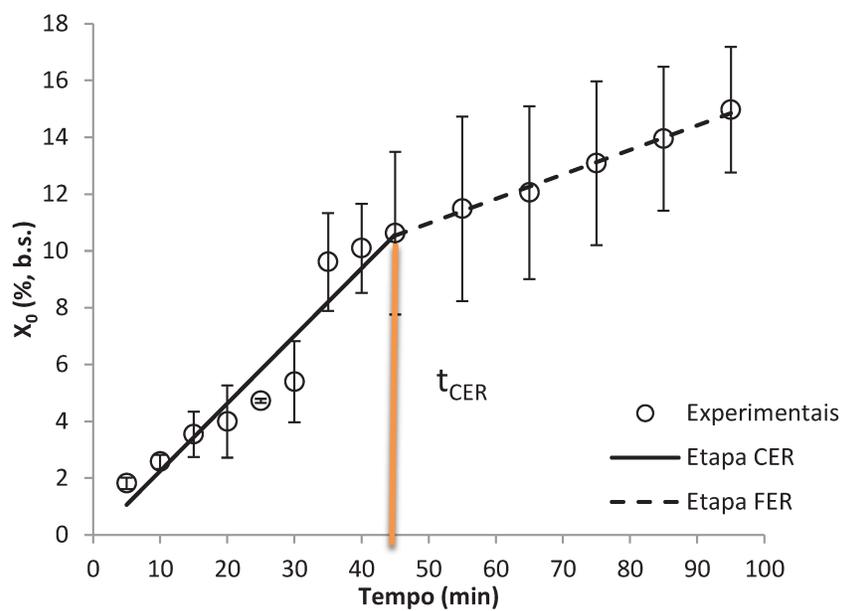


(a)

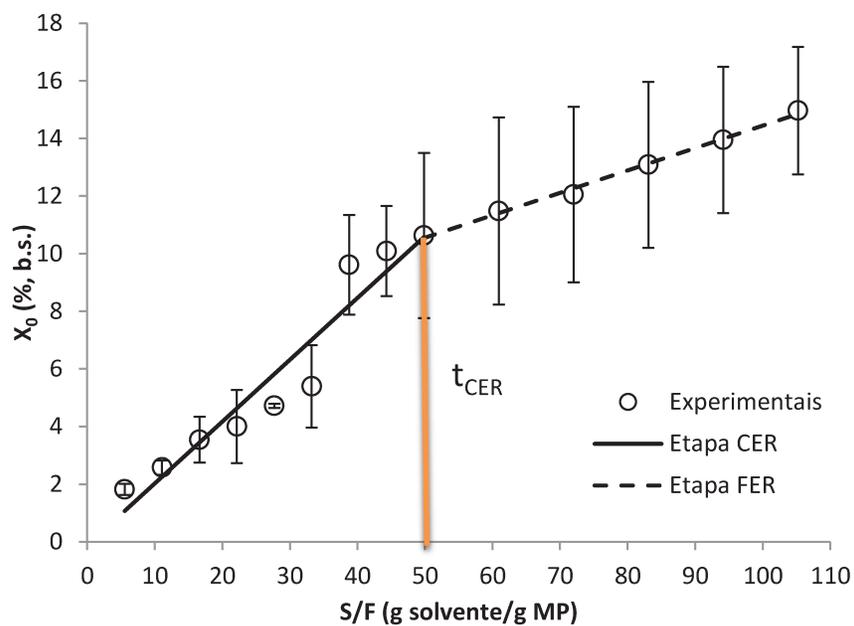


(b)

Figura 5. 4 - *Spline* de três retas ajustadas aos dados experimentais da OEC da Cinética II (LPSE/60 °C/UM-D) em função do tempo de extração (a) e em função da razão S/F (b).



(a)



(b)

Figura 5. 5 - (a) Spline de duas retas ajustadas aos dados experimentais da OEC da Cinética III (LPSE/60 °C/UM-IN) em função do tempo de extração (a) e em função da razão S/F.

A Tabela 5.12 mostra os valores dos parâmetros cinéticos calculados a partir das OECs ajustadas.

Tabela 5. 12 - Valores encontrados para os parâmetros cinéticos ajustados às OECs.

Parâmetros cinéticos	Condições de processo		
	Cinética I	Cinética II	Cinética III
t_{CER} (min)	7,35	18,74	44,99
M_{CER} (g.min ⁻¹)	0,0208	0,00914	0,00713
R_{CER} (%)	5,01	5,63	10,54
Y_{CER} (g extrato.g ⁻¹ etanol)	0,0612	0,0269	0,021
S/F_{CER} (g etanol . g ⁻¹ MP)	8,2	20,9	50,2

Observou-se na OEC da Cinética III, Figura 5.5 (a), que o tempo de 95 minutos não foi suficiente para atingir a etapa DC, e por isso o ajuste foi feito a duas splines. Analisando os parâmetros cinéticos, nota-se que o t_{CER} da Cinética III foi mais de 2 vezes maior do que a Cinética II, que foi realizada na mesma temperatura mas com sementes desengorduradas. Isso indica que a presença do óleo na semente nessas condições dificultou o acesso do solvente ao substrato. Comparando as Cinéticas I e II observam-se diferenças significativas nos valores, pois a Cinética I atingiu o t_{CER} em um tempo menor, e com rendimento R_{CER} semelhante ao da Cinética II. Para a escolha do método mais vantajoso deve-se optar por aquele que resulte bons rendimentos de processo no menor tempo.

Nesse estudo os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 5.12 indicam a Cinética I como a mais eficiente no período CER, no entanto ao se observar as OECs das Cinéticas I e II, Figuras 5.3 e 5.4, a partir de 30 minutos de extração ($S/F = 33$) as Cinéticas I e II atingem um X_0 de aproximadamente 10%. Após esse momento a Cinética II apresentou rendimentos maiores do que a Cinética I, totalizando ao final da extração um rendimento de 25 %, que foi 4 % maior do que o total da Cinética I, e 11 % maior que o da Cinética III. Mas, para uma seleção adequada das condições de processo seria necessário o cálculo do custo de manufatura (COM) que está além dos objetivos desse estudo.

5.5.2 – Rendimento de extração de bixina nas OECs

O rendimento global não pode ser considerado como parâmetro comparativo isoladamente, pois um maior rendimento não reflete, necessariamente, em vantagem, uma vez que outros compostos além dos de interesse podem ser co-extraídos, levando à diluição dos compostos alvo. Portanto, é necessário analisar rendimento e composição química do extrato obtido, a fim de determinar as condições de processo que melhor satisfazem a obtenção dos compostos de interesse (MEIRELES, 2008). As OECs obtidas para rendimento de extração de bixina (RB) estão apresentadas na Figura 5.6.

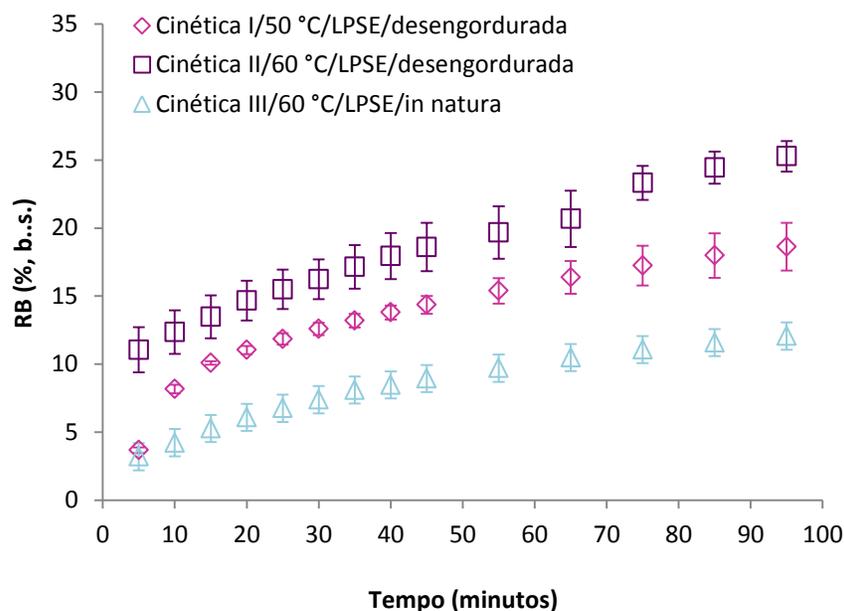


Figura 5. 6 - Rendimento de extração de bixina RB (%) nas OECs usando sementes de Urucum (*Bixa Orellana* L.) em diferentes condições de processo.

Ao comparar as OECs das Cinéticas I e II, não se observam diferenças significativas nos resultados RB. No entanto, observando as OECs das Cinéticas I e III, fica evidente que ao se utilizar sementes desengorduradas houve diferença significativa no RB.

Vatai, Škerget e Knez (2009) realizaram extrações de compostos fenólicos de bagaço de uva e de baga do sagueiro (*elderberry*) em uma única etapa com etanol, acetato de etilo-acetona em diferentes proporções com água, nas temperaturas de 20 °C, 40 °C e 60 °C. Os solventes mais eficientes foram as misturas de etilo-acetona em água a 60°C. Comparativamente realizaram pré-tratamento da matéria-prima com CO₂ supercrítico (com ou sem etanol como cossolvente), o material residual de extração do CO₂ supercrítico foi re-extraído com 50% de mistura de etanol-água a 60 °C. Os resultados mostram, que o pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico melhorou a extração de fenóis totais. O rendimento em fenóis obtido na extração em duas etapas foi significativamente mais elevado em comparação com o processo de extração com somente uma etapa, ou seja, sem pré-tratamento.

Os resultados obtidos, ilustrados pelas OECs da Figura 5.6, comprovam que o uso de pré-tratamento realizando uma etapa anterior para retirada do óleo das sementes de Urucum por CO₂ supercrítico, aumentou significativamente o RB em comparação com a extração de sementes *in natura*.

5.6 – Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o intuito de analisar a superfície das sementes de Urucum como meio comparativo e explicativo dos métodos usados, foi realizada análise de MEV de sete amostras selecionadas a seguir (Tabela 5.13).

Tabela 5. 13 - Identificação da semente analisadas por MEV.

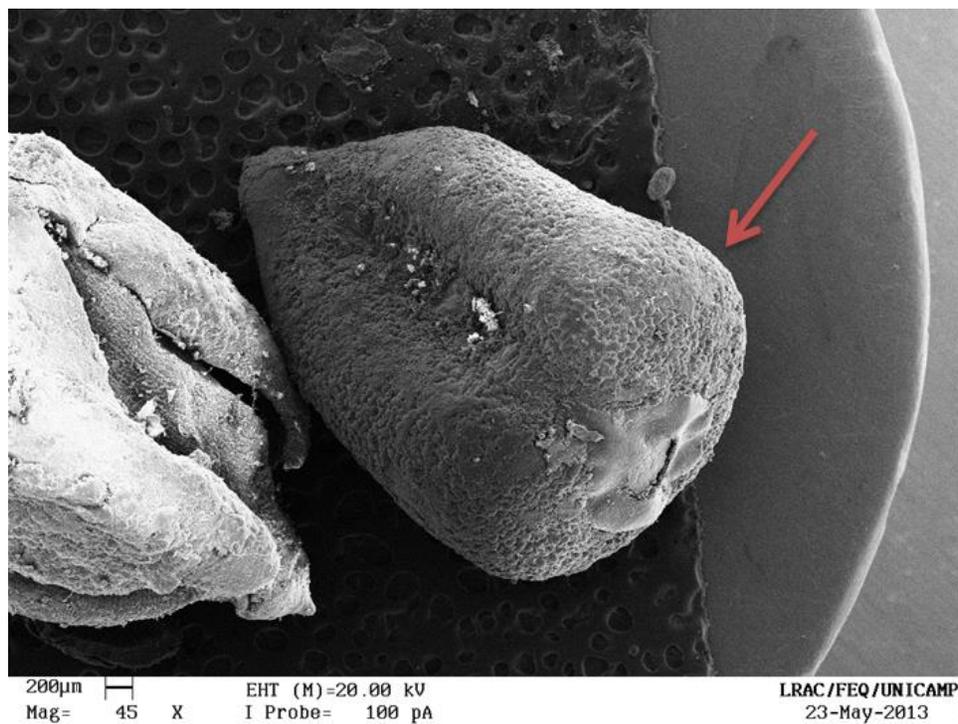
Amostra	Tipo de semente	Descrição de tratamento
1	UM-IN	<i>in natura</i> (sem tratamento)
2	UM-IN	SFE
3	UM-D	PLE/60 °C/ 10 MPa/Etanol
4	UM-D	LPSE-C/UAE/60 °C/Etanol
5	UM-D	LPSE/50 °C/Etanol (Cinética I)
6	UM-D	LPSE/60 °C/Etanol (Cinética II)
7	UM-IN	LPSE/ 60 °C/Etanol (Cinética III)

As Figuras 5.7 (a) e (b) ilustram as sementes *in natura* (amostra 1, Tab. 5.13) com aumentos de 45x e 1000x. As Figuras 5.8 (a) e (b) ilustram as sementes desengorduradas após processo SFE (amostra 2, Tab. 5.13) com aumentos de 45x e 1000x. É possível observar a estrutura resinosa que encobre a semente, e onde se encontra bixina. Nas micrografias, Figura 5.7 (a) e (b), nota-se que essa estrutura está homogênea e intacta, enquanto nas Figuras 5.8 (a) e (b) observa-se os danos causados pelo processo de extração do óleo com CO₂ supercrítico; a superfície ficou com aspecto danificado, fato que pode ter auxiliado na extração da bixina das sementes desengorduradas. As setas indicam a região aumentada de 45x para 1000x. Visualizam-se as estruturas que deixam o aspecto aveludado na semente após a SFE, são várias partículas aglomeradas na superfície, que podem ser parte da superfície resinosa que contém o pigmento.

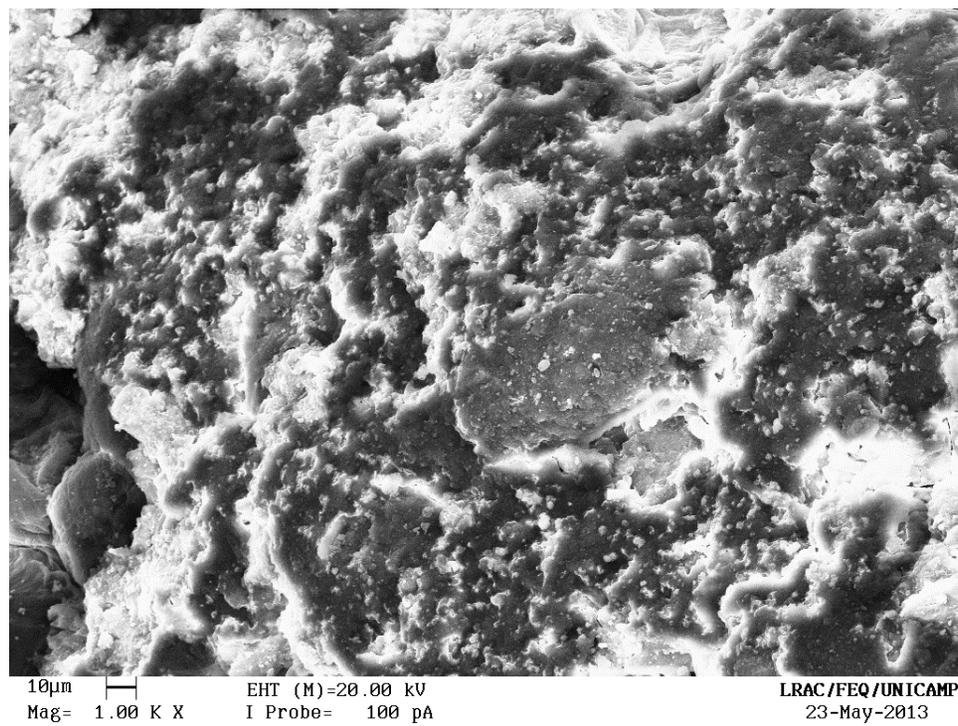
A Figura 5.8 (b) ilustra as sementes após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico; esta mesma semente (UM-D) foi usada como matéria-prima nas extrações seguintes para obtenção de bixina. Portanto, as sementes antes da extração com ultrassom e demais extrações que utilizaram UM-D, são as Figuras 5.8 (a) e (b).

As Figuras 5.9 (a) e (b) e 5.10 (a) e (b) são sementes de Urucum desengorduradas que passaram por processos de extração, LPSE-C/60 °C (amostra 4, Tab. 5.13) e PLE/60 °C/10 Mpa (amostra 3, Tab. 5.13) respectivamente, ambas realizadas com etanol. Os aumentos são 45x e 1000x.

Na micrografia da Figura 5.9 (a) visualizam-se algumas estruturas danificadas. A superfície da semente após o tratamento com ultrassom sofreu erosões que podem ter sido causadas pelo efeito de cavitação produzido pelo ultrassom.

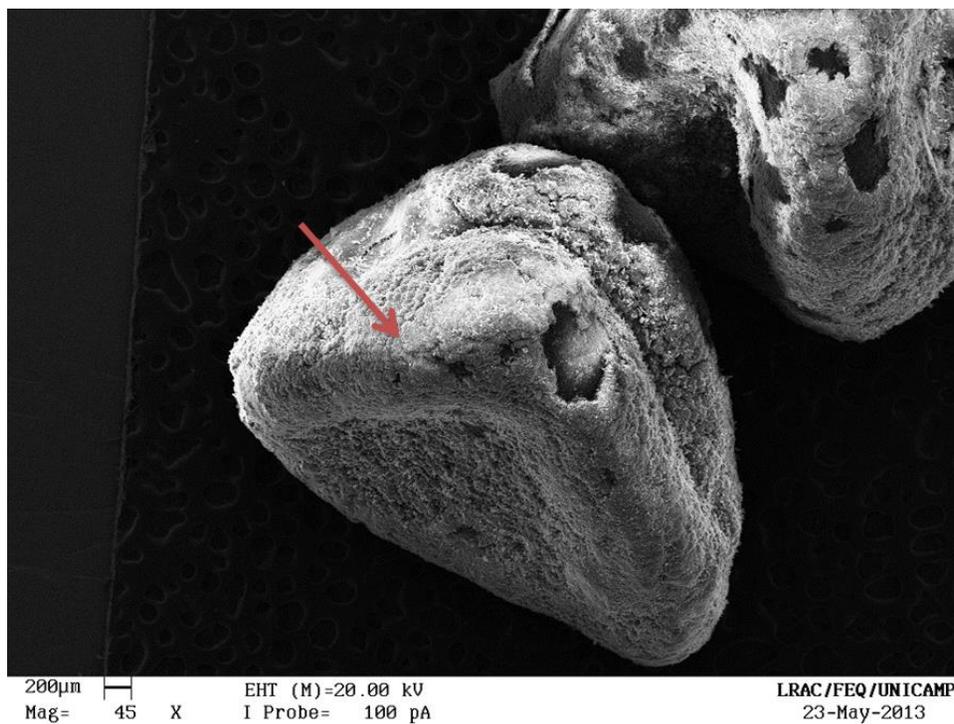


(a)

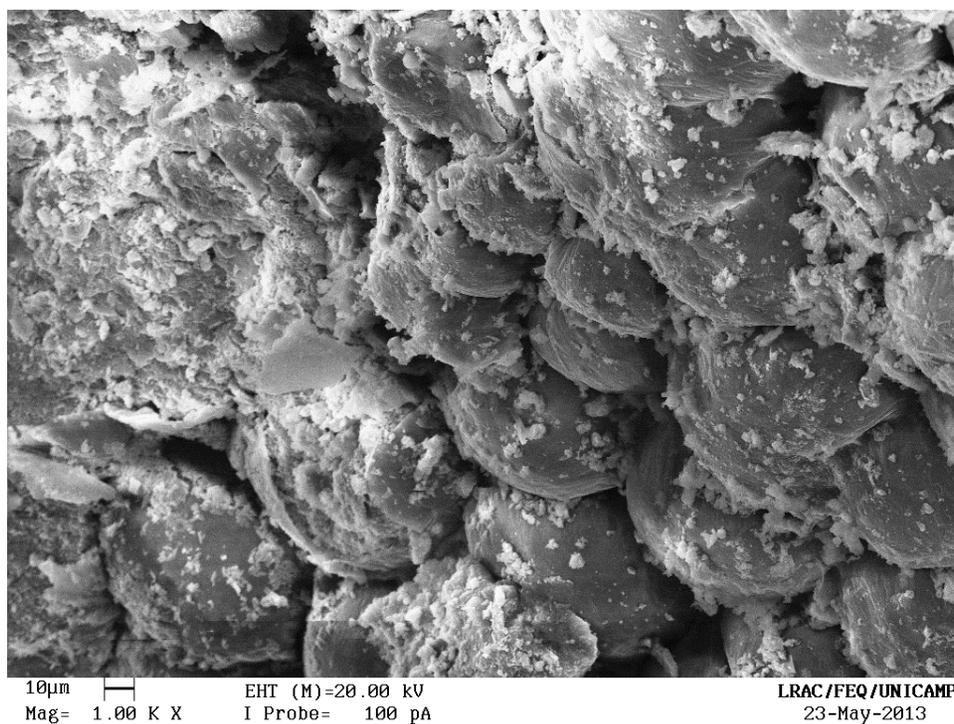


(b)

Figura 5.7 - Semente de Urucum in natura com aumento de 45x (a) e de 1000x (b).



(a)



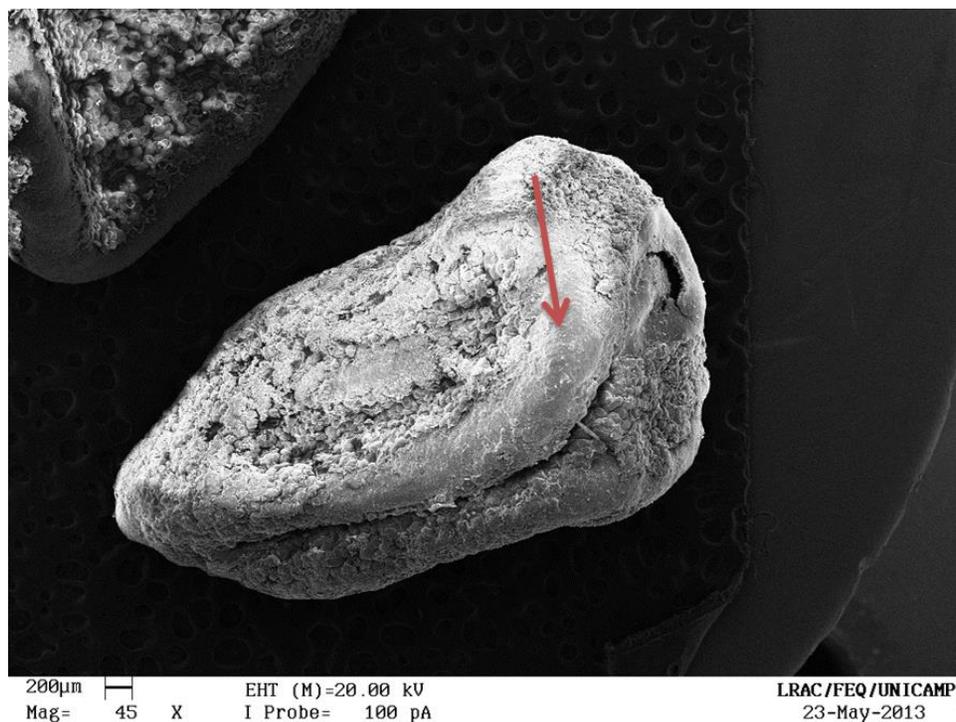
(b)

Figura 5.8 - Sementes de Urucum desengorduradas em extração com CO₂ supercrítico (40 °C e 20 MPa), com aumento de 45x (a) e com aumento de 1000x (b).

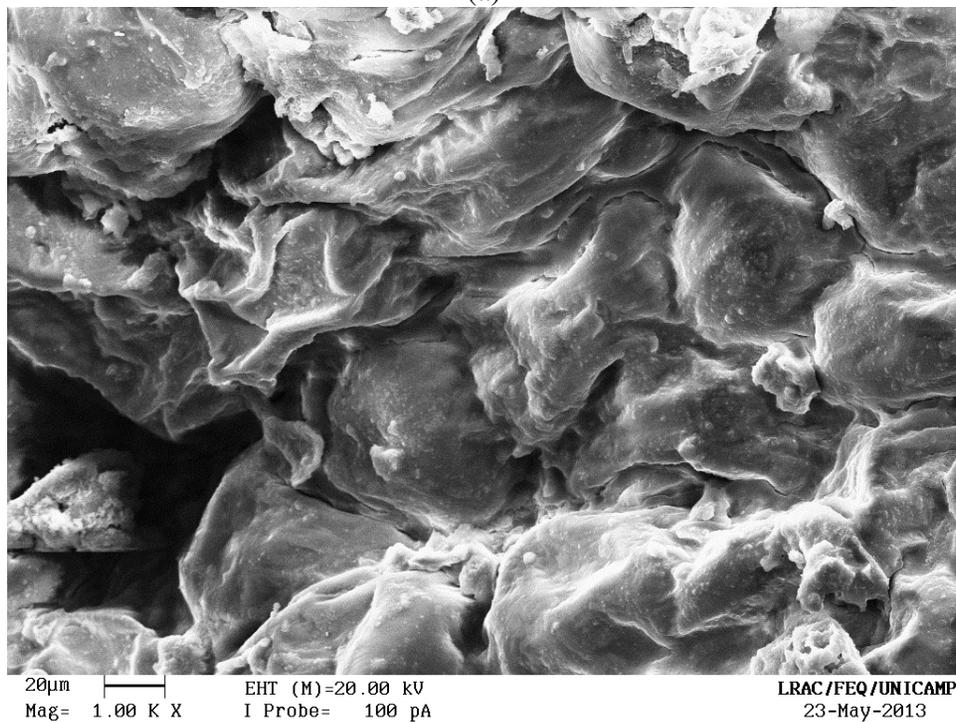
Os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas na matéria são os ciclos de compressão e expansão durante a propagação da onda. A expansão leva à formação de bolhas de cavitação e o aumento da temperatura e pressão causado pela compressão leva ao colapso da bolha, resultando em uma “onda de choque” que passa através do solvente provocando um efeito mecânico de agitação (WANG e WELLER, 2006; ROSTAGNO *et al.*, 2009). Quando uma bolha colapsa perto de uma superfície sólida, formam-se jatos de solvente a alta velocidade assimetricamente, provocando danos à estrutura celular, aumentando a penetração do solvente de extração para dentro da célula e aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida. Este efeito associado à transferência de massa aumentada e ao rompimento das células aumenta a liberação dos compostos intracelulares para o meio (ROSTAGNO *et al.*, 2009).

A comparação das micrografias com os resultados de rendimentos X_0 e RB ratifica a ocorrência da bixina na estrutura resinosa da superfície da semente (pericarpo), pois alterações na superfície da semente melhoraram o RB. A Figura 5.9 (b) mostra um aumento de 1000x do arilo que permaneceu na semente; percebe-se uma mudança na estrutura após a extração com ultrassom. Nota-se, após a extração com ultrassom, Figura 5.9 (a) e (b), que o tecido superficial foi muito danificado; é visível o efeito de cavitação no tecido, o que provavelmente melhorou o rendimento da extração, pois as bolhas de gás formadas pelo ultrassom na interface sólido-líquido, ao explodirem podem ter enfraquecido a estrutura resinosa, que foi extraída mais facilmente. A diferença da estrutura na superfície antes (Figuras 5.8) e após (Figuras 5.9) o uso do ultrassom é perceptível.

As Figuras 5.10 (a) e (b) são micrografias das sementes desengorduradas após a extração com líquido pressurizado (amostra 3, Tab. 5.13). Observa-se o efeito da pressão do líquido sobre o tecido resinoso, que aparentemente era uma estrutura com formas arredondadas, Figura 5.8 (b), e após a extração com líquido pressurizado ficou com aspecto rompido. As Figuras 5.11 (a) e (b) são micrografias de resíduo de extração de bixina de sementes desengorduradas após extração de 95 minutos a 50 °C/LPSE (amostra 5, Tab. 5.13). Há danos na estrutura, em que se observa a ruptura e o destacamento de parte da superfície, que pode ser o resultado de um tempo de exposição maior da semente ao solvente em temperaturas elevadas.

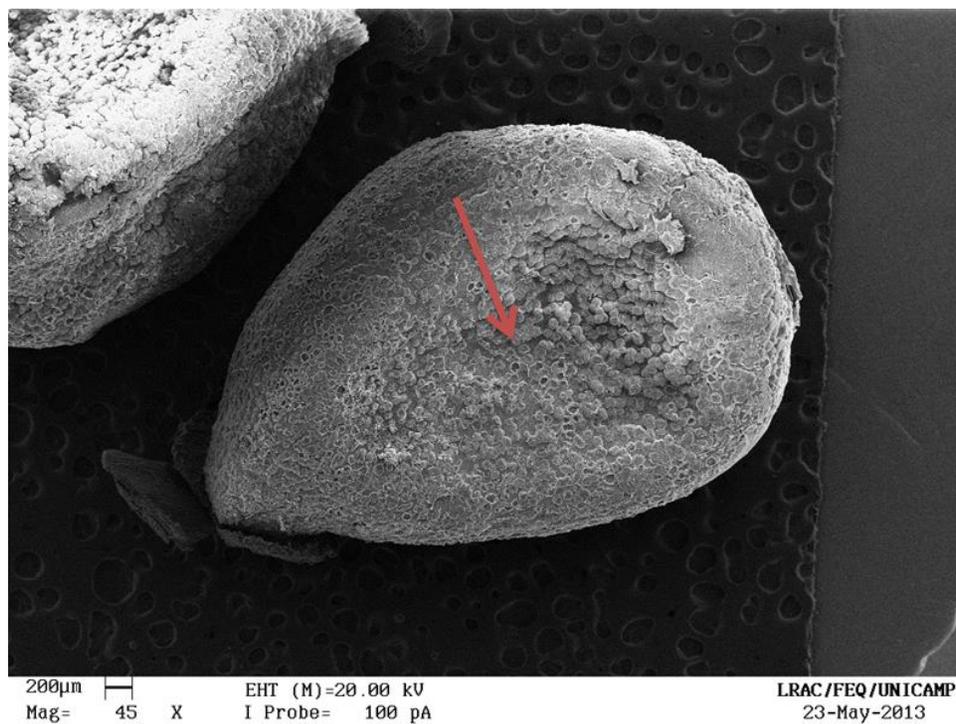


(a)

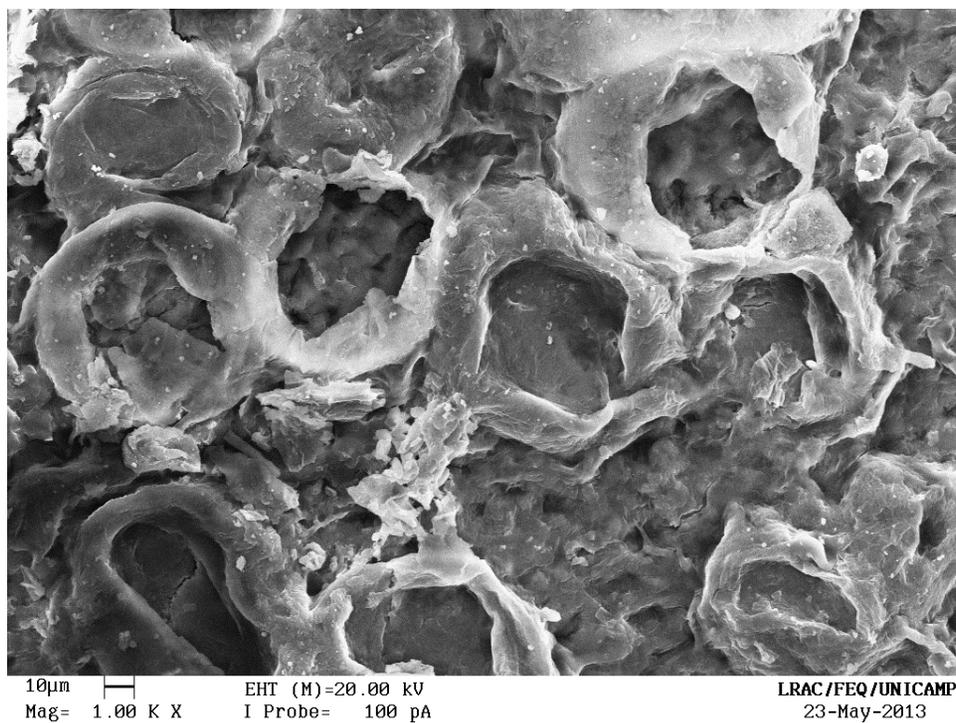


(b)

Figura 5. 9 - Semente de Urucum desengordurada após extração com LPSE-C a 60 °C, com ultrassom contínuo durante toda a extração, com aumento de 45x (a) e com aumento de 1000x (b).

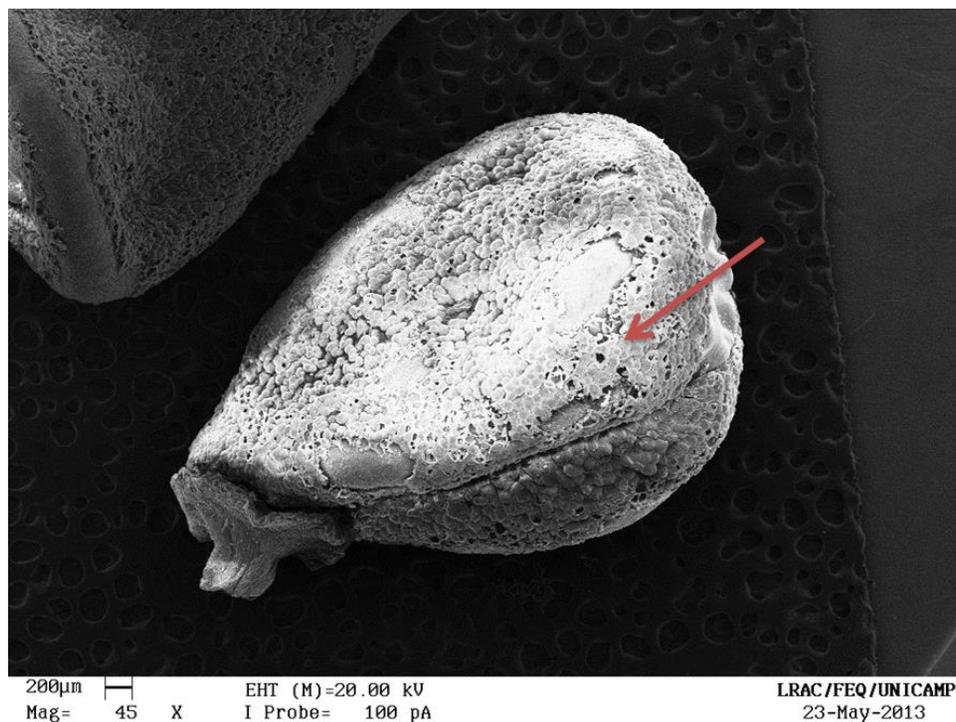


(a)

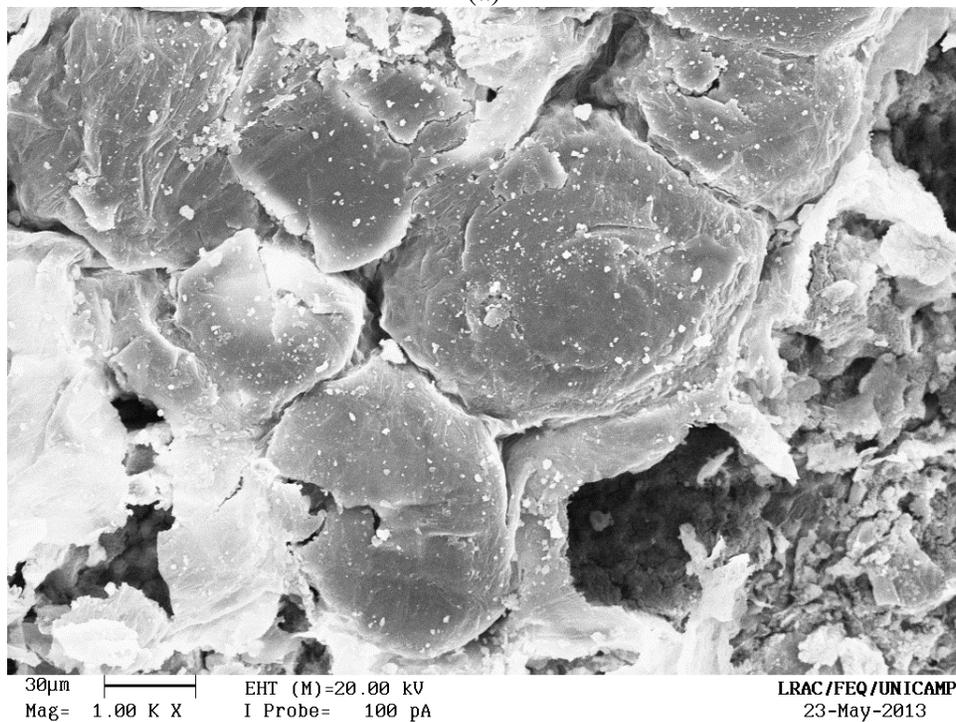


(b)

Figura 5. 10 - Semente de Urucum desengordurada após extração com PLE a 60 °C e 10 MPa, com aumento de 45x; (a) e com aumento de 1000x.

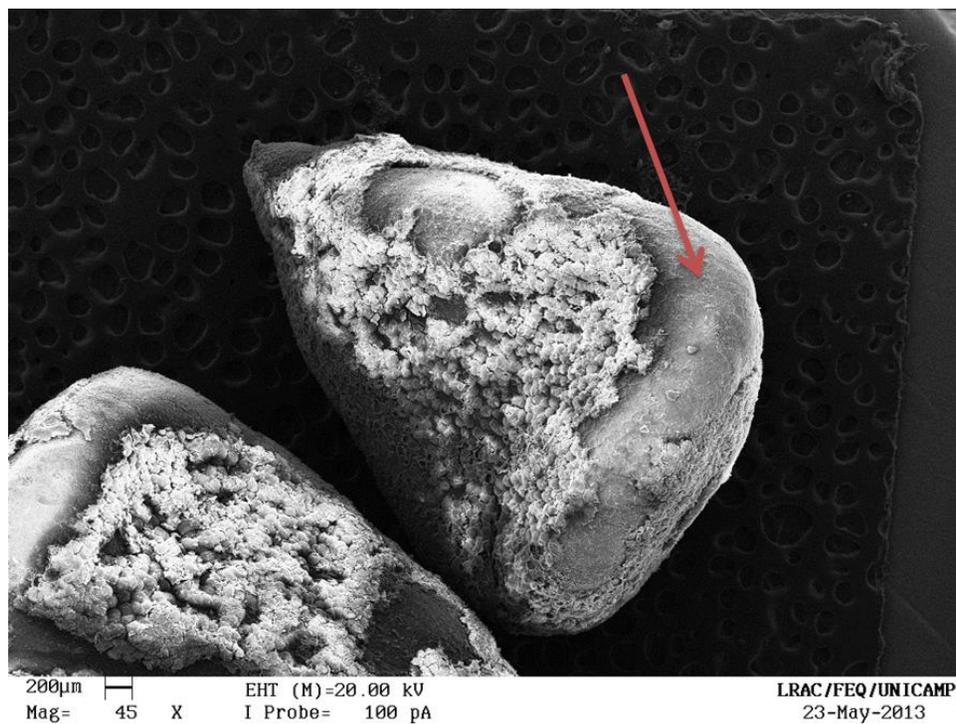


(a)

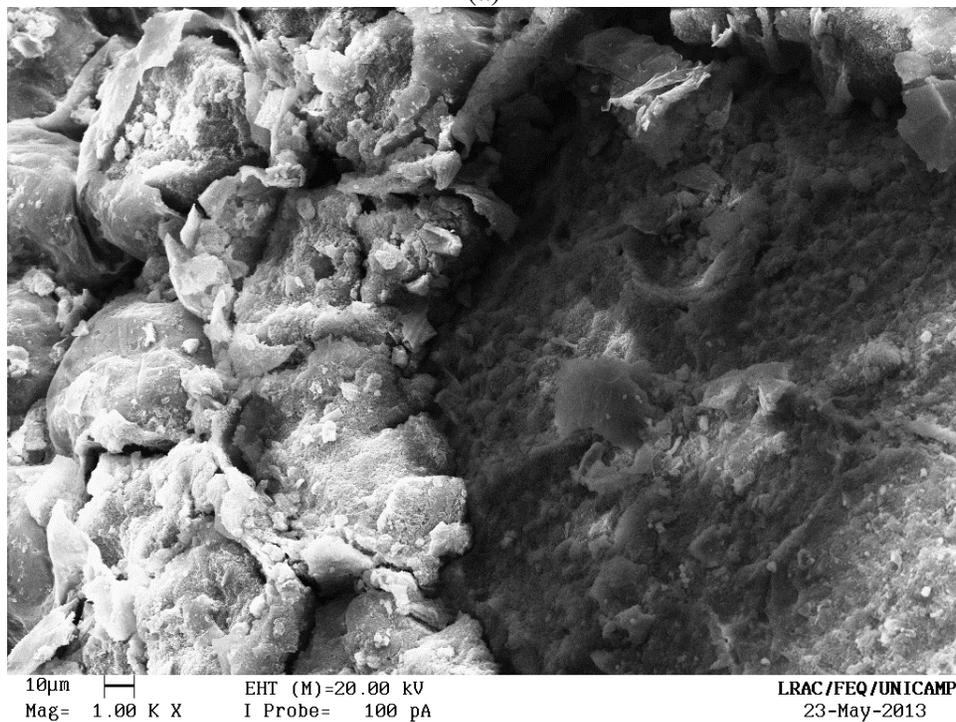


(b)

Figura 5. 11 - Semente de Urucum desengordurada após extração com etanol a 50 °C/LPSE por 95 minutos (Cinética I), com aumento de 45x; (a) e com aumento de 1000x (b).

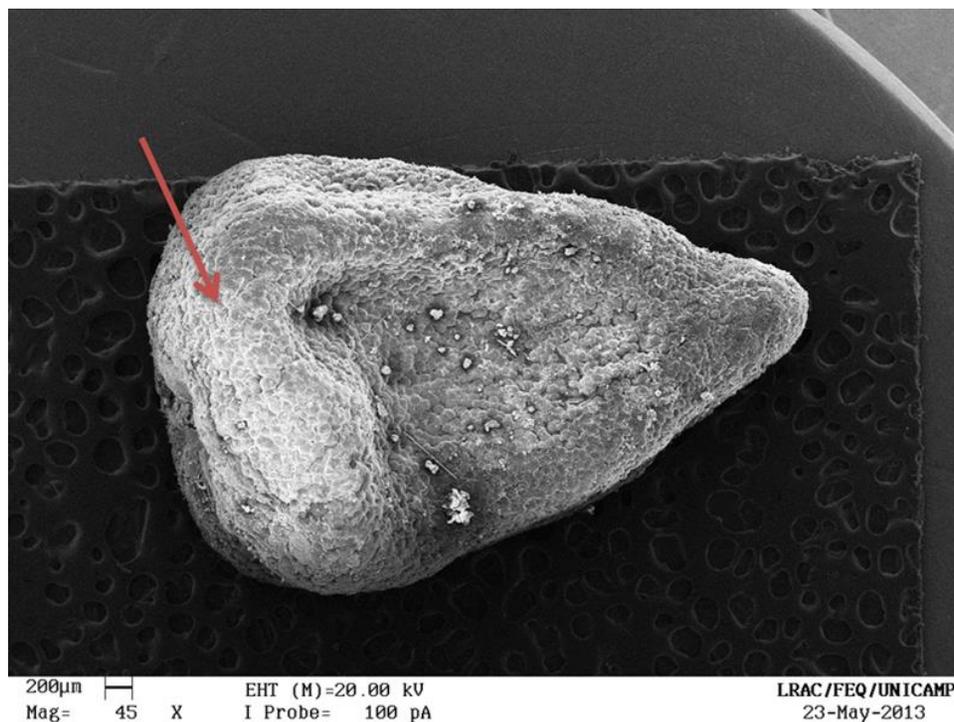


(a)

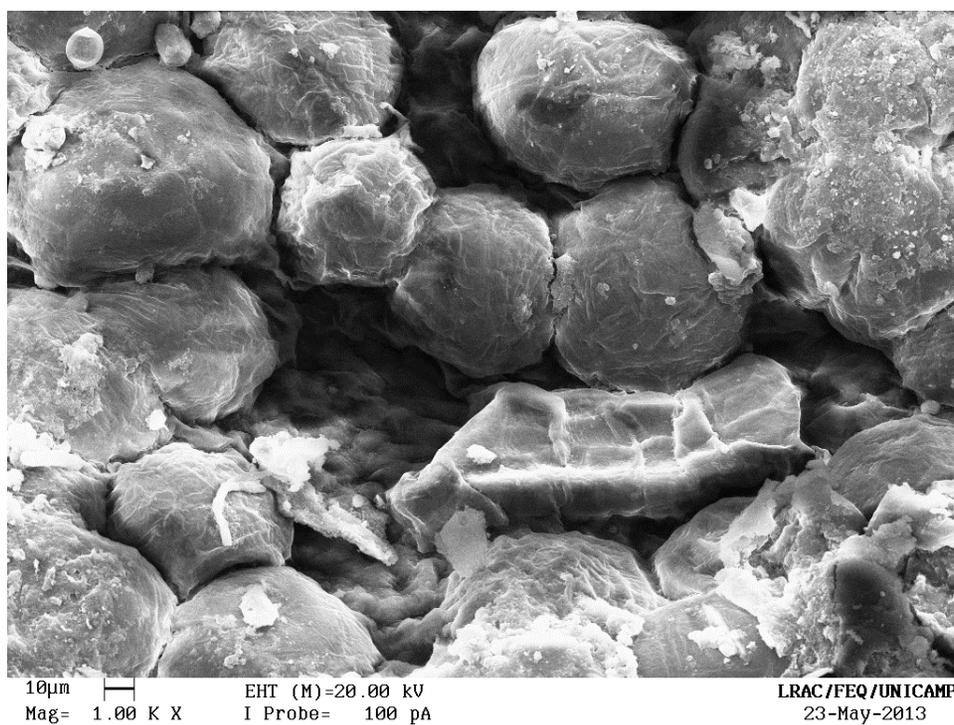


(b)

Figura 5. 12 - Semente de Urucum desengordurada após extração com etanol a 60 °C/LPSE por 95 minutos (Cinéticas II), com aumento de 45x; (a) e com aumento de 1000x.



(a)



(b)

Figura 5. 13 - Semente de Urucum *in natura* após extração com etanol a 60 °C/LPSE por 95 minutos (Cinética III), com aumento de 45x (a) e com aumento de 1000x (b).

As Figuras 5.12 (a) e (b) são micrografias de sementes desengorduradas após extração de bixina durante 95 minutos a 60°C/LPSE/Etanol (amostra 6, Tab. 5.13). Ao comparar com as Figuras 5.11 (a) e (b) pode-se inferir que a temperatura influencia na fragmentação dessa superfície, pois foram usadas as mesmas condições de extração em temperaturas diferentes, e à temperatura de 60°C houve danos maiores. Nas Figuras 5.13 (amostra 7, Tab. 5.13), aparentemente a superfície se manteve íntegra, o que indica que o pré-tratamento SFE enfraqueceu essa estrutura, o que facilitou sua remoção na etapa de extração subsequente. De acordo com França e Meireles (2000), o pré-processamento do substrato sólido promove a ruptura de parte das paredes celulares; por isso a matriz sólida que passa por processo SFE, irá conter tanto células inteiras como rompidas. Então, para alguns materiais sólidos, o pré-tratamento sofrido durante o SFE resulta em aproximadamente 100 % de ruptura das células, como aconteceu na extração de carotenoides de óleo de fibra de palma.

Observa-se a diferença entre as Figuras 5.13 (a) e (b) que não passaram pelo pré-tratamento com SFE (etapa de desengorduramento), e as Figuras 5.12 (a) e (b) que foram desengorduradas, ambas passaram pelo mesmo processo de extração: LPSE/60 °C/ Etanol, no entanto as sementes sem pré-tratamento o arilo da semente de Urucum se manteve como o da semente *in natura* (Figuras 5.7 (a) e (b)), e nas sementes com pré-tratamento a superfície foi substancialmente deslocada.

As micrografias auxiliaram na interpretação dos resultados para os métodos utilizados sobre o rendimento de extração de bixina RB (% , b.s.). Alguns autores já afirmavam que a bixina se encontra no arilo da superfície das sementes do Urucum. Nobre *et al.* (2006) afirmou que o rendimento em pigmentos não aumentou com a moagem das sementes, possivelmente devido à localização desses compostos na superfície das mesmas.

Das três condições selecionadas para realizar as cinéticas, o melhor rendimento em extração de bixina RB (% , b.s.) foi na Cinética II (LPSE/60 °C/UM-D), cujos resíduos avaliados por MEV estão representados pelas Figuras 5.12 (a) e (b).

Há na literatura outros métodos que atingem a superfície da semente, como atrito e agitação, que também apresentam bons rendimentos, o que comprova que a superfície que

contem a bixina, vista nas micrografias, deve ser retirada ao máximo para resultar em bons rendimentos. Souza (2000) avaliou a extração úmida por atrito e secagem em leito de jorro, utilizando sementes moídas e água na proporção de 1:3 (massa/volume), o material contendo o corante foi separado das sementes, colocado em um recipiente e aquecido em ebulição até que toda água fosse eliminada. Em seguida, o material obtido foi liofilizado e o teor médio de bixina encontrado nos corantes produzidos variou entre 31 % a 46 %.

Nos testes preliminares de extração (Tabela 5.3) o uso da água em condições ambientes, com agitação manual (a cada 1 minuto, durante 20 minutos), proporcionou RB de aproximadamente 24 %, já nos experimentos para determinação do X_0 por LPSE usando água não houve bom rendimento, o que indica que a agitação foi uma variável significativa. Santos (2007) realizou a extração de bixina de sementes de Urucum utilizando água na proporção de 1:2 (massa:volume), nos tempos de duas e quatro horas. O tempo de agitação mostrou ser uma variável que interfere no processo, elevando o rendimento da extração de 4,86% para 14,83%, quando este passa de duas para quatro horas.

O uso de sementes previamente desengorduradas por $scCO_2$ como matéria-prima facilitou o desalojamento e posterior separação da camada resinosa da semente, onde se encontra a maior parte dos carotenóides, proporcionando rendimentos de extração de bixina de aproximadamente 28 % (LPSE/60°C/Etanol), sem a necessidade de agitação ou atrito, em um sistema de extração simples por percolação.

6 – CONCLUSÕES

Os parâmetros e técnicas selecionados para os experimentos de extração possibilitaram a quantificação dos rendimentos X_0 e RB. Os melhores rendimentos foram obtidos com a utilização de técnicas simples para a extração de bixina em sementes desengorduradas. Como foi observado nos resultados das OECs e ilustrado pelas micrografias, o uso de pré-tratamento com CO_2 supercrítico para extrair o óleo alterou as características da matéria-prima, pois o arilo da semente após a SFE foi facilmente removido pela extração por percolação com solvente LPSE. Ao realizar extração nas mesmas condições com a semente sem o pré-tratamento o arilo se manteve íntegro.

As extrações por PLE operando com $S/F = 10$, possibilitaram máximo rendimento em 60°C e 10 MPa, com valores de 7,22 (% b.s.) para rendimento global (X_0), e 9,07 (% b.s.) em rendimento de extração de bixina (RB), nenhuma das variáveis testadas (pressão, temperatura e S/F) foi significativa de acordo com a análise de variância (95% de confiança). Para as extrações LPSE somente a variação do solvente resultou em diferenças significativas no rendimento global X_0 (% b.s.) e no rendimento de extração de bixina RB (% b.s.). O etanol foi o melhor solvente de extração. Os maiores rendimentos obtidos foram com LPSE-C/40 °C (assistida por ultrassom durante toda extração) com valores de $X_0 = 13,6$ (% b.s.) e $\text{RB} = 31,62$ (% b.s.).

O uso de etanol pressurizado resultou em rendimentos menores de extração de bixina ao se comparar com as extrações com etanol em LPSE. O etanol é fracamente polar, e ao ser pressurizado pode ter tido alterada a sua polaridade, o que dificultou a solubilização da bixina.

O uso do ultrassom não teve efeito significativo nos rendimentos, mas não se deve descartar sua utilização, pois a efetividade do ultrassom no banho é prejudicado pela falta de uniformidade na distribuição da energia ultrassônica e diminuição da potência com o tempo. Entretanto, o efeito ultrassônico foi verificado nas micrografias, que mostra que a

cavitação na superfície da semente pode ter auxiliado a extração. Neste contexto, o uso de sonda ultrassônica poderia tornar mais eficaz as extrações por PLE.

Nos experimentos realizados se verificou que é mais viável o uso de temperaturas próximas a 60°C, pois houve diferença significativa de RB ao se variar a temperatura nas extrações a baixa pressão. Esta evidência é confirmada pela literatura que diz que quanto maior a temperatura, maior o rendimento de extração de bixina, pois com o aquecimento a cis-bixina é convertida à forma mais solúvel, trans-bixina. Mas tanto o uso de temperaturas maiores quanto o uso de ultrassom devem ter resultados significativos nos rendimentos, caso contrário não seria justificável o aumento no gasto energético.

Ao utilizar como matéria-prima sementes previamente desengorduradas com scCO₂ foi possível um melhor processamento da matéria-prima, pois as sementes desengorduradas apresentaram uma superfície mais frágil e dessa forma se conseguiu bons rendimentos usando técnicas simples de percolação com solvente a baixa pressão.

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar extrações com sonda ultrassônica das sementes desengorduradas, e no melhor rendimento realizar cinética e comparar com as sementes *in natura*.
- Realizar análise de HPLC dos extratos nas melhores condições encontradas anteriormente LPSE e dos UAE (por sonda ultrassônica), para avaliar a pureza desses em relação à bixina.
- Determinar o custo de manufatura (COM) das etapas de extração de bixina com melhores rendimentos e compará-los para escolher o mais viável economicamente.
- Formar partículas com os extratos obtidos da etapa de extração de bixina já otimizada.
- Estimar o COM total de processo, somando o COM já encontrado na literatura (Albuquerque e Meireles, 2012) para a etapa de pré-tratamento, com a etapa de extração e formação de partículas, e encontrar um custo de manufatura total para os dois produtos (óleo e extrato de bixina).

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, F. C. Determinação Multiresíduo de pesticidas em cenouras utilizando extração com líquido pressurizado e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. 2006. 122 **Mestrado** Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ALBUQUERQUE, C. L. C. Obtenção de sementes desengorduradas e de óleo rico em tocotrienóis de Urucum por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica. 2013. 258 **Doutorado** Faculdade de Engenharia de Alimentos/Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 86-95, 2012.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists, Official of Analysis. **Liv.** 16th ed., Washington, 1997.

BITTENCOURT, C.; MARCELLA P.; FELICISSIMO, P. F. JEAN-JACQUES, H. L. ToF-SIMS characterization of thermal modifications of bixin from Bixa orellana fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6195-6200, 2005.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. **Liv.** Varela, 1992.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). **Science**, v. 300, n. 5628, p. 2089-2091, 2003.

BRAGA, M. E.; LEAL; P. F., CARVALHO, J. E.; MEIRELES, M. A. A. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6604-6611, 2003.

BRASIL. Resolução nº 44 – CNNPA (1977). Brasília, DF, p. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção e alimentos e bebidas., 1978. Acesso em: <http://www.anvisa.gov.br>.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids. Volume 1B: **Spectroscopy**. Birkhäuser Verlag AG, 1995.

- BROGLE, H. CO₂ as a solvent: its properties and applications. **Chemistry and Industry**, p. 385-390, 1982.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1, p. 21-33, 2005.
- CANTO, W.L. do; OLIVEIRA, V.P.; CARVALHO, P.R.N.; GERMER, S.P.M.. Produção e mercado de Urucum no Brasil. Campinas: ITAL, p. 8-19, 1991.
- CHAO, R. R.; MULVANEY, S. J; SANSON, D. R.; HISIEH, F; TEMPESTA, M. S. Supercritical CO₂ extraction of annatto (*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the color extracts. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 80-83, 1991.
- CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Effect of solvent type on the extractability of bioactive compounds, antioxidant capacity and colour properties of natural annatto extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 9, p. 1863-1870, 2011.
- DEGNAN, A.; ELBE, J. V.; HARTEL, R. Extraction of annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1655-1659, 1991.
- FAO, J. F. W. E. C. O. F. A. Compendium of Food Additive Specifications: Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives: 67th Meeting 2006. Bernan Assoc, 2006.
- FONTANA, J. D. et al. Carotenóides. **Biotechnol Ciênc Desenvol**, v. 13, p. 40-45, 2000.
- FRANCA, L.F.; MEIRELES, M.A.A., Modeling the extraction of carotene and lipids from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂, **Journal of Supercritical Fluids**, v.18, p. 35-47, 2000.
- FRANCO, C. F. O. EMEPA extrai do urucum o mais elevado teor de corante do Brasil. 13 de julho de 2007. Available in: < <http://www.paraiba.pb.gov.br/> >, Access in 09/05/2012.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **XI MET**, p. 34, 2006.
- GOMES, S. D. S.; BRUNO, R. Influência da temperatura e substratos na germinação de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 47-50, 1992.
- Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE. Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes. Rio de Janeiro. 37 2010.
- KORN, M.; PEREIRA, M.; BORGES, S. Algumas Aplicações Analíticas dos Ultra-sons. Bol. **Sociedade Portuguesa de Química**. Lisb, v. 96, p. 51-56, 2005.

R. LESS. Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis. Acribia, Zaragoza, pp. 18-20, 103–185, 1979.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F.. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal Veterinary Res Animal Sciece**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

MALDONADE, I. R. Produção de carotenoides por leveduras. 2003. **Doutorado** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas., Campinas.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from Latin American plants. **Liv**. Boca Raton: CRC Press–Taylor & Francis Group, 2008.

MENDES, R.L.; NOBRE, B.P.; CARDOSO, M.T.; PEREIRA, A.P.; PALAVRA, A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, v. 356, p. 328-334, 2003.

MERCADANTE, A. Z.; PFANDER, H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 193-196, 2001.

MONTES, C.; VICÁRIO, I.M.; RAYMUNDO, M.; FETT, R.; HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). **Food Research International**, v. 38, n. 8–9, p. 983-988, 2005.

NASCENTES, C. C.; KORN, M.; SOUSA, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **Journal-Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p. 57-63, 2001.

NOBRE, B. P.; MENDES, R. L.; QUEIROZ, E. M.; PESSOA, F. L. P. ; COELHO, J. P.; PALAVRA, A. F. Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from *Bixa orellana* seeds (experiments and modeling). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 251-258, 2006.

OLIVEIRA, J. S. Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.). 2005. **Doutorado** Departamento de Engenharia Química e de Alimentos/CT, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ONSAGER, L. Electric Moments of Molecules in Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, n. 8, p. 1486-1493, 1936/08/01 1936.

OSTER, G.; KIRKWOOD, J. G. The Influence of Hindered Molecular Rotation on the Dielectric Constants of Water, Alcohols, and Other Polar Liquids. **The Journal of Chemical Physics**, v. 11, n. 4, p. 175, 1943.

PIÑEIRO, Z.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1, p. 19-23, 2004.

PINGRET, D., FABIANO-TIXIER, A. S., BOURVELLEC, C. L., RENARD, C. M., CHEMAT, F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n.1, p. 73-81, 2012.

PLAZA, M., SANTOYO, S., JAIME, L., AVALO, B., CIFUENTES, A., REGLERO, G., IBÁÑEZ, E. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 245-253, 2012.

PÓVOA, M. Extração do corante de urucum (*Bixa orellana* L.) com diversos solventes. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 153-157, 1992.

PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P. Efeito do pH na quantidade de bixina obtida em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 182-187, 1992.

PRESTON, H.; RICKARD, M. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 47-56, 1980.

RICHTER, G. et al. Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 6, p. 2022-2028, 1997.

ROCHA GARCIA, C.E. BOLOGNESI, V.J.; DIAS, GASPARI, J. DE F. M.; GOMES, O.; COSTA, K. C. Bixina e norbixina: os pigmentos do urucum (*Bixa orellana* L.) utilizados na indústria cárnea. **Revista Nacional da Carne**, v.401, p.14-22, 2010.

RODRIGUES, V.M., SOUSA, E.M.B.D., MONTEIRO, A.R, CHIAVONE-FILHO, O., MARQUES, M.O.C, MEIRELES, M.A.A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+ solute+ solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, n. 1, p. 21-36, 2002.

ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994–2003). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 109-117, 2005.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J. A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2-29, 2009.

SANDLER, S. I. Chemical, biochemical, and engineering thermodynamics. **Liv.** John Wiley & Sons Hoboken, NJ, 2006.

SANTOS, D. T., ALBARELLI, J. Q., BEPPU, M. M., & MEIRELES, M. A. A. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. **Food Research International**, 2011.

SANTOS, D. T.; ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Antioxidant dye and pigment extraction using a homemade pressurized solvent extraction system. In: SARAVACOS, G., *et al* (Ed.). 11th International Congress on Engineering and Food. Amsterdam: Elsevier Science Bv, v.1, 2011. p.1581-1588. (**Procedia Food Science**).

SANTOS, J. A. B. D. Análise comparativa entre técnicas de processamentos para extração de pigmentos nas sementes de urucum. 2007. 185 **Doutorado** Engenharia de processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina grande.

SARON, C.; FELISBERTI, M.I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.

SHIBATA, S. K.; SANDLER, S. I. High pressure vapor-liquid equilibria of mixtures of nitrogen, carbon dioxide, and cyclohexane. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 34, n. 4, p. 419-424, 1989.

SILVA, G. F., GAMARRA, F., OLIVEIRA, A. L., & CABRAL, F. A. Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 2, p. 419-426, 2008.

SILVA, P. I. Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). 2007. 145 **Mestrado** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, S. D. N. S.; AMARAL, C. L. F.; REBOUÇAS, T. N. Adoção das práticas de conservação on farm e de seleção de variedades pelos produtores de urucum no município de Vitória da Conquista–BA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 106-113, 2010.

SOUZA, E. C. Estudo químico e físico-químico dos pigmentos do urucum (*Bixa Orellana*) utilizando metodologia simplificada. 2000. 45 **Mestrado** Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STRAUB, O.; PFANDER, H. Key to carotenoids. **Liv.** Birkhäuser Verlag Basel, 1987.

TAKEUCHI, T. M.; PEREIRA, C. G.; BRAGA, M. E. M.; MARÓSTICA, J., M. R.; LEAL, P. F.; MEIRELES, M. A. A. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. Extracting **Bioactive Compounds for Food Products**, p. 137-218, 2009.

VARDANEGA, R. Obtenção de saponinas de raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) por extração dinâmica a baixa pressão assistida por ultrassom. 2013. 104 **Mestrado** Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VATAI, T.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 2, p. 246-254, 2009.

VEGGI, P. C. Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom. 2013. 190 **Doutorado** Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VEGGI, P. C.; CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A. Modifier effects on Supercritical Fluid Extraction (SFE) of some Brazilian plants: Antioxidant activity and Economical evaluation. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1717-1724, 2011.

VEGGI, P. C., SANTOS, D. T., FABIANO-TIXIER, A. S., LE BOURVELLEC, C., MEIRELES, M. A. A., & CHEMAT, F. Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Jatoba (*Hymenaea courbaril* L. var *stilbocarpa*) Bark. **Food and Public Health**, v. 3, n. 3, p. 119-129, 2013.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

9 – ANEXOS

9.1 – Resultados experimentais

9.1.1 – Cinéticas de extração

Tabela 9. 1 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/50 °C.

Tempo (min.)	extrato (g)	Rendimento global acumulado (%)	Bixina extrato(%)	Bixina extraída (g)
5	0,1154	4,36	2,23	0,0025
10	0,0446	6,04	7,30	0,0032
15	0,0257	7,01	6,88	0,0017
20	0,03	8,14	2,78	0,0008
25	0,0194	8,88	3,50	0,0006
30	0,0165	9,50	3,49	0,0005
35	0,0149	10,06	3,28	0,0004
40	0,0157	10,66	2,94	0,0004
45	0,0269	11,67	1,92	0,0005
55	0,0314	12,86	3,12	0,0009
65	0,0231	13,73	4,01	0,0009
75	0,0186	14,43	4,52	0,0008
85	0,0189	15,15	3,60	0,0006
95	0,0154	15,73	3,67	0,0005

Tabela 9. 2 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/50 °C. (duplicata)

Tempo (min.)	extrato (g)	Rendimento global acumulado (%)	Bixina (%)	Bixina extraída (g)
5	0,0664	2,49	16,14	0,0107
10	0,0335	3,76	2,60	0,0008
15	0,0468	5,52	1,75	0,0008
20	0,0506	7,42	1,42	0,0007
25	0,025	8,36	2,40	0,0006
30	0,0288	9,45	1,96	0,0005
35	0,0815	12,52	1,06	0,0008
40	0,0435	14,15	1,69	0,0007
45	0,0232	15,03	2,67	0,0006
55	0,0802	18,05	1,29	0,0010
65	0,0283	19,11	3,33	0,0009
75	0,0369	20,50	2,04	0,0007
85	0,0301	21,64	2,42	0,0007
95	0,0352	22,96	1,50	0,0005

Tabela 9. 3 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60°C.

Tempo	extato (g)	Rendimento global acumulado (%)	Bixina (%)	Bixina extraída (g)
5	0,0652	2,45	4,44	0,0029
10	0,0898	5,83	3,82	0,0034
15	0,0224	6,67	4,94	0,0011
20	0,0569	8,81	1,00	0,0005
25	0,0388	10,27	1,32	0,0005
30	0,0429	11,88	1,23	0,0005
35	0,0667	14,39	0,64	0,0004
40	0,0754	17,23	0,56	0,0004
45	0,0227	18,09	1,44	0,0003
55	0,0259	19,06	2,15	0,0005
65	0,0635	21,45	0,83	0,0005
75	0,0228	22,31	1,99	0,0004
85	0,0728	25,05	0,57	0,0004
95	0,045	26,74	0,87	0,0003

Tabela 9. 4 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60 °C. (duplicata)

Tempo (min.)	extrato (g)	Rendimento global acumulado (%)	Bixina (%)	Bixina extraída (g)
5	0,0554	2,10	10,33	0,0057
10	0,0305	3,26	3,48	0,0010
15	0,0174	3,92	4,82	0,0008
20	0,0254	4,88	4,14	0,0010
25	0,0957	8,52	0,66	0,0006
30	0,0999	12,31	0,53	0,0005
35	0,0963	15,97	0,49	0,0004
40	0,035	17,29	1,23	0,0004
45	0,0912	20,76	0,41	0,0003
55	0,0998	24,55	0,55	0,0005
65	0,0173	25,20	3,11	0,0005
75	0,0282	26,27	11,25	0,0031
85	0,0115	26,71	8,02	0,0009
95	0,0178	27,39	4,01	0,0007

Tabela 9. 5 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60 °C/*in natura*.

Tempo (min.)	extrato (g)	Rendimento global acumulado (%)	Bixina (%)	Bixina extraída (g)
5	0,0516	1,93	2,89	0,0014
10	0,0217	2,74	4,03	0,0008
15	0,0275	3,77	3,23	0,0008
20	0,0129	4,26	4,18	0,0005
25	0,0206	5,03	2,59	0,0005
30	0,0192	5,75	2,63	0,0005
35	0,12	10,24	0,41	0,0004
40	0,0137	10,76	1,77	0,0002
45	0,0152	11,33	2,59	0,0003
55	0,0244	12,24	2,39	0,0005
65	0,0162	12,85	3,96	0,0006
75	0,0294	13,95	1,47	0,0004
85	0,0246	14,87	1,46	0,0003
95	0,029	15,96	1,11	0,0003

Tabela 9. 6 - Dados experimentais obtidos nas condições de LPSE/60 °C/engorduradas.
(duplicata)

Tempo (min.)	extrato (g)	Rendimento global acumulado (%)	Bixina (%)	Bixina extraída (g)
5	0,0516	1,69	6,17	0,0031
10	0,0217	2,40	2,81	0,0006
15	0,0275	3,30	2,26	0,0006
20	0,0129	3,72	5,07	0,0006
25	0,0206	4,40	2,16	0,0004
30	0,0192	5,03	2,15	0,0004
35	0,12	8,96	0,44	0,0005
40	0,0137	9,41	2,22	0,0003
45	0,0152	9,91	1,84	0,0002
55	0,0244	10,71	2,17	0,0005
65	0,0162	11,24	3,08	0,0005
75	0,0294	12,21	1,40	0,0004
85	0,0246	13,02	1,59	0,0003
95	0,029	13,97	1,30	0,0003

9.1.2 – Procedimento do ajuste dos dados experimentais

O procedimento para o ajuste dos dados experimentais da OECs 50 °C/LPSE/UM-D, 60 °C/LPSE/UM-D e 60 °C/LPSE/UM-IN a um *spline* de três e duas linhas retas foi realizado da seguinte forma: inicialmente, utilizou-se o procedimento PROC REG (Tabela 9.7) para estimar os valores dos coeficientes lineares, que no programa são nomeados como Intercept (b_0), tmin (b_1), AL1 (b_2), e AL2 (b_3). Posteriormente, utilizaram-se estes dados como valores de entrada para o procedimento PROC NLIN (Tabela 9.9). Os valores iniciais dos parâmetros knot1 e knot2 foram estimados pela visualização da curva obtida do primeiro ajuste da cinética de extração, feito pelo procedimento PROC REG. Posteriormente, foram obtidos os valores do modelo ajustado, onde knot1 e knot2 são os parâmetros cinéticos t_{CER} e t_{FER} , respectivamente. Os dados ajustados fornecidos pelo aplicativo foram plotados em termos de rendimento em extrato, em base seca, em função do tempo de extração e S/F. A seguir são mostradas as rotinas de programação e as informações de saída do software SAS 9.2.

Tabela 9. 7 - Rotina de programação usada no SAS 9.2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (60 °C/LPSE/UM-D) a um spline de 3 linhas retas: PROC REG

```

options ls=80 ps=50;
Title 'CNT60°C-LPSE';
data Cin 1;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-20,0);
AL2 = max(tmin-45,0);
Cards;
5      1.69
10     2.40
15     3.30
20     3.72
25     4.40
30     5.03
35     8.96
40     9.41
45     9.91
55     10.71
65     11.24
75     12.21
85     13.02
95     13.97
5      2,10
10     3.26
15     3.92
20     4.88
25     8.52
30     12.31
35     15.97
40     17.29
45     20.76
55     24.55
65     25.20
75     26.27
85     26.71
95     27.39
Proc Reg;
Model mext = tmin AL1 AL2;
Output out = a p=mexthat r=Mres;
Proc print;
Axis1 order = (0 to 30.0 by 0.5);
Proc gplot; Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color =
black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mexthat*tmin/legend
overlay vaxis = axis1;
Run;

```

Tabela 9. 8 - Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.).

```

PROC REG.
CNT60°C-LPSE
The REG Procedure
Model: MODEL1
Dependent Variable: rend
Analysis of Variance

```

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1775.73057	591.91019	121.44	<.0001
Error	24	116.97848	4.87410		
Corrected Total	27	1892.70905			

```

Root MSE          2.20774  R-Square    0.9382
Dependent Mean    14.29359  Adj R-Sq   0.9305
Coeff Var         15.44565

```

```

Parameter Estimates

```

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	0.93360	1.80592	0.52	0.6099
tmin	1	0.26098	0.11756	2.22	0.0361
AL1	1	0.22482	0.15471	1.45	0.1591
AL2	1	-0.38588	0.08432	-4.58	0.0001

```

CNT60°C-LPSE

```

Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	5	2.4998	0	0	2.2385	0.26134
2	10	3.7610	0	0	3.5434	0.21765
3	15	5.5230	0	0	4.8483	0.67469
4	20	7.4280	0	0	6.1532	1.27479
5	25	8.3692	5	0	8.5822	-0.21302
6	30	9.4534	10	0	11.0112	-1.55777
7	35	12.5217	15	0	13.4402	-0.91847
8	40	14.1594	20	0	15.8692	-1.70979
9	45	15.0329	25	0	18.2982	-3.26537
10	55	18.0522	35	5	21.2268	-3.17460
11	65	19.1177	45	15	22.2260	-3.10834
12	75	20.5069	55	25	23.2252	-2.71830
13	85	21.6401	65	35	24.2244	-2.58428
14	95	22.9653	75	45	25.2235	-2.25825
15	5	2.1036	0	0	2.2385	-0.13491
16	10	3.2617	0	0	3.5434	-0.28170
17	15	3.9224	0	0	4.8483	-0.92590
18	20	4.8868	0	0	6.1532	-1.26633
19	25	8.5206	5	0	8.5822	-0.06154
20	30	12.3139	10	0	11.0112	1.30272
21	35	15.9705	15	0	13.4402	2.53030
22	40	17.2995	20	0	15.8692	1.43026
23	45	20.7624	25	0	18.2982	2.46418
24	55	24.5519	35	5	21.2268	3.32506
25	65	25.2088	45	15	22.2260	2.98278
26	75	26.2796	55	25	23.2252	3.05437
27	85	26.7162	65	35	24.2244	2.49186
28	95	27.3921	75	45	25.2235	2.16856

Tabela 9. 9 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (60 °C/LPSE/UM-D) a um spline de 3 linhas retas: PROC NLIN

```

options ls=80 ps=50;
Title 'CNT60°C-LPSE';
data Cin 1;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-20,0);
AL2 = max(tmin-45,0);
Cards;
5      1.69
10     2.40
15     3.30
20     3.72
25     4.40
30     5.03
35     8.96
40     9.41
45     9.91
55     10.71
65     11.24
75     12.21
85     13.02
95     13.97
5      2,10
10     3.26
15     3.92
20     4.88
25     8.52
30     12.31
35     15.97
40     17.29
45     20.76
55     24.55
65     25.20
75     26.27
85     26.71
95     27.39
Proc Nlin;
Parms
b0 = 0.22482
b1 = 0.26098
b2 = 0.93360
b3 = -0.38588
knot1 = 20
knot2 = 45;
AL1 = max(tmin-knot1,0);
AL2 = max(tmin-knot2,0);
Model rend = b0 + b1*tmin + b2*AL1 + b3*AL2;
Output out = a p=rendi r=Mrend;
Axis order = (0 to 30.0 by 0.5);
Proc print;
Proc gplot;
Plot Mrend*rendi;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black;
Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;

```

Tabela 9. 10 - Dados de saída do procedimento PROC NLIN do software SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.).

CNT60°C-LPSE							
The NLIN Procedure							
Dependent Variable rend							
Method: Gauss-Newton							
Iterative Phase							
Iter	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2	Sum of Squares
0	0.9336	0.2610	0.2248	-0.3859	20.0000	50.0000	117.0
1	1.0909	0.2421	0.2374	-0.3818	18.6676	50.4736	116.9
2	1.0909	0.2421	0.2374	-0.3818	18.7384	50.4786	116.9

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.003791
Object	0.000048
Objective	116.8892
Observations Read	28
Observations Used	28
Observations Missing	0

Source	Sum DF	Mean Squares	Approx Square	F Value	Pr > F
Model	5	1775.8	355.2	66.85	<.0001
Error	22	116.9	5.3131		
Corrected Total	27	1892.7			

Approx

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate 95% Confidence Limits		
b0	1.0909	2.4897	-4.0724	6.2543	
b1	0.2421	0.2305	-0.2359	0.7201	
b2	0.2374	0.2433	-0.2672	0.7420	
b3	-0.3818	0.0934	-0.5756	-0.1881	
knot1	18.7384	10.7670	-3.5909	41.0677	
knot2	50.4786	5.5765	38.9138	62.0435	

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	b3	knot1	knot2
b0	1.0000000	-0.9258201	0.8770580	-0.0000000	-0.5903269	-0.0000000
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9473309	0.0000000	0.7879026	0.0000000
b2	0.8770580	-0.9473309	1.0000000	-0.2671122	-0.6120640	-0.2107059
b3	-0.0000000	0.0000000	-0.2671122	1.0000000	-0.3498689	0.2213037
knot1	-0.5903269	0.7879026	-0.6120640	-0.3498689	1.0000000	-0.1946498
knot2	-0.0000000	0.0000000	-0.2107059	0.2213037	-0.1946498	1.0000000

CNT60°C-LPSE

Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
1	5	2.4998	0	0	2.3014	0.19840
2	10	3.7610	0	0	3.5119	0.24912
3	15	5.5230	0	0	4.7224	0.80057
4	20	7.4280	0	0	6.2324	1.19552
5	25	8.3692	5	0	8.6301	-0.26091
6	30	9.4534	10	0	11.0277	-1.57429
7	35	12.5217	15	0	13.4253	-0.90361
8	40	14.1594	20	0	15.8230	-1.66356
9	45	15.0329	25	0	18.2206	-3.18776
10	55	18.0522	35	5	21.2894	-3.23720
11	65	19.1177	45	15	22.2662	-3.14858
12	75	20.5069	55	25	23.2431	-2.73619
13	85	21.6401	65	35	24.2199	-2.57981
14	95	22.9653	75	45	25.1967	-2.23142
15	5	2.1036	0	0	2.3014	-0.19785
16	10	3.2617	0	0	3.5119	-0.25023
17	15	3.9224	0	0	4.7224	-0.80002
18	20	4.8868	0	0	6.2324	-1.34560
19	25	8.5206	5	0	8.6301	-0.10943
20	30	12.3139	10	0	11.0277	1.28621
21	35	15.9705	15	0	13.4253	2.54515
22	40	17.2995	20	0	15.8230	1.47649
23	45	20.7624	25	0	18.2206	2.54179
24	55	24.5519	35	5	21.2894	3.26246
25	65	25.2088	45	15	22.2662	2.94253
26	75	26.2796	55	25	23.2431	3.03649
27	85	26.7162	65	35	24.2199	2.49633
28	95	27.3921	75	45	25.1967	2.19539

9.2 – Isotermas das extrações PLE

As Figuras 9.1 e 9.2 ilustram respectivamente a variação do rendimento global (%) em diferentes condições de temperatura, pressão e S/F.

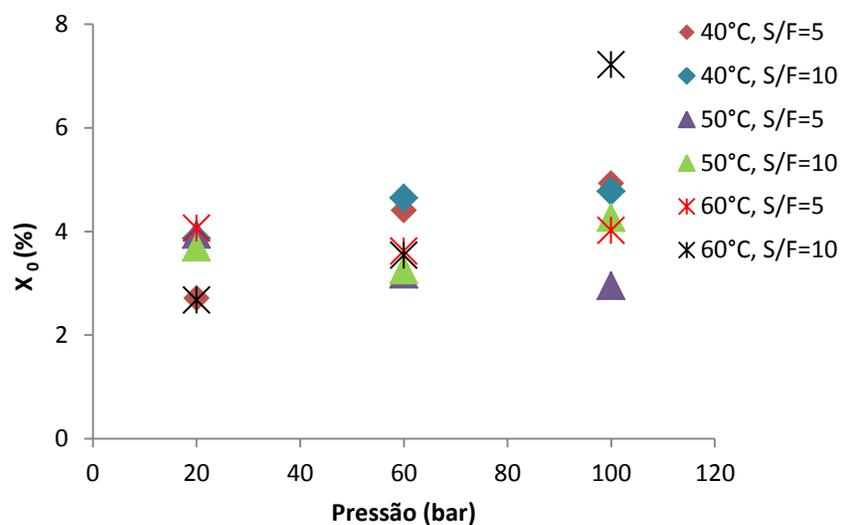


Figura 9.1 - Isotermas de rendimento global (%) para extrações com etanol pressurizado.

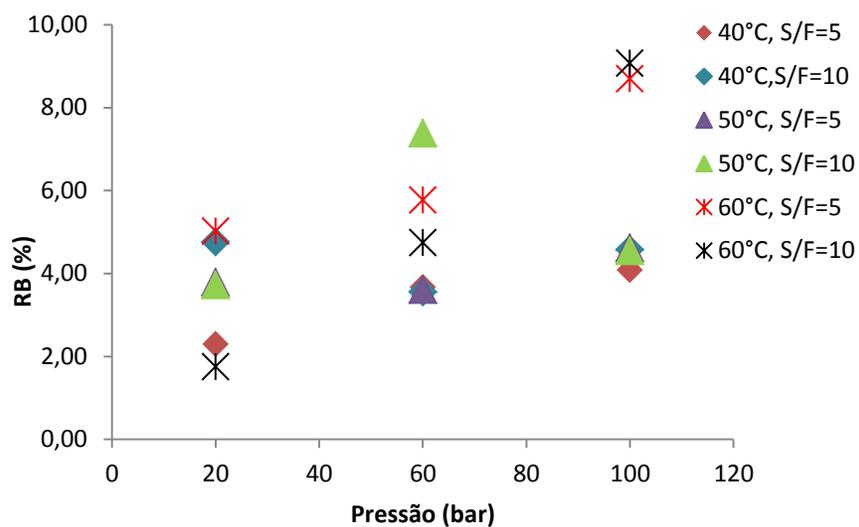


Figura 9.2 - Isotermas de rendimento de bixina (%) para extrações com etanol pressurizado.

9.3 – Curvas de extração LPSE

As Figuras 9.3 e 9.4 ilustram o comportamento das extrações LPSE em condições distintas.

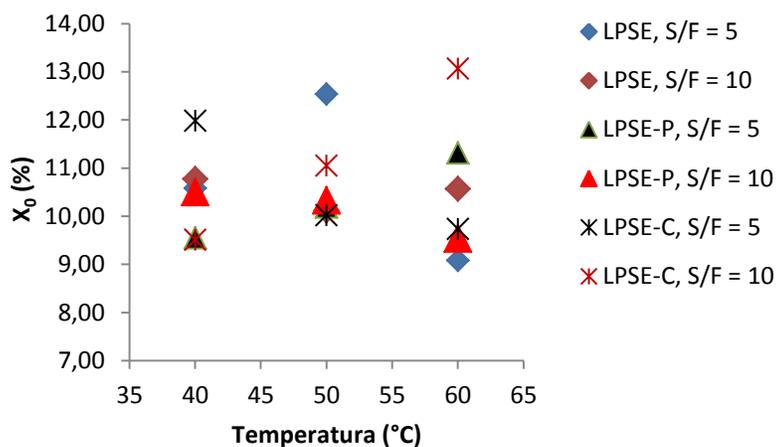


Figura 9.3 – X_0 (%) em extração a baixa pressão (LPSE), com ultrassom em pulsos (LPSE-P) e com ultrassom contínuo (LPSE-C) usando etanol como solvente.

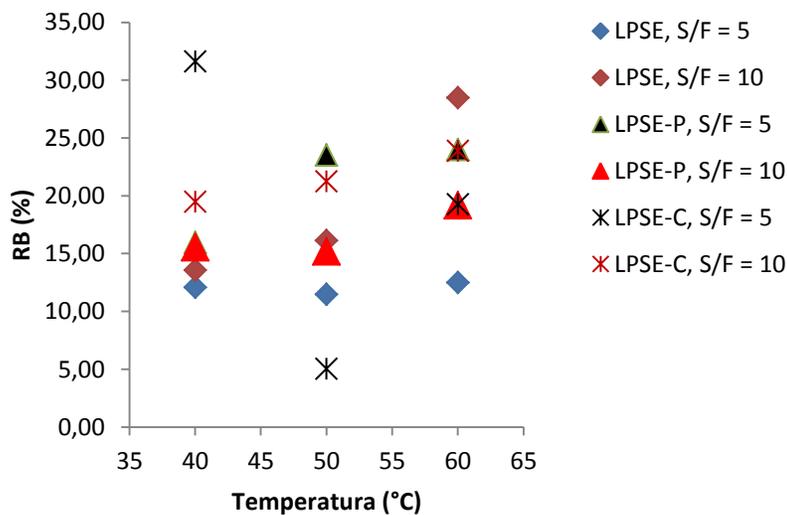


Figura 9.4 - Rendimento de bixina (%) em procedimentos de extração a baixa pressão (LPSE), com ultrassom em pulsos (LPSE-P) e com ultrassom contínuo (LPSE-C) usando etanol como solvente.

9.4 - Galeria de fotos

9.4.1 – Equipamento de extração PLE

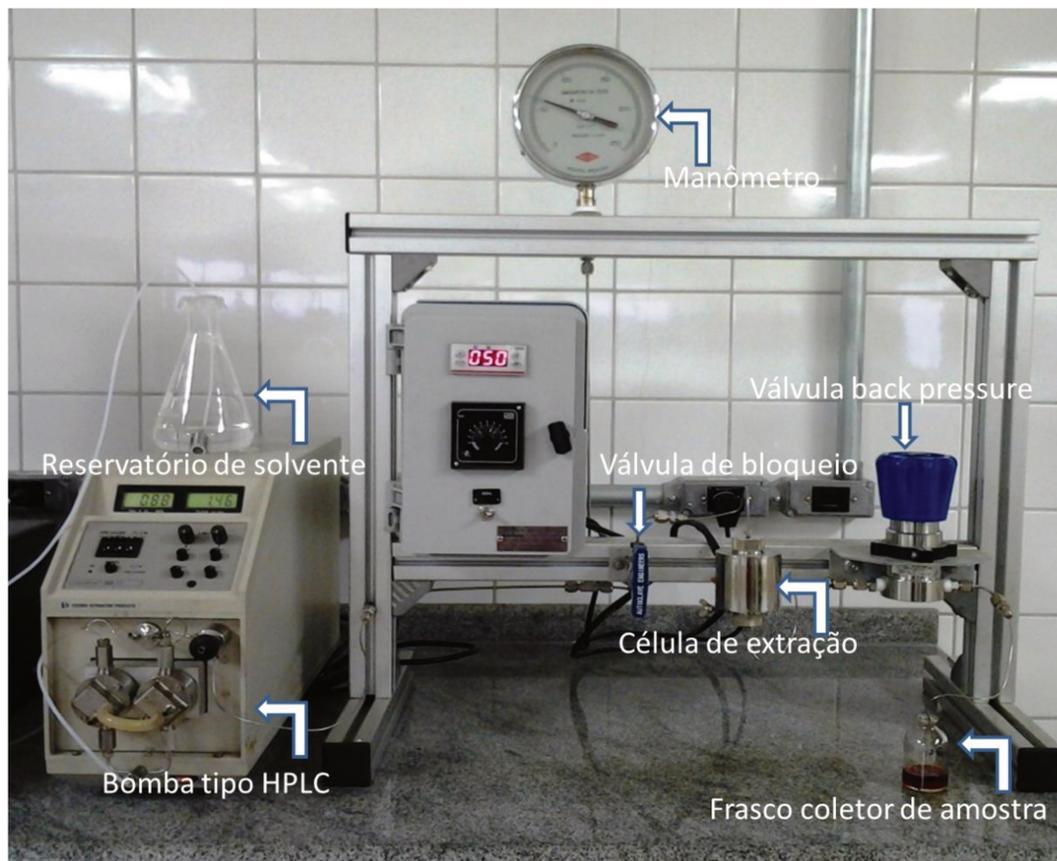


Figura 9.5 - Equipamento de extração com líquido pressurizado.

9.4.2 – Extratos obtidos nos experimentos LPSE

As Figuras 9.6 e 9.7 ilustram os extratos obtidos por LPSE usando água como solvente de extração. As Figuras 9.8 e 9.9 ilustram os extratos de LPSE usando etanol como solvente. Banho de ultrassom foi usado nessas extrações, e a Tabela 9.7 indica quais foram as condições de extração utilizadas.



Figura 9. 6 – Extratos de Urucum obtidos com água à baixa pressão, com diferentes S/F e temperaturas.



Figura 9. 7 - Extratos de Urucum obtidos com água LPSE-P a baixa pressão assistido por ultrassom em pulsos, em diferentes S/F e temperaturas.



Figura 9. 8 - Extratos de Urucum obtidos com água LPSE-C a baixa pressão assistido por ultrassom em toda extração, em diferentes S/F e temperaturas.



Figura 9. 9 - Extratos de Urucum obtidos com etanol LPSE à baixa pressão, em diferentes S/F e temperaturas.



Figura 9. 10 - Extratos de Urucum obtidos com etanol LPSE-P à baixa pressão assistido por ultrassom em pulsos, em diferentes S/F e temperaturas.



Figura 9. 11 - Extratos de Urucum obtidos com etanol LPSE-C à baixa pressão assistido por ultrassom durante toda extração, em diferentes S/F e temperaturas.

A legenda para as etiquetas afixadas nos frascos descrevendo os parâmetros de extração temperatura, ultrassom e S/F, está na Tabela 9.7.

Tabela 9. 11 - Legenda para os experimentos.

Experimento	Temperatura °C	Ultrassom	S/F (g/g)
1s	40	Sem	4
2s	40	Pulso	4
3s	60	Contínuo	4
4s	40	Pulso	8
5s	60	Sem	8
6s	40	Pulso	4
7s	50	Sem	8
8s	40	Pulso	8
9s	40	Contínuo	8
10s	60	Pulso	4
11s	60	Sem	4
12s	60	Contínuo	8
13s	60	Pulso	8
14s	50	Pulso	8
15s	60	Contínuo	4
16s	50	Pulso	8
17s	50	Contínuo	8
18s	50	Sem	8
19s	50	Pulso	4
20s	40	Contínuo	4
21s	60	Pulso	4
22s	40	Sem	4
23s	40	Sem	8
24s	50	Contínuo	8
25s	50	Contínuo	4
26s	50	Pulso	4
27s	50	Sem	4
28s	60	Contínuo	8
29s	50	Sem	4
30s	50	Contínuo	4
31s	40	Contínuo	8
32s	40	Sem	8
33s	60	Pulso	8
34s	40	Contínuo	4
35s	60	Sem	4
36s	60	Sem	8

9.4.3 – Cinéticas

As Figuras 9.12, 9.13 e 9.14 indicam respectivamente as Cinéticas I, II e III, nas quais as sementes foram submetidas à extração por até 95 minutos.



Figura 9. 12 - Cinética LPSE/50°C (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85 e 95 min.).



Figura 9. 13 - Cinética LPSE/60°C (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85 e 95 min.).



Figura 9. 14 - Cinética LPSE/60°C/engorduradas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 65, 75, 85 e 95 min.)

9.4.4 – Sementes de urucum

As Figuras 9.15, 9.16 e 9.17 ilustram, respectivamente, as sementes de Urucum *in natura*, desengorduradas e após Cinéticas I, II e III.



Figura 9. 15 - Sementes de Urucum *in natura* (UM-IN).



Figura 9. 16 - Sementes de Urucum por SFE (UM-D).



Figura 9. 17 - Sementes de Urucum desengorduradas após Cinética I (50°C).



Figura 9. 18 - Sementes de Urucum desengorduradas após Cinética II (60°C).



Figura 9. 19 - Sementes *in natura* (UM-IN) após Cinética III (60°C).

9.5 – Atividades acadêmicas

9.5.1 - Capítulo de livro aceito para publicação

Santos, D. T.; **Rodrigues, L. M.**; Torres, R. A. C.; Gomes, M. T. M. S.; Meireles, M. A. A.. Strategies for annatto seeds processing with pressurized fluids in food industries. In: In: Processed Foods: Quality, Safety Characteristics and Health Implications, Nova Science Publishers, 2013.

9.5.2 – Trabalhos completos apresentado em congresso

Rodrigues, L. M.; Alcázar-Alay, S. C.; Gomes, M. T. M. S.; Meireles, M. A. A. Pressurized liquid extraction (PLE) of bixin from defatted annatto seeds. III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA), *PROSCIBA 2013 proceedings*, 2013.

Alcázar-Alay, S. C.; **Rodrigues, L. M.**; Foster-Carneiro, Meireles, M. A. A. Pressurized water extraction (PWE) of annatto. III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA), *PROSCIBA 2013 proceedings*, 2013.

9.5.3 – Artigo submetido

Artigo submetido à revista Comptes rendus Chimie:

Autores: Rodrigues, L. M.; Alcázar-Alay, S. C.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A.

Título: Bixin extraction from defatted Annatto seeds.