



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química



EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CORANTES OBTIDOS DA SEMENTE DE
URUCUM (*Bixa orellana L.*)

KAROLYNA BARROS MIGUEL

Uberlândia- MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química



EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CORANTES OBTIDOS DA SEMENTE DE
URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Karolyna Barros Miguel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Miria Hespanhol Miranda Reis

Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso

Uberlândia- MG

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da
UFU com dados informados pelo(a) próprio(a)
autor(a).

M636 Miguel, Karolyna Barros, 1983-
2022 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CORANTES OBTIDOS DA
SEMENTE

DE URUCUM (Bixa orellana L.) [recurso
eletrônico] / Karolyna Barros Miguel. - 2022.

Orientadora: Miria Hespanhol Reis.

Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
de

Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em:

<http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.336> Inclui
bibliografia.

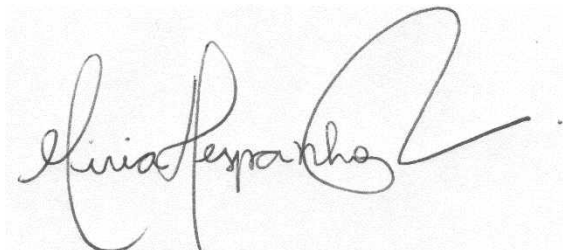
Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. I. Reis, Miria Hespanhol, 1978-
, (Orient.). II. Cardoso, Vicelma Luiz, 1960-
(Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

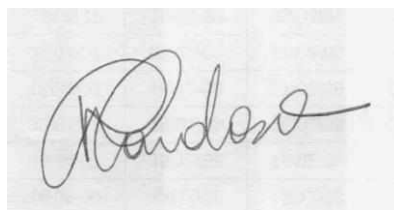
Gizele Cristine Nunes do Couto
CRB6/2091 Nelson Marcos Ferreira -
CRB6/3074

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.
UBERLÂNDIA, 08 de Julho de 2022.

Banca Examinadora



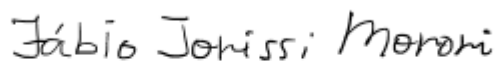
Prof. Dra Miria Espanhol Reis
Orientadora (PPGEQ/UFU)



Prof. Dra Vicelma Luiz Cardoso
Coorientadora (PPGEQ/UFU)



Prof. Dra. Juliana de Souza Vicente
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni
(FAMED/UFU)



Prof. Dr. Thiago Taham
(IFTM)

Dedico este trabalho a meu marido e filho,
pelo estímulo, companheirismo,
paciência, por todos os ensinamentos no
decorrer dessa trajetória e, acima de tudo,
pelo amor de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar minha vida e ter sua presença em todos os momentos.

Aos meus pais, Saulo e Márcia, por terem colocado, com muito amor, os estudos como prioridade em nossa casa. Agradeço pelos bons exemplos, pelas orientações nos momentos difíceis, pelo amor incondicional, pela ajuda quando mais precisei em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão e cunhada, Thiago e Loyse, pelo exemplo de bons profissionais e professores que vocês são e pelo incentivo na minha carreira acadêmica.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Henrique, não tenho palavras para descrever a gratidão em ter você na minha vida. Agradeço profundamente, de coração, por ter acreditado em mim e sempre me incentivando a voltar aos estudos. Dedico esse trabalho a você, que em meio a tantos desafios durante essa trajetória, esteve sempre ao meu lado, ajudando-me a seguir.

Ao meu pequeno Matheus, por toda força, coragem e amor que me fez sentir para finalizar esta etapa.

À minha orientadora Prof. Dra. Miria Hespanhol Miranda Reis pela oportunidade de ser minha orientadora na minha transição de carreira. Agradeço imensamente pelos ensinamentos, paciência, apoio, confiança e exemplo de profissional. Minha eterna gratidão!

À Prof. Dra. Vicelma Luiz Cardoso pelas valiosas sugestões para melhoria deste trabalho.

Aos professores membros da banca de qualificação, Prof. Dra. Juliana de Souza Ferreira e Prof. Thiago Taham pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram esse estudo.

À querida Suellen pela ajuda e paciência depois de tantos anos no mercado de trabalho e na volta para o laboratório.

Aos técnicos administrativos da Faculdade de Engenharia Química agradeço o auxílio.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG meus agradecimentos pelo suporte financeiro.

Aos amigos do NUCBIO que sempre estiveram dispostos a ajudar,

trocar conhecimentos e experiências (Flávia, Stella, Lidi, Amanda, Larissa, Aline, Kristopher). A todos os amigos que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa.”

(FREIRE, 2002, p. 69)

RESUMO

Atualmente a demanda do consumidor por produtos naturais tem crescido no cenário mundial. Há uma necessidade crescente da indústria alimentícia pela substituição de corantes sintéticos por naturais. O urucum é um fruto da árvore urucuzeiro, conhecida cientificamente como *Bixa orellana L.*, que é rico em carotenoides. Industrialmente é empregado em formulações farmacêuticas, cosméticas com grande capacidade antioxidante e em alimentos como corante natural em substituição aos aditivos químicos. Na porção externa das suas sementes encontra-se, como o principal carotenoide, a bixina. Muitos solventes orgânicos (etanol, clorofórmio, metanol, acetona) têm sido utilizados na extração dos carotenoides das sementes de urucum e neste trabalho explora-se a extração exclusiva com água que apresentou uma alternativa viável para o processo de extração e purificação da bixina. A água não é o melhor solvente para extração de bixina e possui pouca abordagem em estudos propostos na literatura utilizando-a como solvente, porém torna-se uma alternativa viável pelo baixo custo, menor impacto ambiental, maior disponibilidade e segurança na operação. A grande diversidade de técnicas para a extração da bixina das sementes do urucum acaba produzindo um extrato com impurezas como açúcares e proteínas. O mercado exige cada vez mais das indústrias um produto com elevado grau de pureza para que não haja risco de contaminações além de aproveitar suas propriedades medicinais. A melhoria das características do extrato das sementes de urucum pode ser realizada pelo processo de purificação utilizando membranas que permite a concentração e purificação do extrato e seus bioativos como fenólicos e atividade antioxidante. Este trabalho teve como principais objetivos fazer a extração do carotenoide bixina presente nas sementes de urucum através da extração clorofórmio, etanol e etanol:água (50:50) (v:v) e água, com posterior purificação pelo processo de filtração por membranas avaliando-se o teor de bixina, compostos fenólicos e atividade antioxidante. A água não foi o melhor solvente para extração, porém para a ultrafiltração se tornou importante no presente trabalho pois é menos agressiva e preserva o material da membrana em estudo. A extração de bixina foi realizada a 50°C em uma concentração de 1:30 (massa de sementes: volume solvente) por 60 min, porém para o clorofórmio utilizou-se um tempo de 240 min até completa exaustão dos pigmentos da semente para quantificação do teor total de bixina presente nas sementes. O extrato utilizando clorofórmio apresentou 10,34% de

bixina. O extrato utilizando etanol como solvente apresentou $8,69 \pm 0,04\%$ de bixina, $5,91 \pm 0,51$ mg EAG/ g de semente para teor de fenólicos, $266,42 \pm 4,19$ μM trolox/ L de extrato para atividade antioxidante pelo método FRAP e $137,91 \pm 12,01$ μM trolox/ L de extrato para atividade antioxidante pelo método ABTS. Para etanol: água (50:50) (v:v) como solvente apresentou $7,45 \pm 0,01\%$ de bixina, $2,908 \pm 0,007$ mg EAG/ g de semente de compostos fenólicos, $129,58 \pm 0,70$ μM trolox/ L de extrato para atividade antioxidante FRAP e $117,06 \pm 1,40$ μM trolox/ L de extrato para atividade antioxidante pelo método ABTS. O extrato com água como solvente apresentou $6,02 \pm 0,02\%$ de bixina, $2,022 \pm 0,003$ mg EAG/ g de semente de compostos fenólicos, $111,3 \pm 0,17$ μM trolox/ L extrato de atividade antioxidante pelo método FRAP e $96,07 \pm 0,35$ μM trolox/ L extrato de atividade antioxidante pelo método ABTS. A filtração do extrato aquoso do urucum utilizando uma membrana comercial de 10 kDa e uma pressão de 6 bar foi realizada com objetivo de concentrar o extrato aquoso. Para efeito comparativo realizou-se a filtração do extrato etanólico (etanol: água (50:50) (v:v)) nas mesmas condições do extrato aquoso. O extrato aquoso concentrado apresentou valores de $2,18 \pm 0,6\%$ para o teor de bixina, $2,53 \pm 0,07$ mg EAG/ g de semente para teor de compostos fenólicos, $143,80 \pm 0,18$ μM trolox/ L extrato para atividade antioxidante (FRAP) e $153,07 \pm 2,82$ μM trolox/ L extrato para atividade antioxidante (ABTS). A membrana polimérica foi capaz de concentrar o teor de bixina em 19,0% no extrato aquoso. Para efeito comparativo, realizou-se a mesma filtração para o extrato etanólico nas mesmas condições, utilizando uma membrana comercial de 10 kDa e uma pressão de 6 bar. O extrato concentrado apresentou valores de $0,47 \pm 0,04\%$ para teor de bixina, $2,860 \pm 0,07$ mg EAG/ g semente para compostos fenólicos, $112,13 \pm 1,17$ μM Trolox/L extrato para atividade antioxidante pelo método FRAP e $80,61 \pm 0,35$ μM Trolox/L extrato para atividade antioxidante pelo método ABTS. Estes resultados indicam que a ultrafiltração do extrato etanólico não foi capaz de concentrar os compostos, pois houve uma adsorção dos compostos bioativos pela membrana. Assim, o processo de filtração por membranas foi eficiente para a concentração de bixina presente no extrato aquoso.

Palavras-chave: Urucum, Extração, Ultrafiltração, Membranas, Bixina.

ABSTRACT

Currently, consumer demand for natural products has grown on the world stage. There is a growing need in the food industry to replace synthetic dyes with natural ones. Annatto is a fruit of the annatto tree, scientifically known as *Bixa orellana* L., which is rich in carotenoids. Industrially, it is used in pharmaceutical and cosmetic formulations with great antioxidant capacity and in foods as a natural coloring substitute for chemical additives. The main carotenoid, bixin, is found in the external portion of its seeds. Many organic solvents (ethanol, chloroform, methanol, acetone) have been used in the extraction of carotenoids from annatto seeds and this work explores the exclusive extraction with water, which presented a viable alternative for the extraction and purification process of bixin. Water is not the best solvent for bixin extraction and has little approach in studies proposed in the literature using it as a solvent, but it becomes a viable alternative due to its low cost, lower environmental impact, greater availability and safety in operation. The great diversity of techniques for extracting bixin from annatto seeds ends up producing an extract with impurities such as sugars and proteins. The market increasingly demands from industries a product with a high degree of purity so that there is no risk of contamination in addition to taking advantage of its medicinal properties. The improvement of the characteristics of annatto seed extract can be carried out by the purification process using membranes that allow the concentration and purification of the extract and its bioactives such as phenolics and antioxidant activity. The main objectives of this work were to extract the bixin carotenoid present in annatto seeds through the extraction of chloroform, ethanol and ethanol:water (50:50) (v:v) and water, with subsequent purification by the membrane filtration process, evaluating Bixin content, phenolic compounds and antioxidant activity were determined. Water was not the best solvent for extraction, but for ultrafiltration it became important in the present work because it is less aggressive and preserves the membrane material under study. Bixin extraction was performed at 50°C at a concentration of 1:30 (seed mass: solvent volume) for 60 min, but for chloroform, a time of 240 min was used until complete exhaustion of the seed pigments for quantification. of the total content of bixin present in the seeds. The extract using chloroform showed 10.34% of bixin. The extract using ethanol as solvent showed 8.69 ± 0.04% of bixin, 5.91 ± 0.51 mg EAG/ g of seed for phenolic content, 266.42 ± 4.19 µM trolox/ L of extract for antioxidant activity by the FRAP method and 137.91 ± 12.01

μM trolox/L of extract for antioxidant activity by the ABTS method. For ethanol: water (50:50) (v:v) as solvent showed $7.45 \pm 0.01\%$ of bixin, 2.908 ± 0.007 mg EAG/g of seed of phenolic compounds, 129.58 ± 0.70 μM trolox / L of extract for FRAP antioxidant activity and 117.06 ± 1.40 μM trolox/ L of extract for antioxidant activity by the ABTS method. The extract with water as solvent showed $6.02 \pm 0.02\%$ of bixin, 2.022 ± 0.003 mg EAG/ g of phenolic compounds seed, 111.3 ± 0.17 μM trolox/ L extract of antioxidant activity by the FRAP method and 96.07 ± 0.35 μM trolox/L extract of antioxidant activity by the ABTS method. The annatto aqueous extract was filtered using a commercial membrane of 10 kDa and a pressure of 6 bar, in order to concentrate the aqueous extract. For comparative purposes, the ethanol extract was filtered (ethanol: water (50:50) (v:v)) under the same conditions as the aqueous extract. The concentrated aqueous extract showed values of $2.18 \pm 0.6\%$ for bixin content, 2.53 ± 0.07 mg EAG/ g of seed for phenolic compounds content, 143.80 ± 0.18 μM trolox/ L extract for antioxidant activity (FRAP) and 153.07 ± 2.82 μM trolox/ L extract for antioxidant activity (ABTS). The polymeric membrane was able to concentrate the bixin content by 19.0% in the aqueous extract. For comparative purposes, the same filtration was carried out for the ethanolic extract under the same conditions, using a commercial membrane of 10 kDa and a pressure of 6 bar. The concentrated extract showed values of $0.47 \pm 0.04\%$ for bixin content, 2.860 ± 0.07 mg EAG/g seed for phenolic compounds, 112.13 ± 1.17 μM Trolox/L extract for antioxidant activity by the method FRAP and 80.61 ± 0.35 μM Trolox/L extract for antioxidant activity by the ABTS method. These results indicate that the ultrafiltration of the ethanolic extract was not able to concentrate the compounds, as there was an adsorption of the bioactive compounds by the membrane. Thus, the membrane filtration process was efficient for the concentration of bixin present in the aqueous extract.

Keywords: Annatto, Extraction, Ultrafiltration, Membranes, Bixin

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura - 1 Fotografia e Ilustração botânica <i>B. orellana</i> L..... | 20 |
| Figura - 2 (a) Semente inteira de urucum, (b) Semente inteira de urucum em corte transversal..... | 21 |
| Figura - 3 Comércio Global de Urucum..... | 22 |
| Figura - 4 Representação molecular: a) Bixina. b) Norbixina | 23 |
| Figura - 5 Estrutura molecular dos principais isômeros da bixina a) cis-bixina. b) trans-bixina..... | 25 |
| Figura 6 - Mecanismos de degradação da bixina..... | 26 |
| Figura - 7 Separação por Membrana. | 34 |
| Figura - 8 Etapas experimentais realizadas | 42 |
| Figura - 9 Extratos a) aquoso e b) etanol:água, após centrifugação | 46 |
| Figura - 10 Sistema de Ultrafiltração utilizando processo de separação por membrana de 10 kDa no processo tangencial. | 48 |
| Figura - 11 Módulo e membrana polimérica de 10 kDa para sistema de ultrafiltração. | 48 |
| Figura - 12 Cinética de extração aquosa do teor de bixina das sementes de urucum em função do tempo..... | 57 |
| Figura - 13 Perfil cinético de primeira ordem para extração aquosa de bixina com tempo. | 58 |
| Figura - 14 Perfil cinético de segunda ordem para extração aquosa de bixina com tempo. | 58 |
| Figura - 15 Espectros FTIR para extrato aquoso | 60 |
| Figura - 16 Fluxo de água através da membrana de 10 kDa em função da pressão transmembrana. | 66 |
| Figura - 17 Fluxo de água: etanol através da membrana de 10 kDa em função da pressão transmembrana. | 67 |
| Figura - 18 Declínios de fluxo experimental e calculado ($n=0$ para formação de torta; $n=1$ para bloqueio parcial dos poros; $n=1,5$ para bloqueio de poros internos e $n=2$ para bloqueio completo dos poros) para ultrafiltração de extrato aquoso das sementes de urucum. | 68 |
| Figura - 19 Declínios de fluxo experimental e calculado ($n=0$ para formação de torta; $n=1$ para bloqueio parcial dos poros; $n=1,5$ para bloqueio de poros internos e $n=2$ para | |

| | |
|--|----|
| bloqueio completo dos poros) para ultrafiltração de extrato EtOH:H ₂ O das sementes de urucum. | 68 |
| Figura - 20 Aspecto visual da membrana de 10 kDa após a ultrafiltração do: a) extrato aquoso e b) etanólico. | 70 |
| Figura - 21 Resultado visual da filtração tangencial utilizando membrana de 10 kDa e uma pressão de 6 bar. (a) extrato aquoso bruto; (b) extrato concentrado; (c) extrato permeado. | 72 |
| Figura - 22 Resultado visual da filtração tangencial utilizando membrana de 10 kDa e uma pressão de 6 bar. (a) extrato aquoso bruto; (b) extrato concentrado; (c) extrato permeado. | 75 |
| Figura - 23 Calibração padrão de ácido gálico | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela - 1 Composição das sementes de urucum. | 21 |
| Tabela - 2 Características dos processos de separação por membranas..... | 36 |
| Tabela - 3 Reagentes e fornecedores utilizados nas análises. | 43 |
| Tabela - 4 Mecanismo de incrustação da membrana..... | 50 |
| Tabela - 5 Caracterização das sementes de urucum. | 56 |
| Tabela - 6 Valores do coeficiente de determinação R^2 para o ajuste dos perfis de extração do teor total de bixina das sementes de urucum para modelos cinéticos de primeira e segunda ordem..... | 59 |
| Tabela - 7 Comparação dos valores de teor de bixina de extratos de semente de urucum utilizando etanol, etanol:água e água como solventes. | 61 |
| Tabela - 8 Atividades antioxidantes pelos métodos FRAP e ABTS do extrato de urucum com diferentes solventes..... | 64 |
| Tabela - 9 Coeficientes de determinação (R^2) para ajuste de dados de fluxo experimental durante a ultrafiltração do extrato aquoso e etanólico das sementes de urucum ao modelo matemático proposto por Runge-Kutta. | 69 |
| Tabela - 10 Resultado das resistências em série para ultrafiltração dos extratos aquoso e etanólico. | 71 |
| Tabela - 11 Variação das propriedades do concentrado e permeado em relação ao extrato inicial para filtração tangencial do extrato aquoso das sementes de urucum. | 72 |
| Tabela - 12 Variação das propriedades do concentrado e permeado em relação ao extrato inicial para filtração tangencial do extrato etanólico das sementes de urucum. | 74 |

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 12 |
| OBJETIVOS | 15 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 15 |
| 3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO | 15 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 3.1. CORANTES NATURAIS | 16 |
| 3.2. OS CAROTENOIDES | 18 |
| 3.3. O URUCUM | 19 |
| 3.4. A BIXINA E SEUS DERIVADOS | 24 |
| 3.5. UTILIZAÇÃO E APLICAÇÕES | 26 |
| 3.6. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PIGMENTOS | 28 |
| 3.7. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES | 31 |
| 3.8. PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS | 33 |
| 3.8.1. Tipos e características das membranas | 33 |
| 3.8.2. Ultrafiltração..... | 37 |
| 3.8.3. Polarização e <i>fouling</i> | 39 |
| 3.8.4. Principais aplicações do processo de separação por membranas | 40 |
| METODOLOGIA | 42 |
| 3.9. MATERIAL | 43 |
| 3.10. CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES | 44 |
| 3.10.1.Umidade | 44 |
| 3.10.2.Cinzas | 44 |
| 3.11. PREPARAÇÃO DO EXTRATO | 45 |
| 3.12. CINÉTICA DE EXTRAÇÃO AQUOSA | 45 |
| 3.13. PRÉ-TRATAMENTO E CENTRIFUGAÇÃO EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO | 46 |
| 3.14. PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO DO EXTRATO | 47 |
| 3.14.1.Compactação da membrana | 47 |
| 3.14.2.Filtração tangencial | 47 |
| 3.14.3.Ajuste matemático do decaimento de fluxo | 49 |
| 3.14.4.Resistências | 50 |
| 3.14.5.Caracterizações dos extratos de urucum | 51 |
| 3.14.6.Teor de Bixina | 52 |
| 3.14.7.Teor de compostos fenólicos (TCF) | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 3.14.8.Capacidade antioxidante (ABTS) | 53 |
| 3.14.9.Capacidade antioxidante (FRAP) | 54 |
| 3.14.10.Cor..... | 54 |
| 3.14.11.FTIR | 55 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 3.15. CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE URUCUM | 56 |
| 3.16. CINÉTICA DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE BIXINA | 56 |
| 3.17. GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO | 59 |
| 3.18. CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS DE URUCUM OBTIDOS COM DIFERENTES SOLVENTES | 60 |
| 3.18.1.Teor de bixina..... | 60 |
| 3.18.2.Teor de compostos fenólicos totais | 63 |
| 3.18.3 Atividade antioxidante..... | 64 |
| 3.19. PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DAS SEMENTES DE URUCUM POR ULTRAFILTRAÇÃO | 65 |
| 3.19.1.Permeabilidade da membrana | 65 |
| 3.20. ULTRAFILTRAÇÕES DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO | 68 |
| 3.20.1.Características do extrato AQUOSO após ultrafiltração..... | 71 |
| 3.20.2.Características do extrato ETANÓLICO após ultrafiltração..... | 73 |
| CONCLUSÃO | 76 |
| SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 78 |
| APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO FENÓLICOS..... | 92 |
| APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 92 |

INTRODUÇÃO

O aumento do mercado consumidor, as mudanças sociológicas e o progresso tecnológico levaram a mudanças no processamento de alimentos, o que reflete também na utilização de corantes (KAPOOR; RAMAMOORTHY, 2021). Atualmente, os corantes naturais vêm ganhando destaque no mundo. A restrição ao uso de corantes sintéticos na indústria alimentícia é uma tendência mundial, levando ao interesse de se substituir estes corantes pelos naturais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Muitos fotoquímicos são usados como corantes naturais, tais como antocianinas (GORDILLO *et al.*, 2018), betacianinas (WICZKOWSKI *et al.*, 2018), bixina e curcumina (ZHANG; ZHONG, 2013). Os corantes naturais podem apresentar eficiência semelhante aos corantes derivados de produtos químicos e, além disso, são mais seguros e trazem benefícios à saúde, visto que podem contribuir para as propriedades funcionais dos alimentos (CAROCHO *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016).

Dessa forma, os compostos bioativos que estão presentes nos corantes alimentícios e nutracêuticos, devem interagir em vários aspectos do estado de saúde do indivíduo, alterando a produção de proteínas e a resposta genética. Com base nos efeitos benéficos dos corantes naturais no organismo, os mecanismos de ação podem ser genéricos ou específicos a um composto bioativo (CVEJIC *et al.*, 2022; DOWNHAM; COLLINS, 2000).

No âmbito dos produtos naturais e da sua utilização como alternativa em substituição aos aditivos químicos nos alimentos, destaca-se o uso de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Entre os carotenoides mais usados como aditivos alimentares estão os corantes a base de urucum (BOLOGNESI; GARCIA, 2018). O urucum é uma importante fonte de corante natural para as indústrias alimentícia, farmacêutica e têxtil, representando 90% dos aditivos naturais utilizados no Brasil (SOUSA *et al.*, 2016). O corante é extraído do pericarpo da semente do urucum (*Bixa orellana L.*), planta nativa da América Central e do Sul. A bixina é o principal pigmento natural da semente do urucum (*Bixa orellana L.*), representando mais de 80% dos carotenoides presentes na semente (DOS SANTOS; LOURENZANI; LOURENZANI, 2018; MANTOVANI *et al.*, 2013). A partir da bixina são obtidos os demais pigmentos,

como norbixina, sal de norbixina e demais produtos de degradação térmica (BARETH; STROHMAR; KITZELMANN, 2002; TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). A bixina é utilizada como corante em margarinas, queijos, manteigas e outros produtos oleosos (CELLI *et al.*, 2019). A norbixina é encontrada em pequenas quantidades nas sementes de urucum, sendo formada pela hidrólise do éster da bixina, conferindo propriedade hidrofílica para a molécula. Sendo assim, a norbixina é o principal carotenoide de preparações hidrossolúveis de corantes naturais, sendo utilizado na fabricação de iogurtes, cervejas, refrigerantes e sorvetes (HAGIWARA *et al.*, 2003).

Além da bixina, a semente ainda contém uma fração lipídica rica em esteróis, compostos alifáticos, monoterpenos e sesquiterpenos, flavonoides, polifenóis e taninos, quinonas, terpenoides, alcaloides e triterpenos (STOHS, 2014). Os polifenóis são um conhecido grupo de sistemas fenólicos caracterizados por pelo menos dois anéis fenólicos e um ou mais substituintes hidroxil, e podem ser classificados em flavonoides e não-flavonoides. Além disso, são comumente subdivididos dependendo do número de unidades de fenol dentro de sua estrutura molecular, grupos substituintes e/ou o tipo de ligação entre as unidades de fenol (SINGLA *et al.*, 2019). A importância dos polifenóis se deve a sua contribuição positiva aos processos celulares dentro do organismo. Em termos de atividade farmacológica, eles protegem contra a oxidação dos lipídios de alta densidade (HDL) e assim, eles ajudam o corpo a reter os lipídeos importantes enquanto ajudam a remover os lipídios problemáticos de baixa densidade (LDLs). Além disso, os polifenóis também têm atividades anti-úlceras, anticancerígenas e antimutagênicas. A razão para estas atividades é a forte natureza antioxidante dos polifenóis, que se baseia em sua capacidade de absorver os radicais livres (NAWAZ *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de tecnologias que conduzam não só a extração do pigmento bruto, mas principalmente que leve à obtenção de bixina de elevada pureza, conjugada a sua estabilização, é de fundamental importância para agregar valor ao produto. Disponibilizar no mercado bixina de elevada pureza significa aumentar a competitividade comercial e maior probabilidade de expansão comercial ao atender aos segmentos mais tecnológicos, como as indústrias farmacêuticas (KAMILOGLU *et al.*, 2021). A comprovada ação antioxidante de alguns carotenoides tem intensificado o número de pesquisas no sentido, não só de obter produtos derivados que possam

ter suas propriedades potencializadas, mas também a busca de alternativas para ampliar sua produção (PRAJAPATI; JADEJA, 2022).

A bixina é extraída de sementes de urucum por 3 métodos principais: a extração em água em meio alcalino, a extração em óleo, que resulta na remoção da bixina e de outras moléculas, e a extração com solvente, que resulta na extração mais pura do pigmento bixina (PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, 1992). Os principais solventes orgânicos utilizados para extração de bixina das sementes de urucum são acetona, etanol, hexano, propileno glicol e clorofórmio. As extrações com solvente orgânico ou solução alcalina geram resíduos causadores de problemas ambientais, além de requererem uma operação unitária subsequente para remover o solvente ou solução utilizada na extração, elevando o custo total de energia (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012). A extração em óleo vegetal produz suspensões mais concentradas de pigmentos, mas que podem conter produtos de degradação, haja vista que a extração é realizada em temperaturas maiores que 100°C (MCKEOWN, 1963). Atualmente, sob o olhar da sustentabilidade, a indústria demanda o desenvolvimento de novos processos de extração e purificação baseados em tecnologias “verdes”, eficazes e rentáveis (BOLOGNESI; GARCIA, 2018). Assim, embora diferentes solventes sejam propostos para extrações eficientes (DALL’ACQUA *et al.*, 2020), a água é sugerida como um solvente seguro e de baixo custo (WITONO *et al.*, 2022).

Processos industriais para a extração e purificação de moléculas de interesse comercial, seja como corante, antioxidante ou como uma molécula de propriedades específicas para aplicação na alimentação humana têm sido alvo de inúmeros trabalhos em nível científico-acadêmico, bem como de solicitações de pedidos de patente em todo mundo (FERREIRA *et al.*, 2021). O processo de separação por membranas vem sendo aplicado para purificação e concentração de diversos compostos de interesse, tais como compostos fenólicos (BINDES *et al.*, 2020) e corantes naturais (CHANUKYA; RASTOGI, 2017). É um processo que resulta em concentrados com maior teor de bioativos uma vez que não é necessário o uso de aquecimento, mudança de pH e além da recuperação dos solventes (REIS *et al.*, 2019).

Nesse contexto objetiva-se a purificação da bixina através do processo de separação por membranas utilizando água como solvente.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar as melhores condições para a extração de bixina e compostos fenólicos presentes nas sementes de urucum com posterior concentração dos compostos através dos processos de separação por membranas utilizando água como solvente.

3.2. Objetivo Específico

- Avaliar o uso de água pura, clorofórmio PA, etanol (95%) e uma mistura de etanol e água (50:50 v:v) para extração de bixina presente nas sementes de urucum;
- Caracterizar os extratos de urucum quanto à concentração de bixina, fenólicos, atividades antioxidantes e cor;
- Avaliar a cinética do processo de extração de bixina;
- Purificar os extratos de urucum obtidos pelo processo de ultrafiltração;
- Verificar a qualidade dos extratos após as filtrações quanto à concentração de bixina, fenólicos, atividades antioxidantes e cor.
- Modelar os dados experimentais de fluxos de permeado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CORANTES NATURAIS

A natureza é uma rica fonte de compostos naturais semelhantes aos produzidos em laboratório. Os fotoquímicos mais conhecidos como "Produtos Naturais" são encontrados em abundância em várias plantas. Desde tempos remotos, as especiarias têm sido amplamente utilizadas na culinária como agentes flavorizantes e corantes. Em destaque, a indústria alimentícia tem exercido um grande impacto na evolução da ciência, e na garantia de saúde e nutrição, juntamente com o sabor e aparência que satisfaz o consumidor. Produtos específicos com diferentes formatos, cores, gostos, cheiros e texturas, estão cada vez mais disponíveis nos supermercados, buscando atender as expectativas dos consumidores. Entre os constituintes dos alimentos responsáveis por uma considerável melhoria das características organolépticas, os aditivos revelaram-se fundamentais para mascarar suas características desagradáveis, uma vez que,, apesar dos produtos alimentícios naturais terem sua própria intensidade de cor, as condições de armazenamento, práticas/métodos de fabricação e processamento têm uma influência pronunciada sobre sua coloração final. No sentido mais amplo, de acordo com a Portaria nº 540 de 1997 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pode-se compreender que os corantes visam conferir, intensificar ou restaurar a cor de um alimento (BRASIL, 1997).

Desde a antiguidade, há o hábito de buscar e extrair substâncias da natureza para conferir cor a tecidos, objetos e alimentos. Com a industrialização dos alimentos, o uso de aditivos sintéticos foi necessário para tornar os alimentos mais atrativos, duráveis e lucrativos. Pode-se destacar que um dos aditivos sintéticos mais pronunciados são os corantes artificiais. Estes corantes geralmente não possuem valor nutritivo e tem apenas a função de deixar o produto mais atrativo aos consumidores. A ANVISA regula os corantes artificiais utilizados no Brasil através da Resolução RDC nº 4, de 15 de janeiro de 2007, que permite apenas 11 tipos, mas devido aos avanços tecnológicos e as legislações internacionais esta conduta está sob constantes alterações (BRASIL, 2007).

Contudo, os resultados negativos para a saúde humana são cada vez mais pronunciados com o aumento de pessoas com obesidade e problemas de saúde associados à alimentação. Nos últimos anos, o foco principal das indústrias alimentícias e dos consumidores está no uso de corantes naturais nos alimentos. Além disso, com os avanços na ciência, os estudos comprovam que os produtos naturais promovem uma melhor qualidade nutricional e de saúde aos alimentos enquanto os corantes sintéticos são criticamente avaliados trazendo malefícios para a saúde dos consumidores (MANIHURUK; SURYATI; ARIEF, 2017). Por isso, a busca por fontes naturais desses pigmentos vem sendo estimulada e ganhando destaque na indústria. Os corantes naturais são obtidos de algas, insetos, fontes vegetais e microbianas, onde são processados e extraídos por métodos físicos e/ou químicos e raramente causam danos à saúde humana (LIN *et al.*, 2018). Além disso, os corantes naturais podem conter propriedades benéficas à saúde humana pela sua capacidade de prevenir ou auxiliar no tratamento de algumas doenças. Entretanto, os processos físicos exigem uma atenção maior em relação à estabilidade, a pureza, a sua polaridade obtida no produto final (TAY-AGBOZO; STREET; KISPERT, 2018).

Dentre os produtos naturais utilizados em alimentos, os corantes vermelhos e amarelos representam a maior quantidade dentre os corantes adicionados aos alimentos (POTERA, 2010). Uma classe de corantes naturais tradicionalmente utilizados pela indústria alimentar que fornecem cores vermelhas são antocianinas, um grande grupo de flavonoides largamente difundido na natureza. As antocianinas são solúveis em água e podem ser encontrados em plantas (normalmente em frutos), em flores e em tubérculos. As antocianinas são glicosídeos e acilglicosídeos de antocianinas. A cor das antocianinas depende do tipo de derivado e do pH. Na natureza, a pelargonidina, por exemplo, pode apresentar cores entre o laranja e o vermelho, pois a sua estrutura molecular possui uma natureza iônica (HOLME; DIONISIO; BRINCH-PEDERSEN, 2021). Por isso, o uso desta classe de corantes naturais ainda é um grande desafio para a indústria por sua baixa estabilidade, o que pode resultar em perda de cor ou alterações de tonalidade. A estabilidade depende principalmente do pH, temperatura e luz.

Outro grupo de corantes naturais que são considerados relativamente estáveis e solúveis em água são as betacianinas, que naturalmente apresentam a coloração

intensa entre o vermelho e violeta. Pode-se indicar que existem cerca de 35 compostos classificados no grupo das betacianinas, sendo a betanina a composição mais comum. As betacianinas apresentam uma boa estabilidade em uma grande variedade de pH (entre o pH 3 ao 7) e, por isto, são utilizadas em alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; WICZKOWSKI *et al.*, 2018). Normalmente encontra-se uma grande quantidade de betacianinas derivadas da beterraba, mas também são encontradas em outras plantas como a bortalha e algumas espécies de cactos (SUTOR; WYBRANIEC, 2020).

Dentre os corantes amarelos e vermelhos utilizados ao longo dos anos, destacam-se os curcuminoides e os carotenoides. A curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina e curcumina cíclica, são amplamente estudados, dentre os curcuminoides, para o tratamento e prevenção de doenças (PRIYADARSINI, 2014). Além disso, a bixina é um corante que pertence à família dos carotenoides é utilizada na indústria de alimentos para colorir óleos e manteigas por apresentar uma polaridade intermediária. Este corante pode ser extraído principalmente do urucum (JUNQUEIRA *et al.*, 2018).

3.2. OS CAROTENOIDES

Dentre os aditivos utilizados como corantes na indústria de alimentos, os carotenoides são os produtos naturais mais utilizados na substituição dos corantes sintéticos devido às diversas fontes de extração por exemplo a partir do urucum, pimentão, açafrão, licopeno de tomate, luteína de calêndula ou por fermentação microbiana (β -caroteno por *Dunaliella sp.*, astaxantina por *Haematococcus pluvialis*, e β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora*).

Além de atribuir cor aos alimentos, os carotenoides cumprem diversos efeitos na saúde desde os benefícios para as funções cognitivas, proteção da pele, prevenção da artrite reumatoide até o tratamento contra o câncer (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Existem cerca de 600 carotenoides identificados na natureza. No entanto, normalmente apenas 40 estão presentes na dieta humana. Os carotenoides receberam este nome devido às propriedades especiais provenientes de suas fontes,

por exemplo, caroteno (de cenouras), criptoxantina (pigmento secreto) e zeaxantina (de milho, *Zea mays*). Os carotenos e xantofilas são os principais subgrupos de carotenoides (oxicarotenoides).

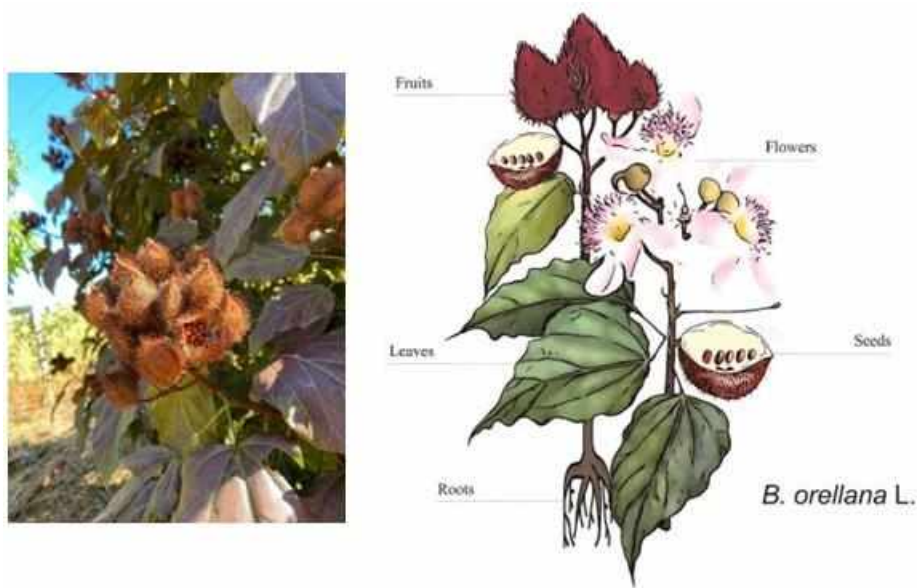
Os carotenoides são compostos lipofílicos e, portanto, possuem baixa polaridade atuando próxima a parte hidrofóbica das células. A maioria dos carotenoides se apresentam pigmentos tetraterpenoides C₄₀ (C₄₀H₅₆), e consistem em oito unidades isoprenóides unidas de uma forma específica que a organização das unidades isoprenoides é reservada no centro da molécula. Isto resulta em uma estrutura de hidrocarboneto C₄₀H₅₆ conjugado com ligações duplas alternadas. Esta conjugação de ligações duplas alternadas está relacionada às propriedades fotoquímicas e à reatividade química destas moléculas, incluindo os radicais livres. Além disso, podem existir isomerismo cis/trans dentre as ligações duplas da estrutura que se diferem em seus pontos de fusão, solubilidade, estabilidade, e em suas propriedades espectroscópicas (LANGI *et al.*, 2018).

Entre os carotenoides mais usados como aditivos alimentares estão os corantes a base de urucum devido à sua disponibilidade na natureza e sua baixa toxicidade, além dos benefícios a saúde comprovados em diversos estudos (BOLOGNESI; GARCIA, 2018).

3.3. O URUCUM

O termo "urucum" refere-se a uma série de preparações de corantes que consistem em pigmentos do tipo carotenoide, baseados em extratos de sementes do arbusto tropical *Bixa orellana L.*, representada na Figura 1 (HENRY, 1996).

Figura - 1 Fotografia e Ilustração botânica *B. orellana* L.

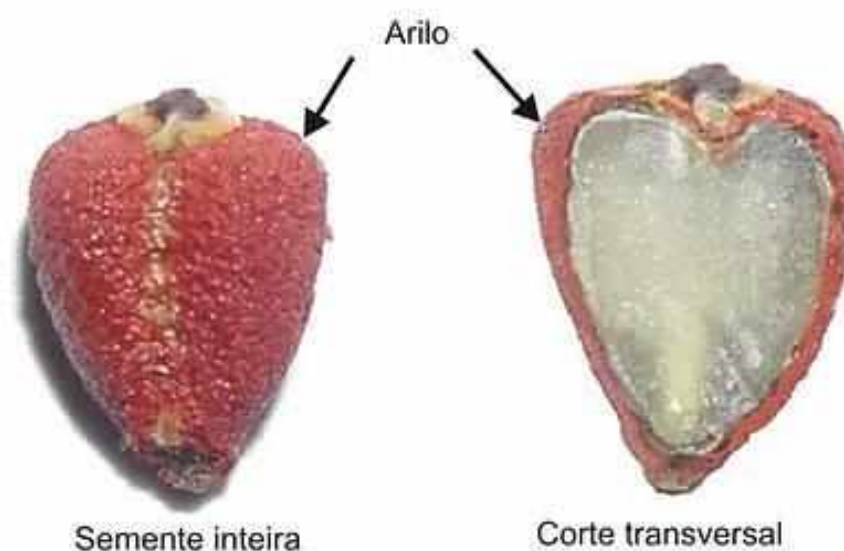


Fonte: Adaptado de COELHO DOS SANTOS *et al.*, (2022).

Nativo das Américas Central e do Sul, este arbusto em média de 3 a 6 m de altura, pertence à família *Bixaceae* e possui sementes amplamente utilizadas como corante na indústria têxtil e de alimentos (GALINDO-CUSPINERA; LUBRAN; RANKIN, 2002). O fruto consiste em uma cachopa que contém cerca de 20 e 50 sementes, semelhantes ao tamanho de sementes de uva, que são cobertas com uma espessa camada de polpa vermelha.

O arilo ou pericarpo, Figura 2, representa a superfície da semente de urucum onde é encontrado uma grande quantidade de pigmentos avermelhados.

Figura - 2 (a) Semente inteira de urucum, (b) Semente inteira de urucum em corte transversal.



Fonte: CARVALHO, (2015).

Este arilo representa cerca de 5 a 10% do peso da semente dos quais 30 % são representados pelos carotenoides. Na Tabela a seguir, observa-se na composição centesimal do urucum a presença da semente sem o arilo e do arilo extraído mecanicamente.

Tabela - 1 Composição das sementes de urucum.

| Composição (g/100g) | Semente sem o arilo | Arilo |
|------------------------------|---------------------|-------|
| Umidade | 9,8 | 3,5 |
| Cinzas | 4,6 | 2,0 |
| Proteína bruta (%N x 6,25) | 10,8 | 2,5 |
| Extrato etéreo | 4,8 | 30,0 |
| Carboidratos totais | 70,0 | 32,0 |
| Carotenoides totais (Bixina) | - | 30,0 |

Fonte: (CARVALHO, 2015)

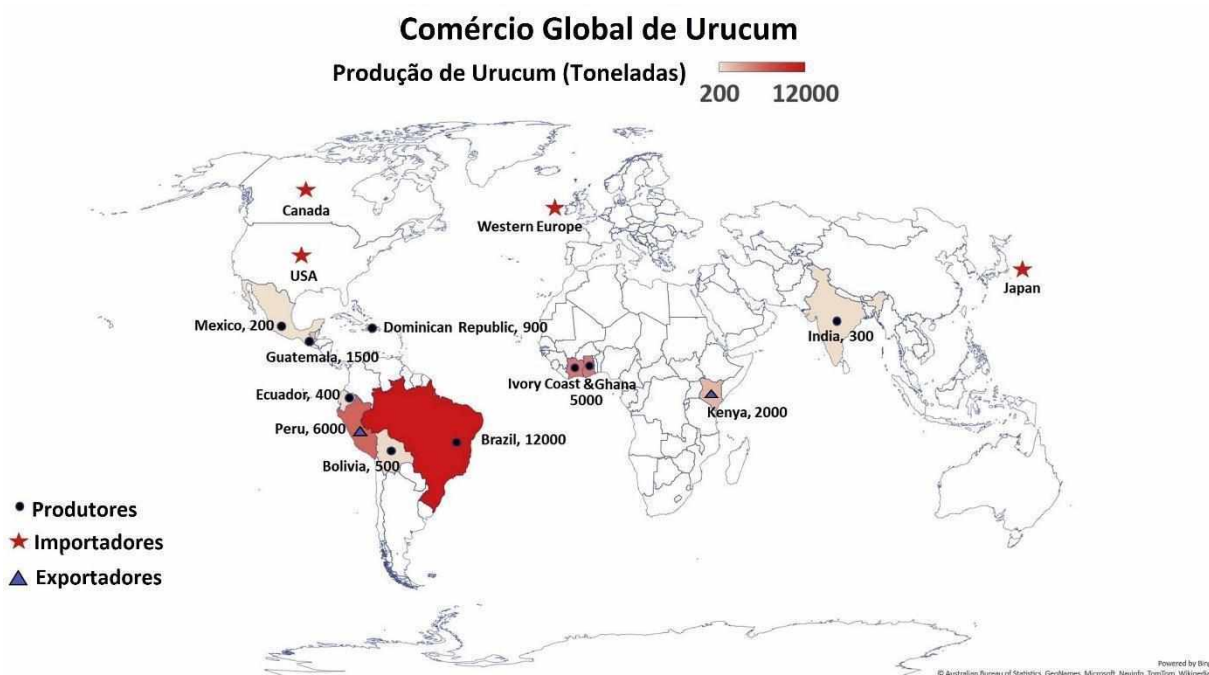
Além disso, a quantidade de aminoácidos presentes nas sementes de urucum possui a maior concentração dos ácidos glutâmico e aspártico. Também é reportado a presença de maior abundância de ácidos graxos Linoleico (19,4%), Palmítico

(19,3%), Oleico (15,5%) e Esteárico (13,0%), na extração do óleo de sementes de urucum (CARVALHO, 2015).

O urucum, também conhecido como *annatto*, *orlean*, *achiote*, urucum, ou rocou, é cultivado em vários países tropicais, incluindo Jamaica, México, sendo o Peru, Brasil e Quênia os principais produtores (RADDATZ-MOTA *et al.*, 2017).

Há duas décadas, a produção global de sementes de urucum era de 10 mil toneladas ao ano. A produção mundial atual é três vezes maior com uma contribuição de 11,8% para o mercado global de carotenoides. A produção dos países da América Latina (Peru, México e Brasil) corresponde a 61% da produção mundial, seguidos da África e da Ásia. De acordo com a Figura 2, os maiores importadores são Estados Unidos, Japão e Europa Ocidental (KAPOOR; RAMAMOORTHY, 2021).

Figura - 3 Comércio Global de Urucum.

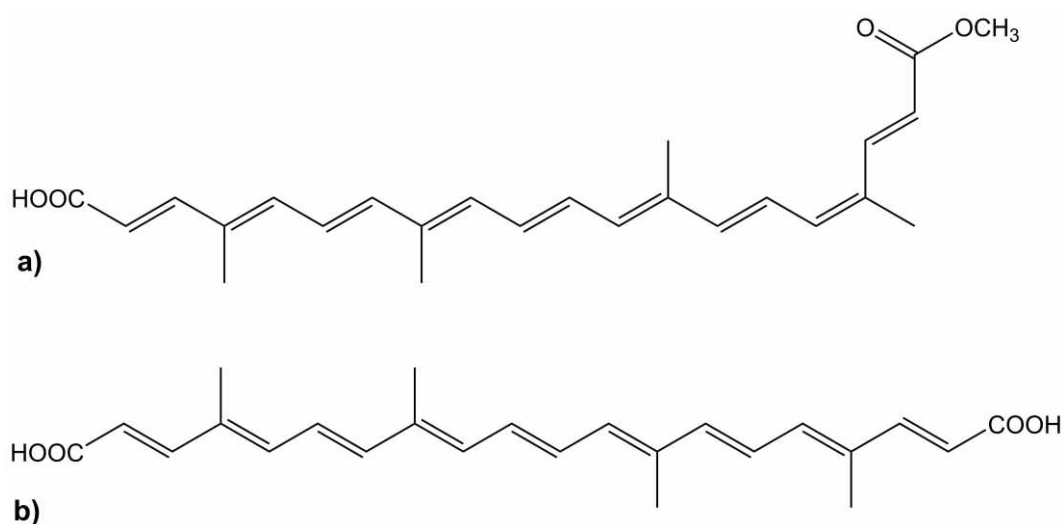


Fonte: Adaptado de KAPOOR; RAMAMOORTHY, (2021).

De acordo com os dados do IBGE, o Brasil é considerado o maior produtor mundial de urucum, onde o estado de São Paulo concentra a maior parte da produção (28%), além dos estados de Rondônia, Pará, Minas Gerais, Paraná e Bahia. Desde a década de 80, com a necessidade de novas culturas o urucum despertou o interesse dos produtores devido ao baixo custo de produção. Atualmente, novas espécies de urucum são cultivadas onde possuem uma maior capacidade de produção de pigmento (DOS SANTOS; LOURENZANI; LOURENZANI, 2018).

Os principais pigmentos das sementes de urucum são bixina e norbixina, cujas estruturas são mostradas na Figura 4.

Figura - 4 Representação molecular: a) Bixina. b) Norbixina



Fonte: Autor

Estes pigmentos são carotenoides cujas cores variam entre amarelo e vermelho, cores de enorme importância na indústria alimentícia, farmacológica e cosmética (SCOTTER, 2009). Embora estes carotenoides sejam muito semelhantes, as diferenças em suas ligações químicas influenciam na estereoquímica, solubilidade, comportamento cromatográfico e estabilidade (VARDANEGA *et al.*, 2019).

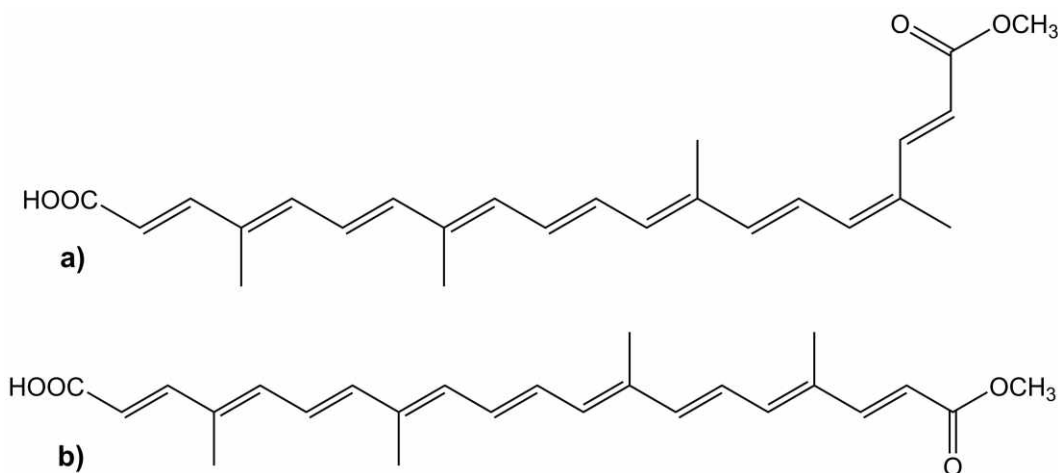
3.4. A BIXINA E SEUS DERIVADOS

A *cis*-bixina ou α -bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) é o carotenoide com maior quantidade, cerca de 80%, presente no urucum. Além disso, na composição resultante consistem em *trans*- e *cis*-norbixina ($C_{25}H_{28}O_4$) (WITONO *et al.*, 2022).

Historicamente a fórmula molecular da bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) foi apresentada primeiramente por Heiduschka e Panzer (1917) que sugeriram a uma molécula assimétrica. Posteriormente foi atribuído os grupos funcionais para a bixina como um monometil éster de um ácido carboxílico insaturado contendo nove ligações duplas conjugadas, o que explica a coloração avermelhada (HEIDUSCHKA; PANZER, 1917). Após estudos de estabilidade tem-se que as principais estruturas do corante presente no urucum é o apocarotenóide (metil hidrogen 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, $C_{25}H_{30}O_4$), comumente chamado de *cis*-bixina e o éster monometil éster do ácido dicarboxílico 9'-*cis*-norbixina ($C_{24}H_{28}O_4$) (SCOTTER, 2009). A presença do grupo metil éster confere característica lipossolúvel a molécula e, assim, a bixina é o principal componente de preparações lipossolúveis de corantes naturais.

Dessa forma, destaca-se na estrutura molecular da bixina a presença de nove ligações duplas conjugadas, com um grupo $-\text{COOH}$ (ácido carboxílico) terminal ou $-\text{COOR}$ (éster). De acordo com a Figura 5, a sua estrutura pode apresentar a configuração *cis* ou *trans* na posição 9' o que influencia na estabilidade e nas propriedades física da bixina.

Figura - 5 Estrutura molecular dos principais isômeros da bixina a) *cis*-bixina. b) *trans*-bixina.



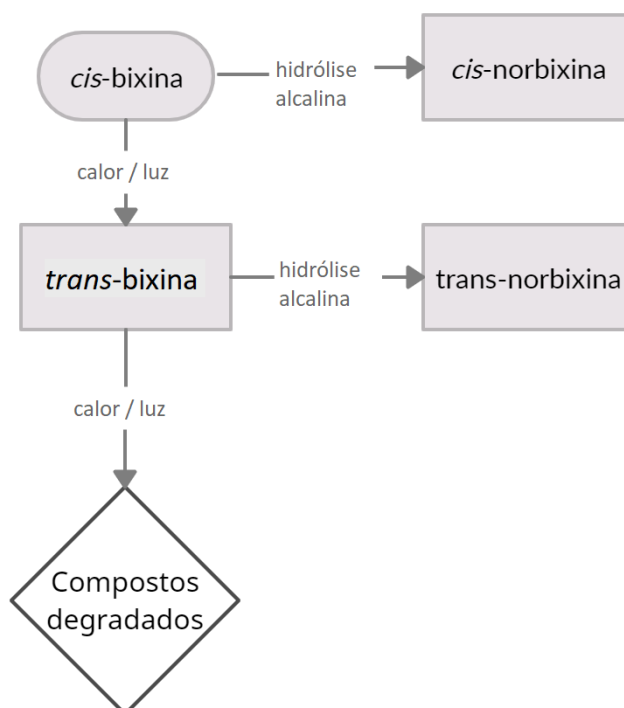
Fonte: Autor

Naturalmente, a maioria dos carotenoides se apresentam na configuração mais estável *trans*, porém a bixina é comumente encontrada na configuração *cis* (PERERA; YEN, 2007). Pode-se considerar que a bixina foi a primeira forma de um *cis*-polieno natural reportada. Diante de vários experimentos de oxidação e degradação da bixina, foram confirmadas a elucidação estrutural da bixina.

A *cis*-bixina possui solubilidade elevada frente a maioria dos solventes orgânicos polares, porém é praticamente insolúvel em óleo vegetal. Entretanto, diante da luz ou calor, poderá sofrer isomerização para a configuração *trans*, inicialmente conhecida como β -bixina, que é a forma mais estável e possui uma coloração diferente de seu isômero. A bixina é relativamente estável para a oxidação e degradação, mas é extremamente sensível à luz onde a isomerização da *cis*-bixina é um fator considerável.

A cinética de degradação proposta por Scotter e colaboradores (2009) indica a degradação térmica da *cis*-bixina pela luz formando primeiramente o seu isômero *trans* e, em seguida, os outros compostos residuais (SCOTTER, 2009). Além disso, o equilíbrio é direcionado para a formação da norbixina e seus isômeros a partir da hidrólise alcalina da bixina, como representados na Figura 6.

Figura 6 - Mecanismos de degradação da bixina



Fonte: Autor

3.5. UTILIZAÇÃO E APLICAÇÕES

A bixina comumente é utilizada na indústria de alimentos como corante em margarinas, queijos, manteigas e outros produtos oleosos. Conquanto, a norbixina geralmente é formada pela hidrólise do éster da bixina, conferindo propriedade hidrofílica para a molécula. Por isso, a norbixina é o principal carotenoide de preparações hidrossolúveis de corantes naturais, sendo utilizado na fabricação de iogurtes, cervejas, refrigerantes e sorvetes (BALAKRISHNAN *et al.*, 2021). Além disso, os extratos das sementes do urucum têm uma gama de propriedades farmacológicas que incluem antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, hemostáticos, aumento da motilidade gastrointestinal, anticonvulsivos, analgésicos, antidiarreicos e propriedades diuréticas (ALSHEHRI *et al.*, 2020; MARIKANI *et al.*, 2020).

Apesar de diversas aplicações biológicas, os estudos se concentram nas atividades antimicrobianas e antioxidante devido à sua baixa toxicidade e baixo custo de produção, sendo um atrativo para o setor industrial (PATEIRO *et al.*, 2021). Além disso, o uso do extrato da semente do urucum favorece o desenvolvimento de novas tecnologias, com um valor de mercado acessível, melhorando a qualidade e a segurança de alimentos e medicamentos (SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016).

A bixina também foi eficaz como agente antitumoral sendo que, a inibição da proliferação celular indicou os respectivos valores de IC₅₀ em 33, 49, 45 e 39 µg/mL contra as linhagens de células do cólon, CNS, estômago e câncer de pulmão (ANTUNES *et al.*, 2005; REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005).

Devido à capacidade de reduzir os riscos de vários distúrbios degenerativos, os carotenoides fazem parte de um grupo de compostos bioativos contra o câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração muscular. Em relação a capacidade de inibição dos radicais livres, tem-se observado também que os extratos de urucum são eficazes na prevenção da peroxidação lipídica e na conservação de alimentos e medicamentos (COELHO DOS SANTOS *et al.*, 2022).

Weiss e Landdauer (2003) fizeram um levantamento de inúmeras substâncias potencialmente antioxidantes, dentre elas encontra-se a bixina, presente na semente do urucum, importante na indústria de corantes (WEISS; LANDAUER, 2003). O principal bioativo dos extratos de urucum, a bixina, pode ser considerada uma fonte natural de antioxidante de acordo com Chisté e colaboradores onde eles relatam que os extratos de urucum em misturas de solventes como etanol: acetato de etila possuem alta eficiência como antioxidantes (CHISTÉ *et al.*, 2011). Em outros estudos, considerando os extratos de urucum em solventes de polaridade intermediária, como o metanol, mostraram uma boa capacidade de absorção de radicais livres nas avaliações do teor de Fenólicos e ABTS (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008).

Dentre os métodos de avaliação da capacidade antioxidante, destacam-se os métodos espectrofotométricos DPPH, FRAP, ABTS e o teor de fenólicos. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade (PRIOR; CAO, 1999). O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) também é utilizado para medir a capacidade antioxidante de frutos. Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas (BENZIE; STRAIN, 1996). O método do ABTS (*2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline6-sulfonic acid) diammonium salt*) está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+} (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). O teor de fenólicos totais dos extratos é determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e curva padrão de ácido gálico (EAG) (SWAIN; HILLIS, 1959).

3.6. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PIGMENTOS

A forma mais usual de se extrair os bioativos de pigmentos naturais é a utilização de solventes orgânicos sendo que esta técnica é empregada na recuperação de uma ampla gama de compostos fenólicos e carotenoides (ABAD-GARCÍA et al., 2007). Metanol, etanol e acetona e suas frações em água são os solventes mais utilizados na extração destes compostos de origem vegetal (KIOKIAS; GORDON, 2003). Contudo estas técnicas podem apresentar vantagens e desvantagens (RENARD, 2018). Por exemplo, a extração exclusivamente aquosa possui a vantagem de não requerer etapas posteriores para retirada do solvente orgânico, que podem inativar os compostos de interesse, além de possuir rendimentos maiores quando se trata de compostos fenólicos e carotenoides, porém é necessário o aquecimento do processo de extração para aumentar a interação entre os compostos de interesse e o solvente (VIEIRA et al., 2011). O aumento da temperatura aumenta a eficiência de extração porque aumenta a permeabilidade celular, diminui a viscosidade da solução e aumenta os coeficientes de difusão dos compostos facilitando a transferência de massa; entretanto, temperaturas muito altas podem causar a degradação dos compostos fenólicos e carotenoides (GHADA; WASSIM; WARID, 2012).

A bixina é extraída das sementes de urucum por diferentes formas, como a extração em meio aquoso alcalino, em óleo, que resulta na remoção da bixina e de outras moléculas, e a extração com solvente, que resulta na extração mais efetiva do pigmento bixina. Na extração em óleo, ocorre a abrasão do exocarpo submerso em óleo quente (70 °C) promovendo a suspensão dos pigmentos de maior concentração, além de outros produtos de degradação térmica (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015). Na indústria, a extração em meio aquoso alcalino é mais utilizada, geralmente soluções com hidróxido de sódio ou de potássio. Neste processo, os carotenoides são transformados em “sal de norbixina” solúvel em água (CARVALHO *et al.*, 2010). A extração com solventes como acetona, etanol, clorofórmio, hexano e acetato de etila, por conta da maior afinidade com os pigmentos do urucum, promove uma extração mais pura (DAVID *et al.*, 2022). Entretanto, tanto a extração em solução aquosa ou por solventes, possuem falhas em relação à seletividade e ao nível de pureza do produto final, além disso requer o uso de várias operações unitárias para a remover o solvente utilizado, aumentando o custo e energia do processo de extração (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012).

Como o processo de extração por solvente é complexo, devido à estrutura da amostra que envolve uma estrutura celular com uma composição variada de molécula, o aprimoramento desta técnica combinada com outros processos físicos estão sendo estudado. Por exemplo, a técnica de extração por solvente de baixa pressão (ESBP), comumente conhecida como lixiviação, promovendo a dissolução seletiva dos compostos de interesse contidos na matriz sólida, que é utilizada na indústria química (ALCÁZAR-ALAY *et al.*, 2017). Várias aplicações do ESBP na indústria alimentícia, por exemplo, a extração de óleo residual no processamento de óleo vegetal com hexano, a extração de licopeno de cascas de tomate e a extração de β -caroteno de subprodutos de cenoura com etanol, que é reconhecido como um solvente verde (CARDENAS-TORO *et al.*, 2015).

David e colaboradores (2022) relatam bons resultados na extração da bixina em sementes de urucum utilizando uma mistura de etanol e polietilenoglicol (PEG) combinados à variação de temperaturas e assistidos por ultrassom. Resultados apresentados por esses autores mostraram que a maior concentração de bixina (2,7

mg/g de extrato) foi alcançada no processo assistido por ultrassom com PEG como solvente (DAVID et al., 2022).

Outra forma de extração que promove a obtenção da maior parte da fração lipídica presente das sementes do urucum é a extração com fluido supercrítico. Porém ainda é uma técnica de alto custo na indústria (MORAES; ZABOT; MEIRELES, 2015).

Um método físico de extração que também é utilizado como alternativa na indústria é o uso do atrito mecânicos entre as sementes do urucum e a extração do pigmento por fricção. Este método apresenta algumas vantagens, como a redução do tempo, a redução ou eliminação do uso de solventes, além do aumento do rendimento de extração e a melhoria da qualidade dos extratos. Esta tecnologia utiliza equipamentos simples, como um moinho de bolas ou um leito de jorro,. Na técnica que utiliza o leito de jorro, que apresenta um melhor controle do processo, basicamente um gás é injetado por um bico no centro de uma base cônica ou plana, parcialmente preenchido com a amostra, onde o fluxo de gás passa pela amostra em alta velocidade separando as partículas por diferença de densidade e, posteriormente, a obtenção do pigmento no estado sólido (TAHAM; SILVA; BARROZO, 2016).

Embora diferentes solventes sejam propostos para extrações eficientes, a água é sugerida como um solvente seguro e de baixo custo para a extração de diversos corantes. Dentre os carotenoides os derivados da bixina e seus isômeros são os que possuem melhor interação com a água (TAY-AGBOZO; STREET; KISPERT, 2018). Entretanto, para uma extração comercial é necessário a utilização de uma solução alcalina para promover a hidrólise (saponificação) da bixina e produzir um sal de bixina ou norbixina solúvel em água. A mudança na temperatura pode resultar numa melhor extração sendo que os estudos apontam o limite de até 70 °C para evitar a degradação do corante. Contudo, ainda existem poucas informações precisas e ensaios robustos sobre a extração da bixina de sementes de urucum em solução aquosa (WITONO et al., 2022). Handayani e colaboradores (2021) realizaram o estudo da extração dos pigmentos do urucum utilizando a água, onde foi observada a presença de alcaloide, fenol, tanino e saponina, mas não houve a extração de flavonoides. Além disso, a variação no pH da solução aquosa não interferiu na extração, mas em temperaturas elevadas (70-90 °C) representa o aumento da concentração dos fitoquímicos no

extrato aquoso (HANDAYANI; HARYANTI; SULISTYO, 2021). De acordo com Husa e colaboradores (2018) a água é um solvente polar que pode ser usado para extrair bixina. Em relação à conservação dos extratos da semente de urucum, em água, estes extratos apresentam uma melhor estabilidade de armazenamento, por manter a sua cor por aproximadamente 25 dias a mais do que armazenados em solventes como metanol e acetona, apesar do teor de bixina no extrato com acetona ter sido maior (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018).

Segundo Tay Agbozo (2018) a maioria dos carotenoides, como zeaxantina, astaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno aparecem na natureza como isômeros trans que são insolúveis em água (TAY-AGBOZO, 2018). Dos poucos carotenoides que aparecem na forma cis isômeros na natureza, a bixina está entre os menos estudados exibindo uma maior solubilidade em água em relação aos carotenoides insolúveis em água.

3.7. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE CAROTENOIDES

A bixina e a norbixina que constituem uma pequena parte dos carotenoides presentes nas sementes de urucum, podem ser identificadas e quantificadas através de diversos métodos analíticos (VILAR *et al.*, 2014).

Dentre estes métodos, a técnica espectroscópica de absorção molecular da região do UV-VIS se torna uma técnica analítica importante na determinação da bixina, pois a sua estrutura molecular apresenta ligações duplas alternadas o que favorece as transições $\pi - \pi^*$ que absorvem a luz nessa faixa espectral. Por isso, é comum a absorvidade no intervalo de 300-500 nm dos carotenoides.

A análise espectrométrica dos extratos de sementes do urucum pode ser utilizada para a quantificação dos analitos presentes na amostra (SANTOS *et al.*, 2014). Dessa forma, as medidas de absorção nos dois picos espectrais mais intensos, sendo o pico em 487 nm o mais recomendado por sofrer menos interferência de produtos de decomposição (RAHMALIA *et al.*, 2014).

Outra análise espectrométrica para identificar os carotenoides presente nos extratos da semente do urucum é a espectroscopia infravermelha (IV). As bandas de

absorção, apresentam-se em uma frequência em 1740 e 1700 cm^{-1} , o que indica o estiramento C=O, característico dos isômeros da bixina e norbixina (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018). Além disso, as bandas entre 1300-1050 cm^{-1} indicam a ligação simples C-O, característico de ésteres e ácidos carboxílicos (BARANSKA, 2014; LUNDE; ZECHMEISTER, 1955).

Além da espectroscopia, outro método é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE e *High Performance Liquid Chromatography* em inglês - HPLC). A cromatografia líquida é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais está estacionária enquanto a outra se move em uma direção definida. Existem alguns tipos de cromatografia, incluindo cromatografia planar e a cromatografia em coluna. A cromatografia é baseada na distribuição diferencial entre duas fases dos componentes de uma amostra complexa: A fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM). Por esse motivo, a mobilidade desses componentes sobre ou através da FE são diferentes, permitindo a sua separação. Na cromatografia líquida, a FM está na fase líquida e o próprio equipamento faz a mistura dos solventes na proporção indicada pelo operador.

Devido a (ou às) grandes variedades de estruturas moleculares dos produtos naturais, as polaridades são diversas (EL-ELIMAT *et al.*, 2013; GRIGALUNAS; BRAKMANN; WALDMANN, 2022). Por isso, diversos protocolos de análises com a cromatografia líquida são utilizados para a separação dos compostos presentes nos extratos naturais. Estes protocolos consistem principalmente na variação da coluna, assim como a composição da FE, e também as condições de análise como nos constituintes da FM e da temperatura (WOLFENDER, 2009).

As colunas que utilizam a FE com um grupo octadecil ligado a sílica gel, também conhecida como C18, aplicam-se na maioria das extrações em fase reversa, de extratos naturais. Além disso, este tipo de coluna demanda uma FM com mistura de solventes como água/acetonitrila e água/metanol (FUNARI *et al.*, 2012; SOBAŃSKA, 2021).

Na separação de um extrato que possui muitos analitos polares as colunas tradicionais para estes extratos não são recomendadas. Por isso, faz-se o uso de outras

alternativas de FE como alquil polar, ou alquil C30, a base de compostos aromáticos, por exemplo (PRZYBYCIEL, 2006). Outras colunas modernas são reportadas na literatura para a otimização da separação dos extratos naturais como as colunas monolíticas, que são polímeros porosos e aumentam a velocidade da separação (ALLA; STINE, 2022; MA *et al.*, 2018).

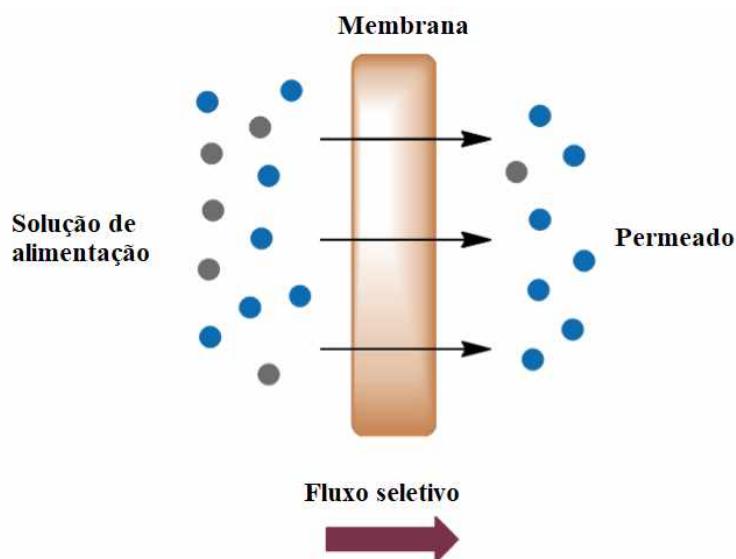
Para a detecção da amostra é comum que no equipamento de HPLC são utilizados detectores UV-VIS de comprimento de onda fixo e específicos para a absorção máxima dos isômeros de bixina e norbixina da amostra. Além disso, é reportado em análises de amostras onde os analitos presentes na semente do urucum, bixina e norbixina, são detectados por um arranjo de diodos (DAD), sendo esta técnica com uma alta seletividade e especificidade (SCOTTER, 2009).

3.8. PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

3.8.1. Tipos e características das membranas

Desde os anos 1700 os primeiros estudos com a utilização das membranas foram reportados com a finalidade de extrair a água do vinho em uma bexiga de origem animal. Diante disso, observou-se que existia a relação entre a permeabilidade e a seletividade das membranas em relação a sua finalidade e o tipo de amostra filtrada. Na década de 50 os processos de separação por membrana são definidos como uma barreira seletiva que separa as fases de espécies químicas que permeiam por meio da energia cinética. A Figura 7 é uma ilustração que representa um exemplo de processo de separação por membrana.

Figura - 7 Separação por Membrana.



Fonte: <https://www.pngwing.com/> adaptado.

Em relação aos materiais utilizados para a composição das membranas, podem ser divididas em grupos inorgânicos (metais e materiais cerâmicos) e poliméricos. Contudo, este último é o mais comum devido ao seu baixo custo e pela sua capacidade de formar filmes. Além disso, as membranas são classificadas em densas ou porosas, sendo que a morfologia das membranas se difere conforme a sua aplicação e podem manter as características de morfologia ao longo de sua sessão transversal. Por exemplo, as membranas anisotrópicas são suportadas por uma camada porosa e podem apresentar uma camada fina ($1\mu\text{m}$) que pode ser mais fechada ou não. Esta membrana é integral se for constituída por apenas um tipo de material e caso ocorra a adição de materiais diferentes em sua constituição, ocorre a formação de uma membrana composta (HABERT *et al.*, 2020).

Por ocorrer em temperatura ambiente, não haver mudança de fase e a seletividade dos poros, os processos de filtração por membranas são considerados cada vez mais vantajosos em relação ao consumo energético e maior economia. Dessa forma, amplia-se a aplicação deste tipo de filtração para compostos termossensíveis, e na determinação das partículas que serão retidas ou permeadas. Além disso, a facilidade na operação, montagem e instalação dos sistemas de separação por membranas tornam esta aplicação mais eficaz (MACHADO *et al.*, 2016).

O mercado global de tecnologia de membranas para o processamento de alimentos e bebidas é estimado em atingir cerca de US\$ 8,26 bilhões até 2024, com uma taxa de crescimento anual de 6,8% previsto para os próximos 5 anos. Esta previsão foi baseada nas regras e diretrizes da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e na demanda pelo uso da tecnologia de filtração por membrana para controle de contaminação. (TECHNAVIO RESEARCH, 2020).

Apesar da grande diversidade de técnicas para a extração da bixina das sementes do Urucum, estas técnicas acabam produzindo um extrato com impurezas como açúcares e proteínas. A comercialização deste produto como corante alimentício, pigmento têxtil e na medicina, exige da indústria um elevado grau de pureza para que não haja risco de contaminações, além de aproveitar totalmente das suas propriedades medicinais (GALANAKIS; FOUNTOULIS; GEKAS, 2012).

Disponibilizar no mercado produtos naturais, como a bixina, de elevada pureza significa maior competitividade e certeza de expansão comercial ao atender aos segmentos de maior tecnologia, como as indústrias farmacêuticas (PRAJAPATI; JADEJA, 2022).

Uma forma para se elevar o grau de pureza na extração da bixina é a utilização do método de extração utilizando um sistema aquoso bifásico (SAB). Dessa forma, o SAB são formados quando dois polímeros hidrossolúveis quimicamente distintos, um polímero e um sal, ou dois sais são misturados na água sob condições específicas de temperatura, pressão e composição. Isso o torna um processo ecologicamente correto (COLOSIMO *et al.*, 2022; JUNQUEIRA *et al.*, 2018).

Os tipos de separação por membranas podem ser distinguidos a partir da força motriz da operação. Esta força pode ser proveniente da diferença de concentração de solutos, como nos processos de diálise, pervaporação e osmose ou pela diferença de temperatura, como na destilação por membranas. Além disso, pode-se distinguir o tipo de separação por membrana em relação ao gradiente de potencial elétrico, como na eletrodialise e eletrólise por membranas, ou quando há diferença de pressão, como na microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (CASTRO-MUÑOZ *et al.*, 2022).

Convencionalmente, a microfiltração (MF) é utilizada para remover matéria e grandes impurezas, purificando macromoléculas como carboidratos e proteínas, além de ser usado como uma etapa de pré-tratamento em diversos processos analíticos. A ultrafiltração (UF) tem sido usada para purificar compostos específicos, tais como insulina, enquanto a nano filtração (NF), normalmente é utilizada na retenção de moléculas de baixo peso molecular, por exemplo, polifenóis. Além disso, a NF também é amplamente utilizada no tratamento de águas residuais e dessalinização, e para a separação de aminoácidos de fermentação, por exemplo, L-glutamina. A NF tem mostrado alta separação de pequenas moléculas carregadas devido à seletividade nas membranas, o que fez da NF um importante avanço na indústria (BIRKEDAL KRISTENSEN *et al.*, 2022).

As membranas utilizadas na MF, UF e NF compreendem uma barreira seletiva para a separação das fases, impedindo a passagem das espécies químicas desejáveis, sendo que, as propriedades físico-químicas estão relacionadas com o processo de separação da amostra interagindo ou não com o filtrado. A classificação das membranas está relacionada com a sua porosidade em ordem crescente de partícula como nas densas, isotrópicas ou anisotrópicas

A Tabela 2 a seguir, apresenta os diferentes processos de separação por membrana e suas propriedades específicas que fundamentam sua origem.

Tabela - 2 Características dos processos de separação por membranas.

| Processo de separação por membranas | Força motriz | Natureza da amostra | Aplicações |
|-------------------------------------|--|--|---|
| MF | Gradiente de pressão (ΔP) (0,5 a 2 atm) | Sólidos em suspensão Massa molar > 0,01 μ M | Clarificação de bebidas, concentração de células, esterilização |
| UF | ΔP (1 a 7 atm) | Macromoléculas Massa molar > 5000 Da. | Concentração de Proteínas |
| NF | ΔP (5 a 25 atm) | Moléculas Massa molar < 2000 | Purificação de enzimas |

| | | | |
|----------------|--|--|----------------------------------|
| Osmose Inversa | ΔP (15 a 80 atm) | Microssolutos | Dessalinização de águas |
| Diálise | Gradiente de concentração (ΔC) | > 0,02 μm são retidos; > 0,005 μm na hemodiálise | Hemodiálise |
| Eletrodiálise | Gradiente de potencial elétrico (ΔE) | Íons | Concentração de soluções salinas |
| Pervaporação | Pressão de Vapor | Líquidos menos permeáveis | Desidratação de álcool |

Fonte: Adaptado de (HABERT *et al.*, 2020; HO; SIRKAR, 1992).

Machado *et al.* (2016) usaram um processo sequencial de microfiltração e nanofiltração para clarificar, purificar e concentrar os açúcares pré-bióticos a partir do extrato de alcachofra (MACHADO *et al.*, 2016).

Ferreira *et al.* (2020) reportaram o processo de microfiltração do extrato da fruta de aração roxa, sendo que este método reduziu os valores totais de sólidos e turbidez e não afetou a quantidade de compostos bioativos do extrato. Dessa forma, o processo de microfiltração é sugerido como um processo eficiente para concentração de bioativos e clarificação do extrato desta fruta rica em polifenóis (FERREIRA *et al.*, 2021).

Contudo, as alterações na resistência do sistema hidráulico podem diminuir a eficiência da filtração. Dentre as propostas para minimizar estes problemas, o controle das incrustações como a aplicação de um campo elétrico ou magnético, e a modificação do fluxo limiar e o pH são alternativas utilizadas na indústria (ZHU *et al.*, 2017). A aplicação de ultrassom durante a filtração é uma alternativa promissora para reduzir as ocorrências de incrustação, devido à diminuição da formação de matéria que impede o bloqueio dos poros da membrana. Consequentemente, obtém-se um extrato com maior nível de pureza (SOUSA *et al.*, 2016).

3.8.2. Ultrafiltração

Como alternativa aos processos tradicionais de purificação (por exemplo, o uso de solventes orgânicos e métodos cromatográficos), a filtração por membrana, especialmente a UF, tem sido demonstrada como um método eficaz de purificação de extratos naturais de plantas. É comumente utilizada para separar amostras com massa molar entre 1000 a 1.000.000 Da. Além disso, o tamanho dos poros variam de

1 a 100 nm e por isso exigem uma maior força motriz, com pressões na faixa de 100 a 1000 KPa (KAO, 2012).

O menor custo de operação e maior qualidade do produto do que os métodos tradicionais de purificação, são algumas vantagens da UF. Entretanto, um dos problemas enfrentados na indústria é causada pela incrustação causada pela deposição de impurezas coloidais e macromoléculas do extrato na membrana causando uma queda no fluxo da filtração (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

O desempenho de uma determinada membrana UF depende de vários fatores incluindo pressão transmembrana, velocidade de *crossflow*, concentração de sólidos dissolvidos, características de incrustação e a curva de retenção nominal (*cut off*) (PHILIP, 1984). Esta curva é um termo associado ao tamanho dos poros e é usado para descrever as capacidades de separação de uma membrana UF. Refere-se a massa molar de um soluto, tal como uma proteína globular, que possui um coeficiente de rejeição de 90% pela membrana sob condições padrão (CHERYAN, 1998; HABERT *et al.*, 2020).

Como se sabe, a UF também é uma técnica de separação amplamente utilizada no separação e purificação de proteínas e outros compostos biológicos, principalmente porque pode ser realizada em condições de temperatura amena (GÓMEZ-LOREDO; GONZÁLEZ-VALDEZ; RITO-PALOMARES, 2015). Destaca-se que, ainda não foram reportados estudos sobre a extração e purificação da bixina do urucum como o uso de membranas de separação.

Recentemente, alguns estudos foram realizados a fim de avaliar a viabilidade da ultrafiltração para concentração de carotenoides e purificação de sucos de frutas utilizando uma abordagem industrial. Nas análises de amostras de suco de laranja, houve a produção de um extrato de carotenoide concentrado entre 5 e 10 vezes, com desempenhos de processo relevantes, os autores forneceram e validaram um modelo baseado em suposições simples a fim de prever os fatores de concentração e purificação de acordo com as condições específicas ou vice versa em qualquer escala de filtração (POLIDORI; DHUIQUE-MAYER; DORNIER, 2018; SERVENT *et al.*, 2020).

3.8.3. Polarização e *fouling*

Durante o processo de separação através de membranas, dois fenômenos são cruciais para seu desempenho: a polarização de concentração e a incrustação (*fouling*). Estes fenômenos estão inter-relacionados e causam o aumento da resistência à transferência de massa na membrana e, como consequência, o declínio do fluxo de permeado (HUANG et al., 2018).

A polarização da concentração ocorre naturalmente devido a seletividade da membrana. Diante disso, forma-se uma camada que limita a transferência de massa pela superfície da membrana devido ao acúmulo de partículas sobre a membrana. As consequências deste fenômeno promovem a diminuição da atividade do solvente e a redução do fluxo deste solvente através da membrana de forma inevitável, porém pode ser reversível com a diminuição da pressão de operação ou com a movimentação fluídica na membrana.

O processo de incrustação da membrana também é evidenciado pela redução do fluxo permeado e ocorre devido ao acúmulo de material na membrana causados pela adsorção da membrana com as partículas da solução, pelo bloqueio dos poros devido ao tamanho dos solutos, pela deposição de partículas que formam camadas sob a superfície da membrana, e também pela formação de gel causada pela característica específica de alguns solutos.

Em relação ao bloqueio completo dos poros, ocorre a dependência do tamanho das partículas que irão tentar atravessar os poros abertos, mas devido ao tamanho menor impedem completamente a passagem do fluxo. Além disso, este bloqueio pode ocorrer de forma parcial ou internamente, quando as paredes das membranas sofrem a deposição do soluto (HABERT *et al.*, 2020)

Alguns tipos de solutos podem formar na superfície da membrana uma camada de torta que irá reduzir o fluxo. Apesar de contribuir para a redução no fluxo pela membrana, a torta pode promover uma camada de proteção contra a incrustação indesejada, caso seja inerte e estável. (REIS *et al.*, 2019)

O grau de incrustação da membrana determina a frequência de limpeza, a sua vida útil e a dimensão necessária. Consequentemente, elevam-se os custos, o projeto e a operação das plantas de membranas (SIAVASH MADAENI; MOHAMAMDI; KAZEMI MOGHADAM, 2001).

Diante disso, algumas técnicas complementares devem ser usadas para inibir a polarização e a incrustação, por exemplo, o uso de técnicas de aumento de fluxo, ultrassom, retrolavagem com ar ou N₂, retrolavagem com fluxo pulsante (KAZEMI *et al.*, 2017; SU; LIU; WILEY, 1993; WU *et al.*, 2018). Além disso, A redução da interação entre proteínas e outros contaminantes com a membrana utilizando modificações na superfície da membrana também pode ser útil para reduzir os fenômenos de incrustação (LI *et al.*, 2021; RANA; MATSUURA, 2010)

3.8.4. Principais aplicações do processo de separação por membranas

Numerosos estudos revelaram o forte potencial da membrana em processos para a separação e concentração de compostos bioativos (BHATTACHARJEE, & DUTTA, 2017). Dentre os vários estudos disponíveis na literatura, a separação de solutos de baixo peso molecular usando a ultrafiltração ou a nanofiltração apresenta interesse crescente da comunidade científica.

Machado e colaboradores (2015) reportaram os resultados sobre a concentração de carotenoides e polifenóis do extrato aquoso de fruto do pequi por processos de ultrafiltração e nanofiltração. O desempenho da membrana foi avaliado em termos de fluxo de permeado e composição de permeado e retentato em relação aos carotenoides e, conteúdo de substâncias fenólicas. Dessa forma, os resultados apresentam que a ultrafiltração e as duas diferentes membranas de nanofiltração apresentaram coeficientes de rejeição em torno de 98%, 100% e 100% dos carotenoides e 65%, 94% e 97% dos compostos fenólicos, respectivamente, demonstrando que a nanofiltração indica um melhor desempenho na recuperação dos compostos (MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2015).

Paes e colaboradores (2015) apresentaram estudos visando a concentração de licopeno em extratos da polpa de papaia, onde foi avaliado o desempenho de duas membranas de ultrafiltração (UF), uma feita de polissulfona com 100 kDa (PS 100) e

outra de polietersulfona com 50 kDa (PES 50), em diferentes condições de pressão e velocidade tangencial. Diante disso, observou-se que para as duas membranas testadas, a retenção de licopeno foi superior a 90%, sendo que, o melhor desempenho da UF foi obtido com a membrana PS 100, pressão 1 bar e velocidade tangencial 6 ms^{-1} (PAES; DA CUNHA; VIOTTO, 2015).

Tsui e colaboradores (2004), avaliaram o desempenho de doze membranas comerciais e protótipos de nanofiltração quanto à sua estabilidade e desempenho para etanol aquoso. Foram considerados a troca de solventes, água, etanol e solução aquosa de etanol, o fluxo das soluções, a dependência das membranas com a viscosidade das soluções. Dessa forma, os estudos apontam que uma dessas membrana (DK) apresentam os estudos rejeição com açúcares, glicóis e lipídios indicando que o *cut-off* de peso molecular (MWCO) desta membrana é maior em soluções aquosas de etanol do que em água (TSUI, 2004).

A partir dos experimentos para a purificação de compostos fenólicos de extrato de chá verde, Sousa e colaboradores (2016) observaram que o processo de ultrafiltração assistida por ultrassom, mostrou que o fluxo constante através da membrana pode ser até 4 vezes maior. Esta melhoria de fluxo está associada com o diminuição na formação de incrustações (SOUSA *et al.*, 2016).

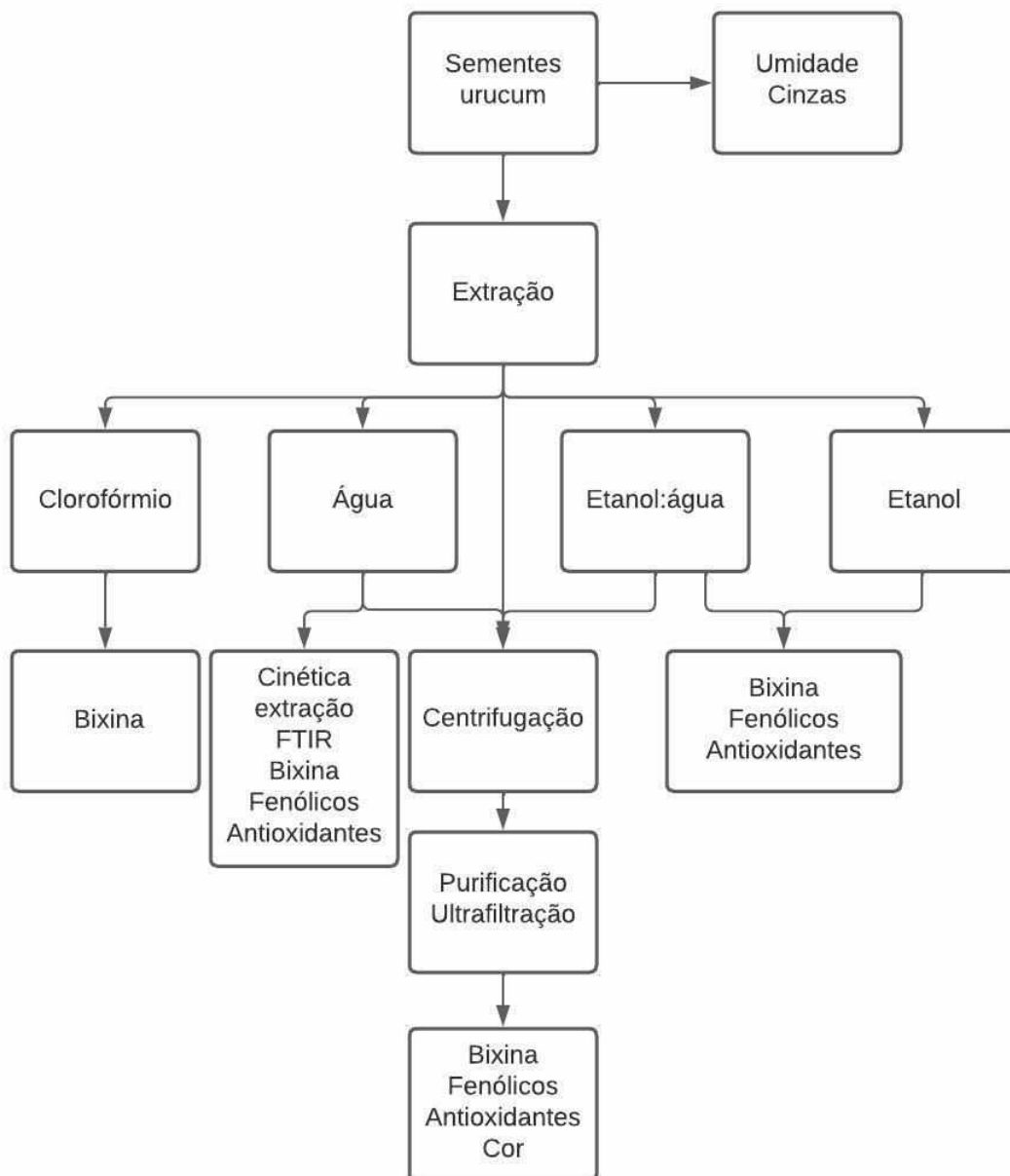
Monteiro *et al.* (2021) através da ultrafiltração apresentou os melhores resultados para purificação parcial de fenólicos totais e para atividade antioxidante do tanase de *Saccharomyces cerevisiae* CCMB 520, para aplicação no suco integral de pitanga.

Assim, este projeto vem de encontro às necessidades de concentração de compostos bioativos presentes em matrizes alimentícias, utilizando urucum como caso de estudo, em um processo que garanta a estabilidade e pureza dos compostos extraídos (processo de filtração por membranas).

METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia Química (UFU).
A Figura 8 ilustra as etapas realizadas.

Figura - 8 Etapas experimentais realizadas



3.9. Material

As sementes de urucum foram obtidas no comércio local da cidade de Uberlândia-MG e armazenadas em sacos de polietileno de cor escura em refrigerador (a -5°C) para posterior análise realizadas no laboratório de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os reagentes utilizados nas análises são indicados na Tabela 3. Todos utilizados em grau analítico.

Tabela - 3 Reagentes e fornecedores utilizados nas análises.

| Reagente | Fornecedor |
|---|---------------------|
| Ácido gálico PA | Dinâmica, Brasil |
| Folin-Ciocalteu | Cromoline, Brasil |
| Carbonato de Sódio Anidro | Prowuimios, Brasil |
| 2,2-Difenil-1-picriylidrazil (DPPH) | Sigma-Aldrich |
| Álcool metílico 99,8% | Vetec, Brasil' |
| Etanol 95% | Vetec, Brasil |
| Ácido Acético PA | Vetec, Brasil |
| Ácido Clorídrico PA | Impex, Brasil |
| Cloreto Férrico PA Hexahidratado | Alphatec, Brasil |
| Persulfato de potássio | SYNTH, Brasil |
| Acetato de sódio anidro PA | LSchemicals, Brasil |
| 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina TPTZ | Sigma-Aldrich |
| 2,2 Azino BIS(ácido etilbenzeno tiazolina 6 sulfônico) sal de diamônio)diammonium salt | Sigma-Aldrich |
| Acetona PA 99,5% | Alphatec, Brasil |
| Água destilada | Laboratório UFU |
| Clorofórmio PA | Dinâmica, Brasil |

3.10. Caracterização das sementes

As sementes de urucum foram caracterizadas quanto à umidade e cinzas de acordo com os métodos oficiais publicados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) cujas metodologias são descritas a seguir.

3.10.1. Umidade

O procedimento foi realizado conforme método 935.29 (A.O.A.C., 2005). Pesou-se uma determinada massa de sementes e, em seguida, estas foram colocadas em estufa a 105°C por 24 h. Na sequência a amostra foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada em balança analítica (Acculab).

O percentual de umidade das amostras foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$U (\%) = \frac{W_u - W_s}{W_u} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

W_u = Massa úmida (g)

W_s = Massa seca (g)

3.10.2. Cinzas

O procedimento foi realizado conforme método 923.03 (A.O.A.C., 2005). Uma determinada massa de sementes foi pesada e inserida em cadinho de porcelana previamente aquecido em estufa a 105°C. Na sequência fez-se a incineração da amostra em mufla (Jung-LF00614, Brasil) a 550°C por 4 h. Posteriormente resfriou-se a amostra em dessecador até temperatura ambiente para ser pesada em balança analítica.

A porcentagem de cinzas foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\text{Teor de cinzas} \% = \frac{\text{massa de cinzas}}{\text{massa da amostra}} \times 100 \quad (2)$$

3.11. Preparação do extrato

Inicialmente foram realizadas extrações a partir das sementes de urucum utilizando clorofórmio PA, etanol (95%), etanol (95%):água (50:50, v:v) e água destilada como solventes. Pesquisas e estudos preliminares foram feitos para fixar as condições de temperatura para extração dos compostos presentes no extrato do urucum. As extrações foram realizadas a 50°C por 60 min com razão semente de urucum para solvente de 1:30 (massa:volume), porém para o clorofórmio foi utilizado um tempo de 240 min até completa exaustão dos pigmentos das sementes para quantificação do teor total de bixina, conforme indicado por Taham *et al.* (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

As extrações foram realizadas sob agitação magnética a 150 rpm com controle de temperatura (Ika MAG HS 7) e utilizou-se um soxhlet acoplado a um banho de refrigeração a 50°C para extração utilizando clorofórmio e etanol como solventes. Os extratos foram evaporados em evaporador rotativo a vácuo (IKA HB100) e posteriormente secos em estufa a 40°C por 12 h. Após secagem, as amostras em pó foram armazenadas sob refrigeração a -5°C e protegidos da luz para posterior análises.

Ao final dos ensaios os extratos foram analisados para determinação do teor de bixina para comparação de eficiência entre os diferentes solventes em relação à concentração de bixina encontrada no extrato de clorofórmio, usada como referência.

3.12. Cinética de extração aquosa

Para a extração utilizando água destilada na temperatura de 50°C e com razão semente:solvente de 1:30 (massa: volume) avaliou-se a cinética da extração ao longo do tempo.

Os perfis de extração da bixina foram ajustados aos modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem, conforme sugerido na literatura (YAN *et al.*, 2017) e apresentados nas Equações (3) e (4). Valores dos coeficientes de determinação (R^2) foram usados como

critérios para adequação de ajuste de dados. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

$$\ln(C_e - C_t) = \ln(C_e) - k_1 t \quad (3)$$

$$\left(\frac{t}{C_t}\right) = \left(\frac{1}{k_2 C_e^2}\right) + \left(\frac{t}{C_e}\right) \quad (4)$$

Onde C_t é a concentração (g de bixina/ 100 g de semente) no dado tempo de extração t (min), C_e é a concentração (g de bixina/ 100 g de semente) no equilíbrio, e k_1 (min^{-1}) e k_2 (min^{-1}) são as constantes de taxa de acordo com os modelos cinéticos de primeira e segunda ordens, respectivamente.

3.13. Pré-tratamento e centrifugação extratos aquoso e etanólico

Previamente, os sólidos suspensos presentes no extrato utilizando água e a mistura etanol:água foram removidos por filtração à vácuo com papel de filtro de 12 μm (Unifil, Brasil). Após as extrações, os extratos das sementes de urucum passaram pelo processo de centrifugação por 20 min a 8000 rpm em centrífuga Beckman Coulter Avanti J25 como pré-tratamento físico. Duas fases foram identificadas como pode ser visto na Figura 9: uma fase sólida decantada e uma fase líquida sobrenadante, sendo o sobrenadante utilizado nos processos de concentração/purificação.

Figura - 9 Extratos a) aquoso e b) etanol:água, após centrifugação



3.14. Processo de ultrafiltração do extrato

3.14.1. Compactação da membrana

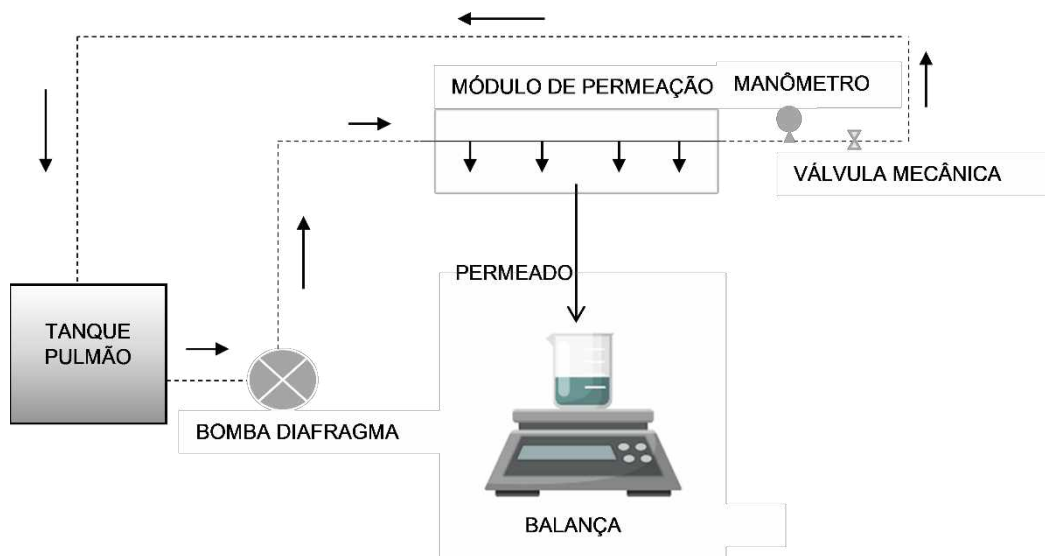
Anteriormente aos processos de purificação, as membranas foram compactadas com a passagem de água ultrapura e etanol: água ultrapura (50:50, v:v) na pressão de operação por 60 min para que as membranas tivessem sua estrutura adaptada ao sistema (compactação da membrana). Realizou-se, em seguida, a determinação da permeabilidade hidráulica da membrana, que corresponde ao coeficiente angular da reta obtida no gráfico de fluxo de permeado em função da pressão de operação.

3.14.2. Filtração tangencial

Os extratos aquosos e etanólico obtidos no processo de extração a 50°C com razão semente:solvente de 1:30 (massa:volume) por 60 min foram submetidos ao processo de concentração por ultrafiltração. Os extratos centrifugados foram filtrados através de uma membrana polimérica plana comercial de polietersulfona (Microdyn-Nadir®) de 10 kDa e área superficial total de 0,0038 m². A membrana foi previamente caracterizada de acordo com sua permeabilidade hidráulica.

A Figura 10 apresenta a unidade experimental de ultrafiltração utilizada em operação *cross-flow*. O extrato aquoso das sementes de urucum foi bombeado por uma bomba diafragma (100 W, 12 V) do tanque de alimentação para o módulo de ultrafiltração. Foi utilizado um volume de alimentação de 600 ml para o extrato aquoso e 400 ml para extrato etanol:água em todos os experimentos. Utilizou-se uma válvula mecânica para ajuste da pressão. A pressão transmembrana foi verificada com auxílio de um manômetro.

Figura - 10 Sistema de Ultrafiltração utilizando processo de separação por membrana de 10 kDa no processo tangencial.



Fonte: Autor.

A Figura 11 apresenta o módulo de filtração que é composto por dois discos em aço inox, onde a membrana é acoplada na parte central, na parte superior são inseridos os dutos de entrada do extrato e saída do concentrado e na parte inferior o duto de saída do permeado. A corrente de permeado foi continuamente retirada, enquanto a corrente de retido era continuamente retornada para o tanque de alimentação.

Figura - 11 Módulo e membrana polimérica de 10 kDa para sistema de ultrafiltração.



Fonte: Autor

O extrato foi filtrado a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) com pressão transmembrana de 6,0 bar e a uma velocidade de *cross-flow* de 8,22 cm·s⁻¹. A velocidade de *cross-flow* foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$V_{\text{cross-flow}} = \frac{V_a}{A} \quad (5)$$

Onde,

$V_{\text{cross-flow}}$ é a velocidade de *cross-flow* (cm·s⁻¹),

V_a é a vazão de alimentação (14,4 cm³·s⁻¹) e

A é a área do canal de alimentação do módulo da membrana (1,75 cm²).

Utilizou-se um fator de concentração de 3 para o extrato aquoso e 1,2 para o extrato etanol:água, calculado pela divisão do volume de alimentação pelo volume de concentrado, com a finalidade de atingirmos o objetivo da concentração. O fluxo de permeado foi calculado de acordo com a Equação 7.

$$J_p = \frac{V}{A \cdot t} \quad (7)$$

Onde,

J_p = Fluxo de permeado (L· m² · h⁻¹)

V = Volume de permeado (L)

A =Área da membrana (m²)

t = tempo necessário para permear determinado volume de líquido (h)

3.14.3. Ajuste matemático do decaimento de fluxo

A modelagem matemática do decaimento de fluxo ao longo do tempo de filtração foi feita para todas as filtrações.

Os valores experimentais de fluxo de permeado ao longo do tempo de ultrafiltração foram ajustados ao modelo de (FIELD *et al.*, 1995) (Equação 8), a fim de verificar o mecanismo predominante de *fouling* na membrana.

$$\frac{-dJ}{dt^{n-2}} = k(J - J_{SS}) \quad (8)$$

Onde J é o fluxo de permeado ($L h^{-1} m^{-2}$), J_{SS} é o fluxo obtido no estado estacionário ($L h^{-1} m^{-2}$), t é o tempo de filtração (h), k é uma constante empírica e o índice n representa o mecanismo de incrustação predominante de acordo com a Tabela 4 (n = 0 para filtração de torta; n = 2 para bloqueio completo de poros; n = 1 para bloqueio parcial de poros e n = 1,5 para bloqueio interno de poros).

Tabela - 4 Mecanismo de incrustação da membrana

| N | Mecanismo de bloqueio | Equação linearizada |
|-------|------------------------|-----------------------------------|
| n=2 | Bloqueio completo | $\ln J p = \ln J - k_c t$ |
| n=1,5 | Bloqueio padrão | $J p^{-0,5} = J_0^{-0,5} + k_p t$ |
| n=1,0 | Bloqueio intermediário | $J p^{-1} = J_0^{-1} + k_i t$ |
| n=0 | Formação de torta | $J p^{-2} = J_0^{-2} + k_t t$ |

Para resolver as equações, foi utilizada a modelagem matemática Runge-Kutta de quarta ordem, onde os valores dos coeficientes de regressão foram combinados com os aspectos visuais do gráfico e da membrana para determinar o tipo de incrustação predominante.

3.14.4. Resistências

O modelo de resistência em série foi também utilizado para verificação do fouling durante processo de filtração (SUN *et al.*, 2018). A resistência hidráulica da membrana (R_M , Equação 9) foi determinada a partir da filtração de água ultrapura Milli-Q através de uma membrana limpa na pressão transmembrana de 6 bar.

$$R_M = \Delta P / \mu J_{W0} \quad (9)$$

onde R_M é a resistência hidráulica da membrana (m^{-1}), ΔP é a pressão transmembrana (bar), μ é a viscosidade da água a 25 °C ($1,002 \times 10^{-3} Pa \cdot s$) e J_{W0} é o fluxo volumétrico de água pura através de uma membrana limpa ($Kg \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$).

Posteriormente à filtração do extrato das sementes de urucum, calculou-se a soma das resistências do bloqueio dos poros (R_P) e da formação de torta (R_C) através da medição do fluxo de água através membrana da membrana suja na pressão transmembrana de 6 bar, conforme apresentado na Equação 10.

$$R_P + R_C = \frac{\Delta P}{\mu J_{W1}} \quad (10)$$

onde R_P e R_C são resistências devido ao bloqueio de poros e formação de torta (m^{-1}) e J_{W1} é o fluxo volumétrico de água através membrana da membrana suja ($Kg s^{-1} m^{-2}$).

Para determinação da resistência individual devido ao bloqueio dos poros (R_P) foi removida a camada de torta aderida à membrana, utilizando suavemente uma esponja. Então, fez-se a filtração de água pela membrana na pressão transmembrana de 6 bar e a resistência devido ao bloqueio dos poros foi determinada pela Equação 11.

$$R_P = \frac{\Delta P}{\mu J_{W2}} \quad (11)$$

onde R_P é a resistência devido ao bloqueio dos poros (m^{-1}) e J_{W2} é o fluxo volumétrico de água após a remoção da torta ($Kg s^{-1} m^{-2}$).

O valor individual da resistência devido à formação de torta foi determinado subtraindo-se os valores encontrados nas Equações (10) e (11).

3.14.5. Caracterizações dos extratos de urucum

Os extratos foram caracterizados com relação ao teor de bixina, atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos totais, cor e presença de grupos funcionais nas frações de alimentação, concentrado e permeado. Todas as análises foram realizadas em triplicado e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.14.6. Teor de Bixina

Os valores do teor de bixina nos extratos foram determinados pelo método espectrofotométrico conforme procedimento recomendado pela FAO (JECFA/FAO, 2006). Os extratos líquidos foram evaporados utilizando evaporador rotativo e secos em estufa a 40°C por 12 h. Uma determinada massa do extrato seco (m_{EXT}) foi diluída em acetona até um volume (V_1) para a leitura inicial de absorvância variando entre 0,2 e 1,0. Caso necessário, uma segunda diluição deve ser realizada de forma a considerar um volume de alíquota (V_a) retirada da primeira diluição que será então diluída novamente em acetona (V_2) para condução de testes de diluição até atingirmos concentrações adequadas para leitura de absorvância da amostra variando entre 0,2 e 1,0. A absorvância da amostra foi medida em uma cubeta de quartzo de 1 cm de largura a 487 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu- UV 1280. A concentração de bixina foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer utilizando $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 3090$ (1 g/ 100 ml)⁻¹ cm⁻¹, conforme determinado por FAO (2006) e reportado por Quiroz *et al.* (2019). A Equação 12 foi então utilizada para determinar a concentração de bixina.

$$\text{Teor de bixina}(\%) = \frac{A V_1 V_2}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times m_{EXT(g)} \times V_a} \times 100 \quad (12)$$

Onde,

A = Absorvância da amostra diluída em clorofórmio à 487nm.

V_1 = Volume de diluição inicial da amostra em clorofórmio (mL)

V_a = Volume da alíquota da amostra inicial considerada para diluição (mL)

V_2 = Volume de diluição final da amostra (mL)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de absorvância 3090(1g/100 mL)⁻¹ para bixina em acetona, FAO 2006).

m_{EXT} = Massa do extrato, g.

3.14.7. Teor de compostos fenólicos (TCF)

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada conforme método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Uma alíquota de 150

μL dos extratos diluídos no solvente da extração foi colocada em tubos de ensaio. O fator de diluição foi determinado a fim de obter valores de absorvância menores que 1,000. Em seguida adicionou-se 150 μL do reagente Folin Ciocalteu e 2700 μL de carbonato de sódio (28 g/L) (Na_2CO_3). As amostras foram encubadas em ambiente escuro por 30 min. A absorvância a 725 nm foi determinada em espectrofotômetro UV/Visível utilizando o espectrofotômetro Shimadzu- UV 1280 e a calibração foi feita com branco da amostra que foi feita nas mesmas condições do extrato, porém substituindo o extrato pelo solvente utilizado nas extrações.

O cálculo da concentração de compostos fenólicos totais foi feito através da curva de calibração entre absorvância e concentração de ácido gálico mostrada no Apêndice A. O resultado de fenólicos totais é equivalente a mg de ácido gálico por gramas de sementes (mg EAG/g semente).

3.14.8. Capacidade antioxidante (ABTS)

Utilizando a metodologia proposta por NENADIS *et al.*, 2014 uma solução estoque de ABTS foi preparada dissolvendo 192 mg de ABTS em 50 mL de água destilada e armazenada sob refrigeração (NENADIS *et al.*, 2004). Para solução de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) dissolveu-se 378,4 mg de persulfato de potássio em 10 mL de água destilada e armazenado em temperatura ambiente. Para o preparo do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foram dissolvidos 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 μL da solução de persulfato de potássio, e armazenados no escuro por 16 h. Posteriormente, 1ml desta mistura foi dissolvida em álcool etílico até obter uma absorvância de 0,70 a 734 nm. Para determinação da atividade antioxidante em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30 μL de extrato diluído no solvente da extração para tubos de ensaio e misturou-se com 3,0 mL da solução do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$. O fator de diluição foi determinado a fim de obter valores de absorvância menores que 1,000. A leitura de absorvância foi feita após 6 min à 734 nm. Para calibração do espectrofotômetro utilizou-se álcool etílico como branco.

O resultado da capacidade antioxidante por ABTS foi calculado através da curva de calibração mostrada no Apêndice C, relacionando absorvância pela concentração de trolox expressa em μM equivalente de trolox por L amostra.

3.14.9. Capacidade antioxidante (FRAP)

A capacidade oxidante do extrato foi estimada de acordo com método proposto por Pulido *et al.* (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Para a preparação do reagente FRAP utilizou-se 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10mM e 2,5 de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação. A solução de TPTZ 10 mM foi preparada dissolvendo-se 3,12 g de TPTZ em 5 mL de HCl 40 mM e completado o volume para 1 L em um balão volumétrico com HCl 40 mM. A solução tampão Acetato 0,3 M dissolveu-se 3,1 g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume para 1L com água destilada.

Para leitura de absorvância em 595 nm em uma alíquota de 90 μL do extrato diluído adicionou-se 270 μL de água destilada. Em sequência misturou-se 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por 30 min. Para calibração do espectrofotômetro utilizou-se reagente FRAP como branco.

A curva de calibração é uma relação da absorvância pela concentração equivalente de trolox em $\mu\text{M L}^{-1}$ mostrado no Apêndice D. A atividade antioxidante pela metodologia FRAP foi expressa em μM equivalente de trolox por L da amostra.

3.14.10. Cor

As medidas de cor foram expressas em termos de luminosidade L^* e os parâmetros de cromaticidade a^* e b^* usando um colorímetro (Konica Minolta Chroma Meter CR-5) no modo de transmitância. A coordenada L^* (luminosidade) significa o grau de claridade da cor. A coordenada a^* é mensurável em termos de intensidade de vermelho e verde, e a coordenada b^* está relacionada com a intensidade de amarelo e azul.

3.14.11. FTIR

O espectrômetro de transformada de Fourier (PerkinElmer, Spectrum Two) equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) foi utilizado para verificar os grupos funcionais no extrato aquoso. Os dados espectrais do FTIR-ATR variaram de 400 a 4000 cm^{-1} , com 120 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.15. Caracterização das sementes de urucum

Na primeira etapa do projeto foi feita a caracterização das sementes e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela - 5 Caracterização das sementes de urucum.

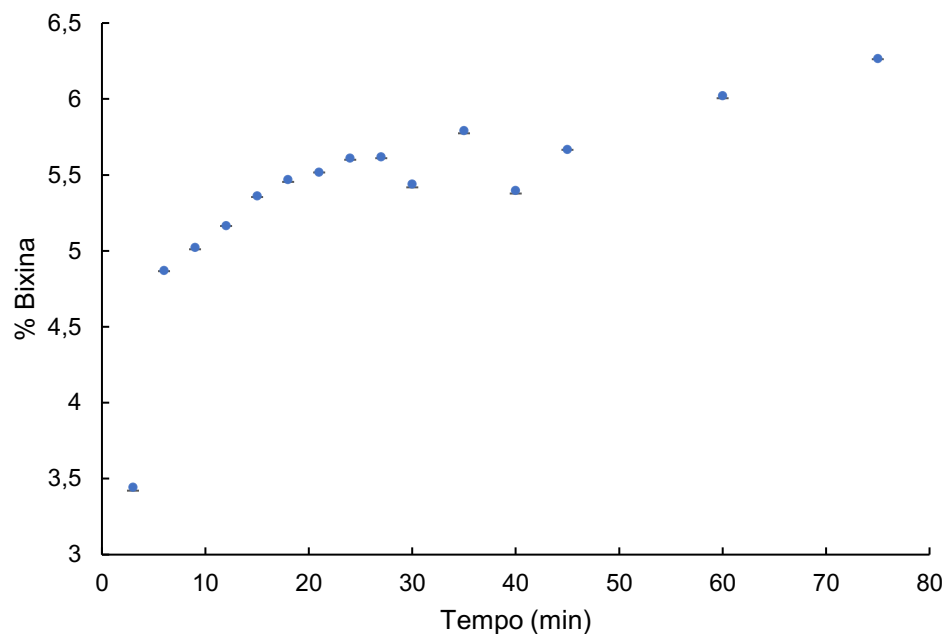
| Características | Médias \pm Desvio padrão | | |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| | Este projeto | Taham <i>et al.</i> (2015) | Albuquerque <i>et al.</i> (2012) |
| Umidade (g 100 g ⁻¹) | 12,9 \pm 0,2 | 11,5 \pm 0,2 | 12,3 \pm 0,17 |
| Cinzas (g 100 g ⁻¹) | 5,19 \pm 0,1 | 3,89 \pm 0,09 | 6,2 \pm 0,20 |

As sementes de urucum do presente trabalho apresentaram teor de umidade e cinzas semelhantes aos reportados na literatura para sementes de urucum. Os resultados corroboram com a caracterização das sementes realizada por TAHAM; CABRAL; BARROZO (2015) que reportaram valores de 11,5% e 3,89% para umidade e cinzas, respectivamente. As sementes de urucum utilizadas no trabalho de Albuquerque *et al* (2012) apresentaram 12,3% de umidade e 6,2% de cinzas e estão de acordo com os publicados neste trabalho.

3.16. CINÉTICA DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE BIXINA

Os resultados do teor de bixina da extração aquosa na temperatura de 50°C em uma relação de concentração de 1:30 (massa: volume) ao longo do tempo são mostrados na Figura 12.

Figura - 12 Cinética de extração aquosa do teor de bixina das sementes de urucum em função do tempo.



Pode-se observar que o aumento no tempo de extração causou um efeito positivo na extração de bixina das sementes de urucum. Observou-se que, com água na temperatura de 50° C e razão de concentração de 1:30 massa: volume, é necessário um tempo de aproximadamente 60 min para atingir a quantidade máxima de bixina de aproximadamente 6,2%.

Conforme descrito na metodologia, os perfis de extração das sementes de urucum foram ajustados aos modelos cinéticos de primeira e segunda ordem (Figuras 13 e 14, respectivamente).

Figura - 13 Perfil cinético de primeira ordem para extração aquosa de bixina com tempo.

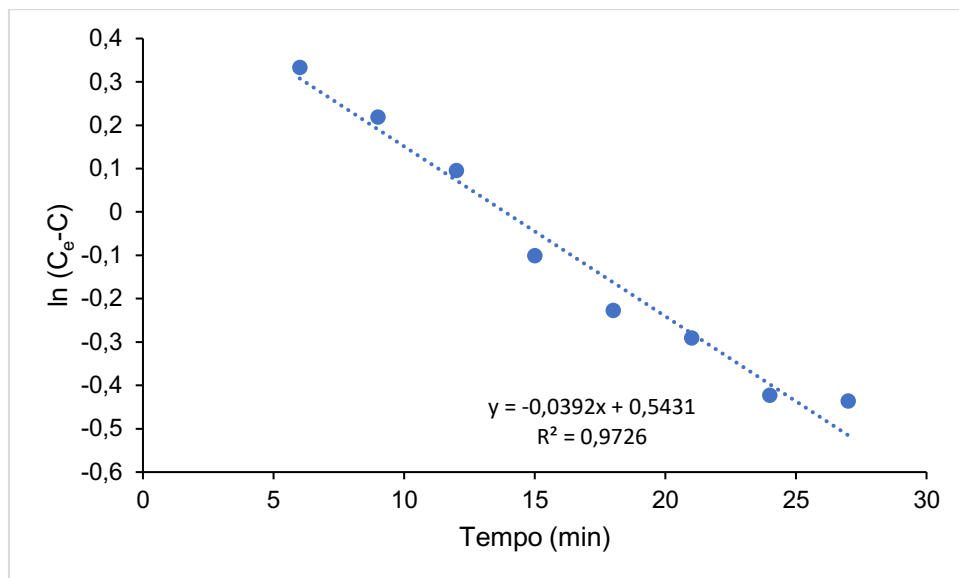
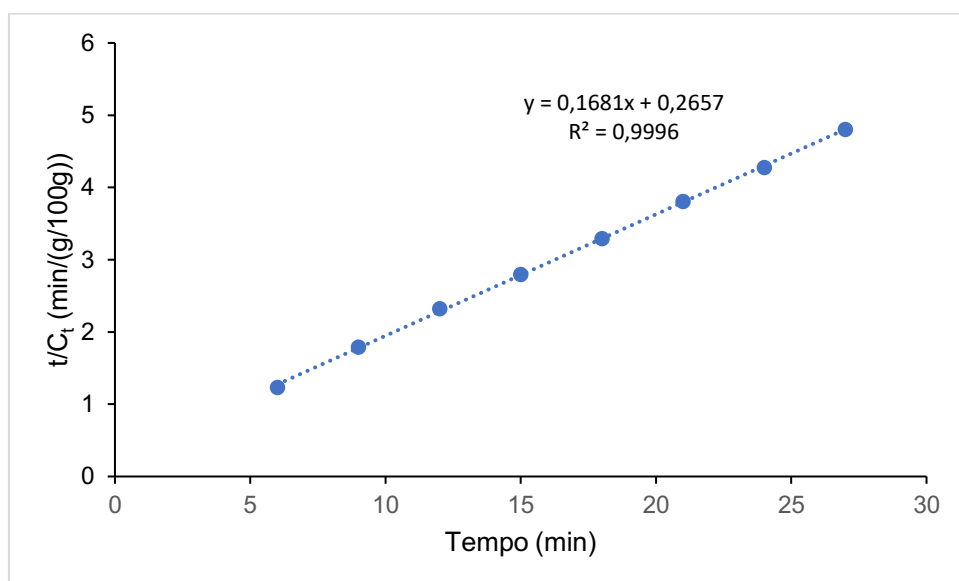


Figura - 14 Perfil cinético de segunda ordem para extração aquosa de bixina com tempo.



O modelo cinético de segunda ordem apresentou melhor ajuste à extração do que o modelo de primeira ordem conforme, apresentado na Tabela 6. Além disso, o modelo cinético de segunda ordem conseguiu prever com maior precisão o valor experimental da concentração de bixina no equilíbrio.

Tabela - 6 Valores do coeficiente de determinação R^2 para o ajuste dos perfis de extração do teor total de bixina das sementes de urucum para modelos cinéticos de primeira e segunda ordem.

| | R^2 | k (min^{-1}) | C_e (%) |
|-----------------|--------|---------------------------|-----------|
| 1ª ordem | 0,9726 | 0,0392 | 1,7213 |
| 2ª ordem | 0,9996 | 0,1063 | 5,9488 |

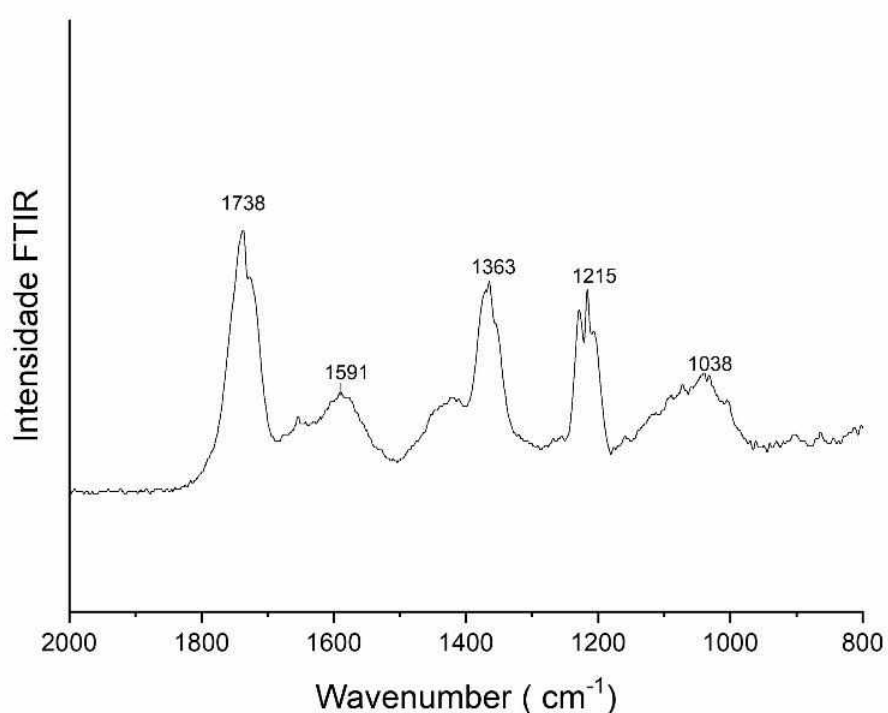
Assim, a extração de bixina das sementes de urucum pode ser definida em dois estágios sucessivos: (1) dissolução do soluto no solvente fresco através das sementes em contato com o solvente de extração que induz uma dispersão das partículas e uma solubilização dos compostos seguido por (2) uma depuração sólida com transferência de partículas por difusão molecular do interior das sementes, ou seja, diluição do soluto difundido no solvente para formação do extrato. Esta segunda etapa é mais lenta devido aos problemas de transferência de outros componentes e da modificação da estrutura das sementes. O modelo de segunda ordem também foi proposto na literatura para quantificar a taxa de extração de alburno de Tília (HAROUNA-OUMAROU *et al.*, 2007), taxa de extração de compostos antioxidantes de cascas de romã (P.; P., 2020) e compostos bioativos do fruto do araçazeiro roxo (FERREIRA *et al.* 2020).

3.17. GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO

O extrato aquoso de urucum obtido na temperatura de 50°C em uma relação de concentração de 1:30 (massa de semente: volume de solvente) e com tempo de extração de 60 min foi analisado por espectroscopia FTIR a fim de identificar os grupos funcionais presentes no extrato (Figura 15). Nos espectros FTIR do extrato de urucum utilizando água como solvente pode-se observar bandas em 1738 cm^{-1} , associada ao estiramento (C=O), em 1591 cm^{-1} atribuída ao estiramento (C=C) e em 1363 cm^{-1} atribuída ao estiramento (C-H). Também há picos na região 1215 e 1038 cm^{-1} relacionados ao estiramento (CO de ésteres). Com base nos resultados da análise do espectro infravermelho, sabe-se que a bixina possui um grupo OH, grupo carboxilato C = O, ligação CH, ligação dupla C = C e ligação CO dos ésteres. Husa *et.al* (2021)

reportaram espectros semelhantes para extratos de urucum (HUSA; HAMZAH; SAID, 2018).

Figura - 15 Espectros FTIR para extrato aquoso



3.18. CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS DE URUCUM OBTIDOS COM DIFERENTES SOLVENTES

Foram realizadas extrações das sementes de urucum utilizando clorofórmio etanol (95%), etanol (95%):água (50:50, v:v) e água como solventes. As extrações foram realizadas nas mesmas condições de temperatura (50°C), tempo (60 min) e razão semente de urucum para solvente de (1:30, massa: volume).

3.18.1. Teor de bixina

Os extratos utilizando clorofórmio, etanol, etanol: água e água como solventes apresentaram valores de teor de bixina de 10,34% $8,69 \pm 0,04$, $7,45 \pm 0,01\%$ e $6,02 \pm 0,02\%$ respectivamente. Conforme relatado na literatura, os rendimentos de extração de compostos bioativos de carotenoides são maiores com solventes orgânicos do que com a água. Vários solventes são relatados na literatura para extração de bixina de sementes de urucum, variando de hexano apolar a acetona semipolar ou acetato de etila a água polar, etanol, metanol ou soluções aquosas alcoólicas (BACHTLER; BART, 2021). Rodrigues *et al.* (2014) mostraram que maiores rendimentos de extração de bixina de sementes de urucum foram obtidos usando etanol do que água como solvente. No entanto, a extração com solventes orgânicos é limitada pela necessidade de um solvente compatível com o uso final do produto. Em alimentos, o corante estará sujeito a sérias restrições técnicas quanto à quantidade de resíduos de solventes potencialmente tóxicos.

A Tabela 7 apresenta uma comparação dos valores obtidos neste trabalho com aqueles reportados na literatura para extrações de corante de sementes de urucum utilizando os mesmos solventes que neste trabalho, porém em diferentes condições de extração.

Tabela - 7 Comparação dos valores de teor de bixina de extratos de semente de urucum utilizando etanol, etanol:água e água como solventes.

| Solvente | Temperatura (°C) | Tempo de extração (min) | Razão semente de urucum para solvente de (massa:volume) | Teor de bixina (%) | Referência |
|--------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|---|
| Clorofórmio | 50 | Até extração completa do pigmento | 1:10 | 2,47 | (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015) |
| Clorofórmio | 50 | 240 | 1:30 | 10,34 | Este trabalho |
| Etanol | - | - | 1:10 | 42,6 | (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008) |

| | | | | | |
|--------------------------|----|-----------------------------------|------|------------|---|
| Etanol | 40 | 60 | 1:10 | 18,5 | (KOUL; KOUL; TIKOO, 2003) |
| Etanol | 60 | 30 | - | 3,15 | (RODRIGUES <i>et al.</i> , 2014) |
| Etanol | 50 | 60 | 1:30 | 8,73±0,43 | Este trabalho |
| Etanol:água (1:1) | | - | 1:2 | 2,6 | (CARDARELLI; BENASSI; MERCADANTE, 2008) |
| Etanol:água (1:1) | 50 | 60 | 1:30 | 6,98±1,03 | Este trabalho |
| Água | 60 | 30 | - | 2,9 | (RODRIGUES <i>et al.</i> , 2014) |
| Água | 40 | 60 | 1:10 | 4,5 | (KOUL; KOUL; TIKOO, 2003) |
| Água | 50 | Até extração completa do pigmento | 1:10 | 1,18 | (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015) |
| Água | 50 | 60 | 1:30 | 6,02± 0,02 | Este trabalho |

Os resultados do teor de bixina da Tabela 7 foram associados à polaridade de cada solvente. O carotenoide bixina possui uma cadeia com 25 carbonos e dois grupos um ácido carboxílico e um éster metílico que é mais polar do que os carotenoides normalmente encontrados em alimentos (cadeia com 40 carbonos), e mostrou afinidade pelos solventes com polaridade média. Pode ser observado na Tabela 7 que o teor mais alto de bixina foi encontrado utilizando clorofórmio como solvente, embora extração com etanol, etanol: água e água também tenham sido eficientes.

De fato, a literatura apresenta diferentes valores para o teor de bixina mesmo que para o mesmo solvente de extração, visto que outras condições, tais como temperatura, processo de agitação e qualidade das sementes, podem influenciar no resultado. (BACHTLER; BART, 2021; TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015). Najjar *et al.* (1988) relataram que a incidência luminosa é o fator dominante na degradação da bixina (NAJAR; BOBBIO; BOBBIO, 1988) e essa degradação pode influenciar o resultado obtido.

3.18.2. Teor de compostos fenólicos totais

Os extratos utilizando etanol, etanol: água e água como solventes apresentaram valores de teor de compostos fenólicos totais de $3,811 \pm 0,51$, $2,908 \pm 0,07$ e $2,022 \pm 0,003$ mg EAG/g semente, respectivamente. De acordo com Chisté *et al.* (2011a), extratos de sementes de urucum apresentam concentração considerável de compostos fenólicos, sendo que os principais compostos fenólicos identificados no extrato de urucum são hipoletina e um derivado do ácido cafeico. Chisté *et al.* (2011b) realizaram uma extração exaustiva de compostos fenólicos presentes em sementes de urucum com uma mistura de metanol e água (8:2, v: v) sob radiação ultrassônica e reportaram um resultado de $1,7 \pm 0,1$ mg EAG/g, em base seca. Cardarelli *et al.* (2008) utilizaram diferentes solventes para extração de compostos fenólicos de sementes de urucum sob condição ultrassônica por 12 min com uma concentração de semente: solvente de 1:2 e para etanol puro e uma mistura de etanol e água (1:1) os resultados foram de $1,10 \pm 0,07$ e $1,57 \pm 0,01$ mg EAG/g de semente, respectivamente. De acordo com Cardarelli *et al.* (2008), o uso de solventes mais polares aumenta a eficiência de extração de compostos fenólicos. Assim, a maior polaridade da água em relação ao etanol favoreceu a extração aquosa dos compostos fenólicos. Por outro lado, Chisté *et al.* (2011) mostraram que o uso de etanol, água e uma mistura de etanol e água como solventes resultaram em um teor de compostos fenólicos estatisticamente equivalentes. O maior valor encontrado por Chisté *et al.* (2011) foi para o etanol puro como solvente de $0,52 \pm 0,05$ mg EAG/mL, que equivale a $1,04 \pm 0,10$ mg EAG/g de semente para a extração realizada na proporção de semente: solvente de 1:2 (m:v). Quiroz *et al.* (2019) realizaram a extração de compostos fenólicos de sementes de urucum com etanol puro como solvente na proporção de 1:6 (semente: solvente) por 5 min em um processo assistido por micro-ondas e o resultado obtido foi de $3,078 \pm 0,01$ mg EAG/g de semente (QUIROZ *et al.*, 2019). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos reportados na literatura.

3.18.3. Atividade antioxidante

A Tabela 8 apresenta os valores obtidos neste trabalho para atividades antioxidantes dos extratos de urucum com diferentes solventes. Conforme relatado por Chisté *et al.* (2011), como o teor de bixina nos extratos de acetato são maiores do que o conteúdo de compostos fenólicos totais, a bixina provavelmente contribui com maior influência do que os compostos fenólicos para a capacidade antioxidante dos extratos de urucum. Como o ensaio ABTS é baseado em uma única reação de transferência de elétrons entre o antioxidante testado e o radical formado (HUANG; RAS; TIAN, 2018), o carotenoide bixina é capaz de eliminar o radical ABTS·+ provavelmente devido à presença de elétrons ressonantes em suas muitas ligações duplas conjugadas (11 na estrutura bixina).

Tabela - 8 Atividades antioxidantes pelos métodos FRAP e ABTS do extrato de urucum com diferentes solventes.

| Método | Unidade | Solvente | | |
|--------|--------------------|--------------|------------|---------------------------|
| | | Etanol | Água | Etanol+água (1:1, v:v) |
| FRAP | μMTrolox/L extrato | 266,42±4,19 | 111,3±0,17 | 129,58±0,70 |
| ABTS | μMTrolox/L extrato | 137,91±12,01 | 96,07±0,35 | 117,06±1,40 |

Quiroz *et al.* (2019) realizaram a extração de compostos antioxidantes de sementes de urucum com etanol puro como solvente na proporção de 1:2 (semente:solvente) sob agitação por 48 h e os resultados obtidos foram de 174,782 ± 8,700 e 127,033 ± 2,517 μMTrolox/L extrato pelos métodos ABTS e FRAP, respectivamente. Zapata *et al.* (2020) avaliaram a estabilidade de extratos de urucum obtidos com etanol como solvente em extrações realizadas a 4°C por 60 h e os valores iniciais de ABTS e FRAP foram de aproximadamente 4500 μMTrolox/g. Chisté *et al.* (2011) reportaram valores de ABTS de 3630 ± 80, 3180 ± 190 e 4710 ± 160 μMTrolox/L extrato para extrações com água, etanol + água e etanol como solventes, respectivamente. Chisté *et al.* (2011) realizaram extrações sob agitação em temperatura ambiente por 15 h com razão semente: solvente de 1:2 (m:v). De fato, a comparação direta com valores reportados na literatura é algumas vezes prejudicada devido a diferentes unidades atribuídas, sendo diferentes bases consideradas, tais como volume de extrato, massa de sementes e massa de extrato seco.

3.19. PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS ESTANÓLICO E AQUOSO DAS SEMENTES DE URUCUM POR ULTRAFILTRAÇÃO

3.19.1. Permeabilidade da membrana

Inicialmente, fez-se a medida da permeabilidade de água pura e da mistura água: etanol (50:50, v:v) pela membrana utilizada, conforme apresentado nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Os valores experimentais de fluxo de água apresentaram uma relação linear com a pressão, conforme previsto pela lei de Darc, com um coeficiente de regressão quadrático (R^2) de 0,992. O comportamento linear de fluxo com relação à pressão também foi verificado para filtração da mistura etanol: água, com R^2 de 0,9638. Assim, os valores das permeabilidades de água e água: etanol pela membrana utilizada são de $67,76 \pm 2,74 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}$ e $14,94 \pm 0,87 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}$, respectivamente. SOUSA *et al.* (2016) utilizando uma membrana de 10 kDa definiu-se o valor de permeabilidade em $23,97 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}$. Comparando com a membrana de 10 kDa utilizada por FERREIRA *et al.* (2020) o valor da permeabilidade foi definido em $71,81 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}$ sendo o valor próximo e com mesma ordem de grandeza ao citato nesta literatura.

A permeação de solventes através das membranas é um processo de difusão que é intensificado pela interação entre o solvente e o domínio hidrofílico e/ou hidrofóbico da membrana. Assim, a afinidade da água para uma membrana com propriedades hidrofílicas promoveria o transporte, enquanto para o sistema etanol/água, na mesma membrana, o fluxo seria consideravelmente menor devido à limitada capacidade de ligação de hidrogênio do etanol. Em geral, para membranas com propriedades hidrofílicas dominantes, quanto maior a polaridade do solvente maior é o fluxo e o oposto é observado para membranas com características hidrofóbicas (BHANUSHALI *et al.*, 2001)

. Ainda, a viscosidade e o volume molar das soluções de etanol podem explicar parcialmente as diferenças no fluxo de solvente pela membrana (TSUI, CHERYAN, 2004). O valor da permeabilidade da água pela membrana é aproximadamente 4,8 vezes maior que da mistura etanol: água, de acordo com a

diminuição de viscosidade dos fluidos: 0.8914 mPa s para água pura e 2,0271 mPa s para uma mistura aquosa com aproximadamente 50% de etanol (KHATTAB, 2012).

Contudo, deve-se observar a importância do pré-condicionamento da membrana com o solvente antes do processo de filtração, conforme ressaltado por (TSUI, 2004). Conforme sugerido por PINTO *et al.* (2014) antes do uso, as membranas devem ser estocadas em água pura durante 12 h (PINTO *et al.*, 2014). Em seguida, as membranas devem ser embebidas com soluções de etanol começando com 10% (v/v) de etanol e depois com incrementos de 10-20% de etanol até a concentração final de etanol. Os testes com as soluções etanólicas serão repetidos aplicando esse procedimento de condicionamento da membrana a fim de verificar os resultados obtidos.

Figura - 16 Fluxo de água através da membrana de 10 kDa em função da pressão transmembrana.

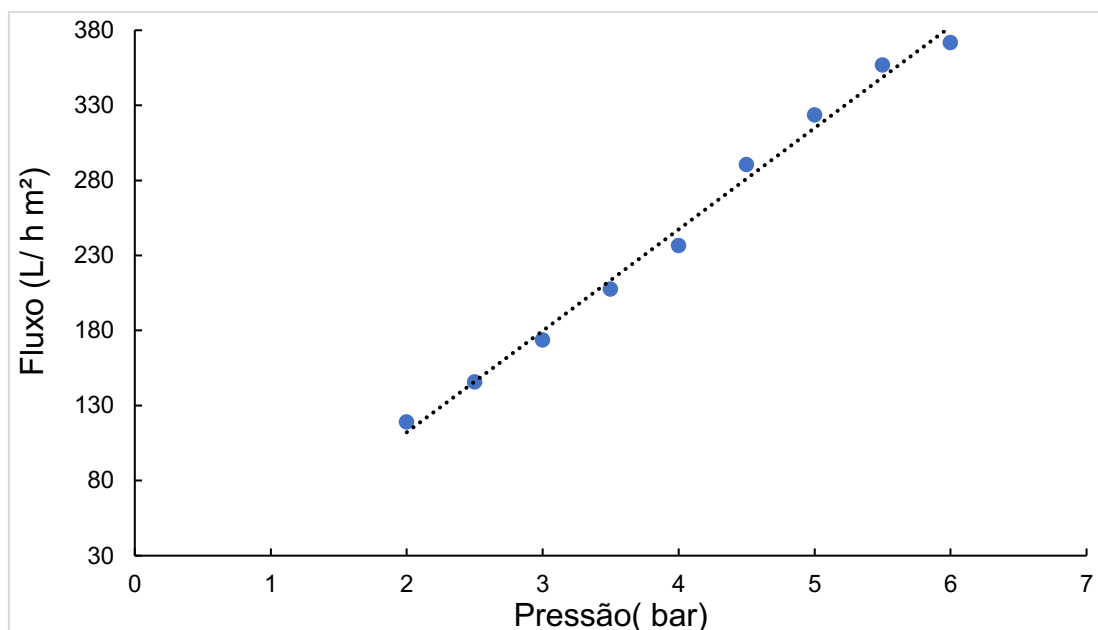
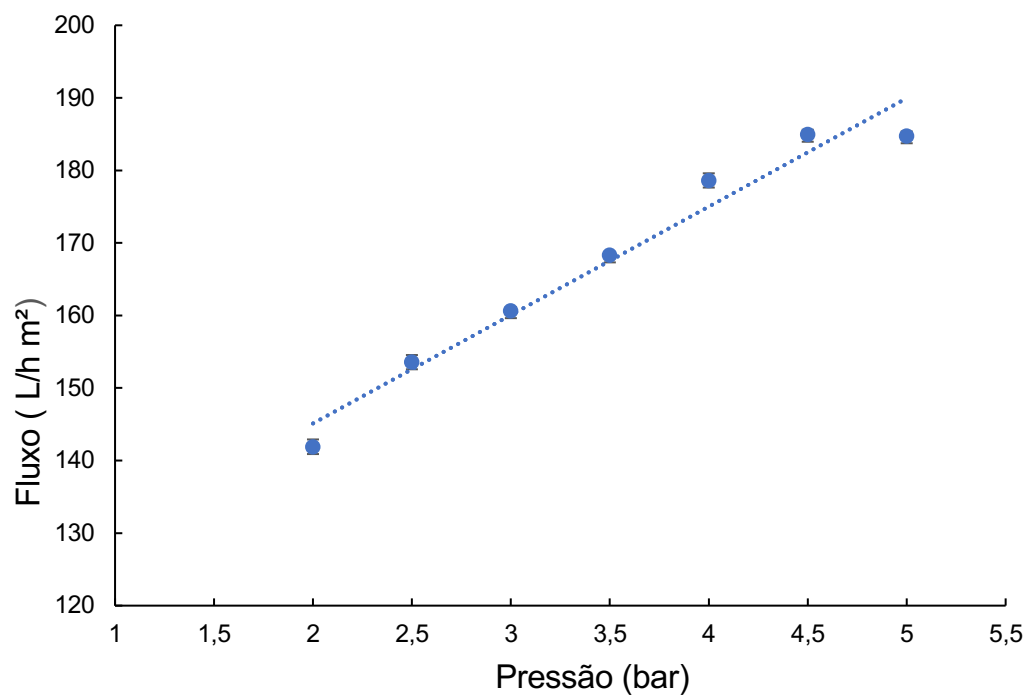


Figura - 17 Fluxo de água: etanol através da membrana de 10 kDa em função da pressão transmembrana.



3.20. Ultrafiltrações dos extratos aquoso e etanólico

Após a compactação da membrana deu início ao processo de ultrafiltração do extrato aquoso e etanólico (etanol: água) (1:1) (v:v) das sementes de urucum em uma pressão transmembrana de 6 bar. As Figuras 18 e 19 apresentam declínios de fluxo experimentais e calculados durante processo de ultrafiltração do extrato aquoso e etanólico, respectivamente.

Figura - 18 Declínios de fluxo experimental e calculado (n=0 para formação de torta; n=1 para bloqueio parcial dos poros; n=1,5 para bloqueio de poros internos e n=2 para bloqueio completo dos poros) para ultrafiltração de extrato aquoso das sementes de urucum.

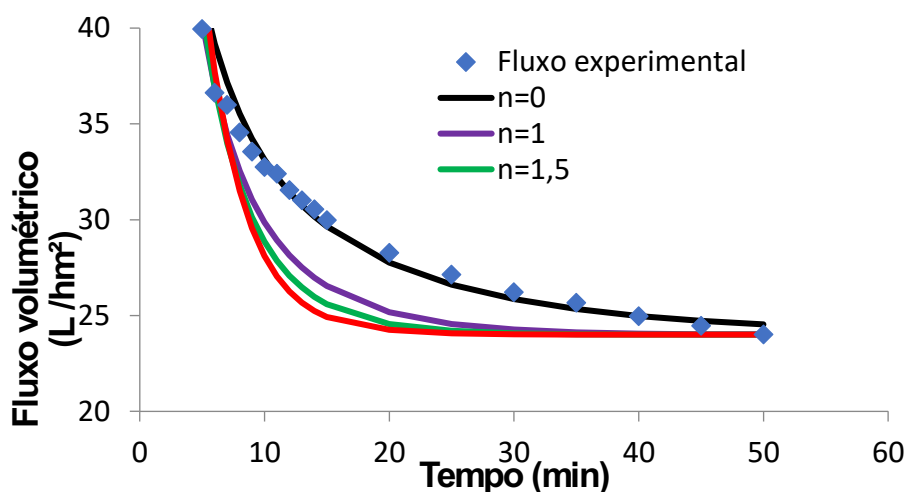
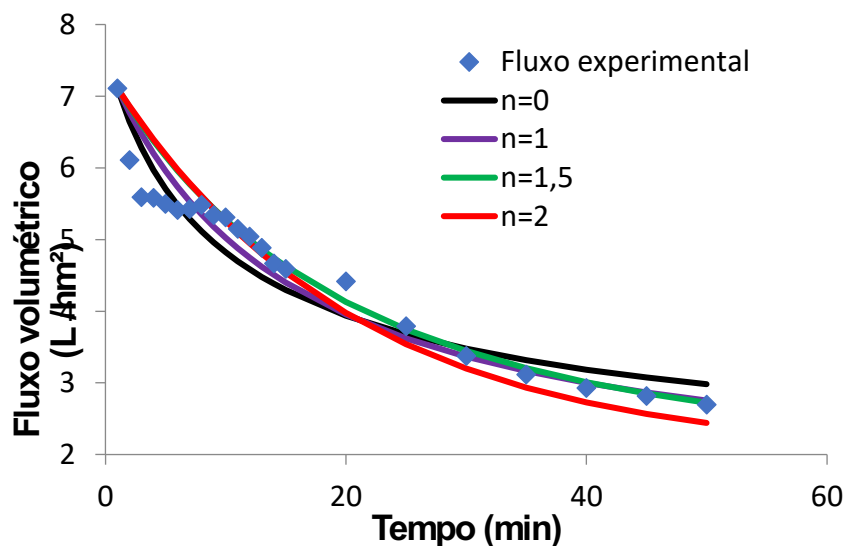


Figura - 19 Declínios de fluxo experimental e calculado (n=0 para formação de torta; n=1 para bloqueio parcial dos poros; n=1,5 para bloqueio de poros internos e n=2 para bloqueio completo dos poros) para ultrafiltração de extrato EtOH:H2O das sementes de urucum.



Os fluxos foram calculados conforme equações apresentadas por Field *et al.* (1995) para cada mecanismo de incrustação ($n = 0$ para filtração de torta; $n = 2$ para bloqueio completo de poros; $n = 1$ para bloqueio parcial de poros e $n = 1,5$ para bloqueio interno de poros).

Observa-se que o fluxo de permeado teve uma redução muito rápida nos primeiros 15 min de filtração para as filtrações dos extratos aquoso e etanólico de sementes de urucum. Após esse tempo continuou-se a redução do fluxo, porém de forma menos acentuada. Foi observado que o fluxo de permeado estabilizou-se em 30 min com um fluxo de aproximadamente $30,01 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ para extrato aquoso e em 40 min com fluxo de aproximadamente $3,38 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ para o extrato etanólico. Assim o fluxo do extrato aquoso é cerca de 8,8 vezes maior que o do extrato etanólico.

Durante os processos de separação por membranas, é esperado ocorrer a redução do fluxo permeado ao longo do tempo devido ao acúmulo dos componentes presentes na alimentação nos poros da membrana (fouling), bem como devido à formação de uma camada polarizada na superfície da membrana (polarização por concentração) (MONDOR; GIRARD; MORESOLI, 2000). A Tabela 9 apresenta o ajuste entre os dados de fluxo calculado para todos os mecanismos de incrustação.

Tabela - 9 Coeficientes de determinação (R^2) para ajuste de dados de fluxo experimental durante a ultrafiltração do extrato aquoso e etanólico das sementes de urucum ao modelo matemático proposto por Runge-Kutta.

| Modelo | N | Extrato aquoso | Extrato etanólico |
|------------------------------------|-----|----------------|-------------------|
| | | R^2 | R^2 |
| Bloqueio completo dos poros | 2 | 0,847 | 0,904 |
| Bloqueio interno dos poros | 1,5 | 0,887 | 0,903 |
| Bloqueio parcial dos poros | 1 | 0,934 | 0,913 |
| Formação de torta | 0 | 0,991 | 0,882 |

De acordo com os valores de R^2 , o melhor ajuste obtido para as filtrações do extrato aquoso foi para $n=0$ (formação de torta). (NZERIBE, 2016) A formação de torta é o mecanismo de incrustação mais relatado durante a filtração por membranas de extratos com alto teor de sólidos. Zhu *et al.* (2015) concluíram que a formação de torta

foi o mecanismo de incrustação predominante para microfiltrações de extrato de batata-doce roxa (ZHU, 2015). Madrona *et al.* (2019) também relataram que a formação de torta (n=0) foi o principal fator de incrustação durante a ultrafiltração de extrato de jenipapo (MADRONA *et al.*, 2019). Domingues *et al.* (2014) concluíram durante a ultrafiltração de suco de maracujá que a formação de torta (n=0) foi o fator principal de incrustação (DOMINGUES *et al.*, 2020). Ferreira *et al.* (2021) observaram que o melhor ajuste matemático foi utilizando o modelo de formação de torta (FERREIRA *et al.*, 2021). A Figura 18(a) apresenta o aspecto da membrana após a filtração do extrato aquoso, onde pode ser observada a deposição de uma camada não-uniforme sobre a superfície externa. Esta camada pode ser parcialmente removida com auxílio de uma esponja.

Para as filtrações do extrato etanólico o maior valor de R^2 foi para 1,0 (bloqueio parcial dos poros). Contudo, todos os modelos apresentaram ajustes satisfatórios dos dados experimentais de fluxo do extrato aquoso, conforme visualizado na Figura 17. De fato, o modelo que descreve a formação de torta foi o que menos se adequou aos dados experimentais de fluxo do extrato etanólico. Conforme observado na Figura 20 (b), observa-se uma coloração intensa e contínua na superfície da membrana. Esta camada estava completamente aderida na membrana, não sendo possível sua remoção com lavagens ou mesmo pela abrasão com auxílio de uma esponja. Assim, entende-se que houve uma adsorção dos pigmentos do extrato etanólico na membrana, o que justifica o bloqueio dos poros.

Figura - 20 Aspecto visual da membrana de 10 kDa após a ultrafiltração do: a) extrato aquoso e b) etanólico.



Utilizando o modelo de resistência em série estimou-se então os valores de resistência hidráulica (R_M), resistência da torta (R_C), resistência ao bloqueio dos poros (R_P) e resistência total (R_T) apresentados na Tabela 10.

Tabela - 10 Resultado das resistências em série para ultrafiltração dos extratos aquoso e etanólico.

| Resistência $10^{-11} m^{-1}$ | R_M | R_C | R_P | R_T |
|-------------------------------|--------|---------|-------|---------|
| Água | 0,088 | 360 | 240 | 600,088 |
| Etanol:água | 1518,9 | 5132,59 | - | 6651,5 |

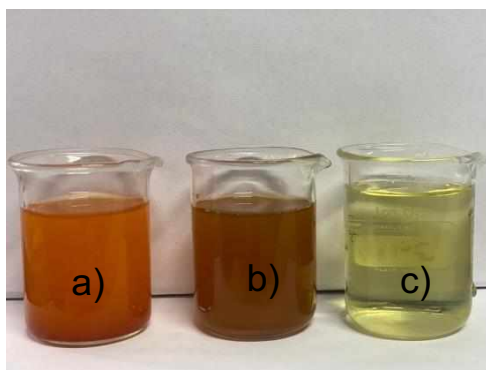
A resistência intrínseca da membrana (R_M) é inversamente proporcional ao fluxo (Equação 9) e, portanto, a resistência da membrana para permeação de água é menor que para permeação da mistura etanólica. Para filtração do extrato aquoso foi possível remover a torta da superfície da membrana e, assim, contabilizar as resistências devido à formação de torta e ao entupimento dos poros. A filtração do extrato etanólico não apresentou formação de torta na superfície da membrana inviabilizando assim o cálculo da resistência do bloqueio dos poros.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que a resistência que possui maior contribuição para a ultrafiltração é a resistência da torta (R_C) representando cerca de 99,9% para o extrato aquoso e 77,16% para extrato etanólico, em relação à resistência total.

3.20.1. Características do extrato AQUOSO após ultrafiltração

As amostras do extrato aquoso de sementes de urucum antes e depois do processo de ultrafiltração foram caracterizadas quanto ao teor de bixina. Os valores de teor de bixina das amostras do extrato de urucum alimentado, concentrado e permeado foram de $1,76 \pm 0,2$, $2,18 \pm 0,6$ e $0,09 \pm 0,008$ %, respectivamente. Assim, a membrana de ultrafiltração foi capaz de concentrar 19 % das moléculas de bixina presentes na alimentação no extrato aquoso. A Figura 21 apresenta o aspecto visual das amostras de alimentação, concentrado e permeado, onde nota-se que o permeado obtido ficou com uma coloração mais clara que o extrato alimentado, indicando que houve uma retenção significativa do pigmento que promove a coloração do extrato.

Figura - 21 Resultado visual da filtração tangencial utilizando membrana de 10 kDa e uma pressão de 6 bar. (a) extrato aquoso bruto; (b) extrato concentrado; (c) extrato permeado.



Na Tabela 11 estão apresentados os valores das coordenadas de cor do extrato aquoso antes e após o processo de ultrafiltração.

Tabela - 11 Variação das propriedades do concentrado e permeado em relação ao extrato inicial para filtração tangencial do extrato aquoso das sementes de urucum.

| Propriedade | Unidade | Alimentação | Concentrado | Permeado | %Concentração |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| Centrifugado | | | | | |
| Teor bixina H₂O | % | 1,76± 0,2 | 2,18 ± 0,6 | 0,09± 0,008 | 19,0 |
| Fenólicos | mg EAG/g semente | 1,942±0,18 | 2,53±0,07 | 0,01±0,001 | 23,3 |
| FRAP | μMTrolox/L extrato | 107,8±0,17 | 143,8±0,18 | 42,00±0,35 | 25,04 |
| ABTS | μMTrolox/L extrato | 91,40±0,35 | 153,07±2,82 | 46,07±0,37 | 40,52 |
| Cor extrato | L | 84,94± 0,2 | 82,49± 0,5 | 97,15± 0,1 | NA |
| aquoso | a | 6,32± 0,08 | 9,45± 0,03 | -0,85± 0,07 | NA |
| | b | 16,42± 0,05 | 19,03± 0,09 | 3,94± 0,02 | NA |

O extrato de urucum alimentado apresenta uma característica ligeiramente opaca com valor de luminosidade (L*) menor que 85. Os valores positivos das coordenadas a* e b* indicam que o extrato de urucum apresenta cor tendendo ao vermelho e amarelo. Após a ultrafiltração tem-se que o valor da coordenada L* da

amostra de permeado é significativamente maior que das amostras de alimentação e concentrado o que indica a retenção de partículas pela membrana. Os valores das coordenadas a^* e b^* também são menores para o permeado. Já a amostra de concentrado apresentou menor luminosidade que a alimentação e maiores valores para as coordenadas a^* e b^* .

Não temos na literatura trabalhos relacionando a purificação de bixina por ultrafiltração utilizando membranas. Porém temos vários trabalhos reportados relacionando a concentração de compostos bioativos de frutos, plantas e vários carotenoides.

Os resultados de Machado *et al.* (2014) mostraram que através da ultrafiltração obteve-se um aumento da retenção de 2% de carotenoides e 65% de polifenóis do extrato aquoso de pequi (MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2015).

Sousa *et al.* (2016) apresentaram que o processo de ultrafiltração assistida por ultrassom com uma membrana de 20 kDa é sugerido para purificar catequinas do extrato de chá verde com um fluxo de permeação relativamente alto e grande pureza e estabilidade dos componentes da catequina.

Madrona *et al.* (2019) utilizou o processo de ultrafiltração sequencial para concentração de compostos fenólicos do extrato de jenipapo. A ultrafiltração não alterou a maioria dos parâmetros físico-químicos analisados, exceto sólidos solúveis totais e cor. Apresentou-se uma redução em $12\pm 1,8\%$ de sólidos solúveis, enquanto a redução de sólidos totais foi de $66\pm 0,3\%$, em média (MADRONA *et al.*, 2019).

3.20.2. Características do extrato ETANÓLICO após ultrafiltração

Na Tabela 12 estão apresentados a variação das propriedades do concentrado e permeado em relação ao extrato inicial para filtração tangencial do extrato etanólico das sementes de urucum.

Tabela - 12 Variação das propriedades do concentrado e permeado em relação ao extrato inicial para filtração tangencial do extrato etanólico das sementes de urucum.

| Propriedade | Unidade | Alimentação | Concentrado | Permeado | %Redução |
|------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Bixina | % | 5,92±0,03 | 0,47 ±0,04 | 0,15±0,001 | 97,4 |
| Fenólicos | mg EAG/g semente | 2,823±0,007 | 2,860±0,07 | 2,297±0,001 | 18,6 |
| FRAP | μMTrolox/L extrato | 155,96±2,35 | 112,13±1,17 | 25,46±0,87 | 28,1 |
| ABTS | μMTrolox/L extrato | 113,40±5,98 | 80,61±0,35 | 0,0 | 28,9 |
| Cor | L* | 79,24±0,01 | 78,54±0,19 | 77,11±0,55 | NA |
| | a* | 1,34±0,01 | 4,68±0,05 | 1,32±0,60 | NA |
| | b* | 71,73±0,01 | 92,36±1,59 | 26,86±1,33 | NA |

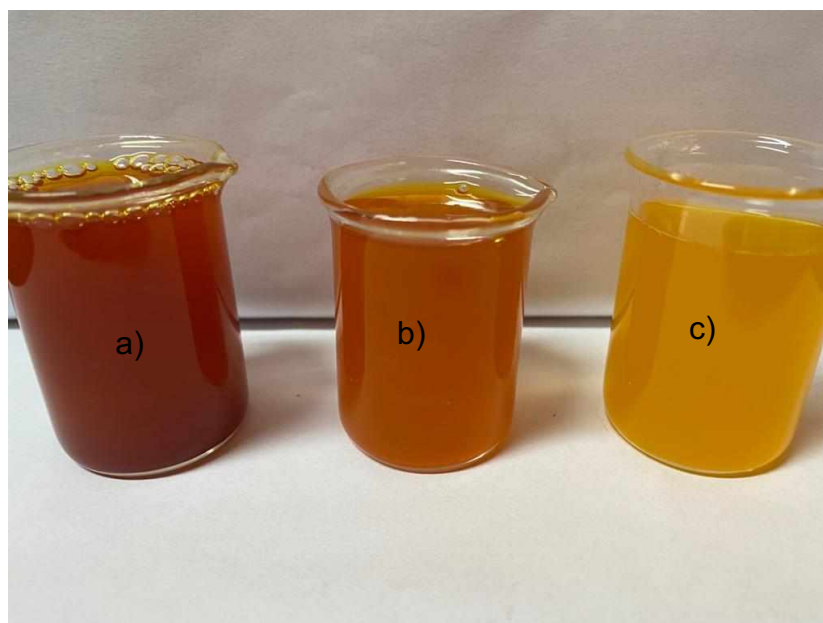
Os valores de teor de bixina das amostras do extrato de urucum do alimentado, concentrado e permeado foram de 5,92± 0,03, 0,47 ± 0,04 e 0,15 ± 0,001 % para extrato etanólico. Pode-se observar as reduções de todos os compostos bioativos desde o teor de bixina aos compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e ABTS comparando as amostras de alimentação e permeado. Assim, tem-se que a membrana polimérica de 10 kDa promoveu uma clarificação do extrato etanólico. As reduções para teor de bixina, fenólicos, atividade antioxidante FRAP e ABTS foram de 97,4%, 18,6%, 28,1% e 28,9%, respectivamente, entre alimentação e concentrado do extrato etanólico. Portanto, a membrana não conseguiu concentrar os compostos presentes no extrato etanólico. Este resultado deve estar associado à pronunciada absorção dos corantes do extrato pela membrana, conforme evidenciado na imagem da membrana após a filtração do extrato etanólico (Figura 18 b). Teste adicionais para uma melhor aclimação da membrana com a solução etanólica serão realizados para minimizar essa absorção. Ainda, sugere-se o uso de membranas cerâmicas ou mesmo de outros materiais poliméricos para a efetiva concentração do extrato etanólico de sementes de urucum.

Para análises de cor demonstrados na Tabela 12 o extrato etanólico de urucum alimentado apresenta uma luminosidade (L*) de 74,24 o que indica de certa forma que o extrato é translúcido. Os valores positivos das coordenadas a* e b* indicam que o extrato de urucum apresenta cor tendendo ao vermelho e amarelo. Após a ultrafiltração tem-se que o valor da coordenada L* da amostra de permeado é um pouco menor que das amostras de alimentação e concentrado o que indica que houve retenção de partículas pela membrana. As coordenadas a* e b* diminuíram após a

ultrafiltração, que indica a eficiência. A amostra de concentrado apresentou menor luminosidade que a alimentação e maiores valores para as coordenadas a^* e b^* .

A Figura 22 mostra que o permeado ficou com uma coloração mais clara que a alimentação, evidenciando uma retenção significativa das substâncias que promovem a coloração da amostra através da filtração pela membrana. Contudo, o concentrado não apresentou coloração mais intensa que a alimentação, o que pode estar associado a retenção dos corantes nos poros da membrana

Figura - 22 Resultado visual da filtração tangencial utilizando membrana de 10 kDa e uma pressão de 6 bar. (a) extrato aquoso bruto; (b) extrato concentrado; (c) extrato permeado.



CONCLUSÃO

Com a demanda cada vez maior por corantes alimentícios não tóxicos e sustentáveis, fontes naturais têm emergido como um potencial alternativo aos corantes sintéticos artificiais e o presente trabalho demonstrou que é possível obter carotenoide bixina das sementes de urucum por técnica de baixo custo, utilizando água como solvente extrator.

O urucum é um fruto com grande potencial para a extração aquosa de bixina e necessário um estudo mais aprofundado para melhor metodologia da extração aquosa. Com as curvas de cinética de extração aquosa do urucum foi possível determinar uma faixa ótima de tempo de 60 min para atingir a quantidade máxima de bixina extraída de aproximadamente 6,02%.

Em termos de eficiência de extração dos pigmentos de urucum, o melhor solvente extrator avaliado foi o clorofórmio apresentando 10,34 % de teor máximo de bixina extraído das sementes seguido do etanol apresentando 8,69 % de bixina, teor de Compostos Fenólicos (TCF = 5,911mg EAG/g amostra), Atividade Antioxidante (FRAP = 266,42 μ M Trolox/L de extrato) e (ABTS= 137,91 μ M Trolox/L de extrato). Através destes resultados considera-se o urucum um fruto com alto potencial de bioativos corroborando com várias análises e resultados encontrados na literatura. A água não apresentou os melhores resultados para as extrações conforme já era previsto, porém na etapa subsequente, a filtração seguiu-se com a água devido as suas vantagens de menor custo e por apresentar menor agressividade ao material da membrana.

A ultrafiltração foi um processo eficiente na concentração dos extratos aquosos do urucum utilizando uma membrana polimérica de 10kDa. A concentração do teor de bixina no processamento foi de 19%. Obteve-se uma concentração dos bioativos de 23,3% para o teor de fenólicos, 25,04% para atividade antioxidante utilizando metodologia FRAP e 40,52% utilizando método ABTS. Já a ultrafiltração do extrato etanólico não apresentou resultados eficientes para os compostos bioativos apresentando um valor de redução do concentrado em relação a alimentação de

97,4%, 18,6%,28,1%,17,6% e 28,9% para teor de bixina, fenólicos, atividade antioxidante (FRAP e ABTS) respectivamente.

O processo global deve contemplar a etapa de extração e melhoria do extrato aquoso utilizando o processo de ultrafiltração, assim, embora existam vários desafios, a tecnologia de extração aquosa associada ao processo de separação por membranas é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos produtos e processos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao presente trabalho, sugere-se que:

Acompanhar a cinética de extração aquosa em função do tempo e concentração de bixina avaliando os parâmetros de fenólicos, DPPH, FRAP e ABTS.

Avaliar os parâmetros atividade antioxidante pelo método DPPH através da ultrafiltração do extrato aquoso.

Acompanhar a cinética de extração etanólica em função do tempo e concentração de bixina avaliando os parâmetros de fenólicos, FRAP e ABTS.

Quantificação do carotenoide bixina via Cromatografia Líquida.

Avaliar a utilização de uma membrana cerâmica para concentração dos compostos bioativos para o extrato etanólico.

Avaliar técnicas de microencapsulação de bixina a fim de aumentar sua solubilidade em água.

Incorporação de bixina em nanofibras para fins medicinais com base em suas propriedades antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; LÓPEZ-MÁRQUEZ, D. M.; CRESPO-FERRER, I.; GALLO, B.; VICENTE, F. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1154, n. 1–2, p. 87–96, 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.023.
- 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. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 86–95, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.01.004>>.
- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; OSORIO-TOBÓN, J. F.; FORSTER-CARNEIRO, T.; MEIRELES, M. A. A. Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. **Food Research International**, v. 99, n. May, p. 393–402, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.032>>.
- ALLA, A. J.; STINE, K. J. Recent Strategies for Using Monolithic Materials in Glycoprotein and Glycopeptide Analysis. **Separations**, v. 9, n. 2, 2022.
- ALSHEHRI, S.; IMAM, S. S.; HUSSAIN, A.; ALTAMIMI, M. A.; ALRUWAILI, N. K.; ALOTAIBI, F.; ALANAZI, A.; SHAKEEL, F. Potential of solid dispersions to enhance solubility, bioavailability, and therapeutic efficacy of poorly water-soluble drugs: newer formulation techniques, current marketed scenario and patents. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 1625–1643, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1846638>>.
- ANTUNES, L. M. G.; PASCOAL, L. M.; BIANCHI, M. D. L. P.; DIAS, F. L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1–2, p. 113–119, 2005.
- BACHTLER, S.; BART, H.-J. Increase the yield of bioactive compounds from elder bark and annatto seeds using ultrasound and microwave assisted extraction technologies. **Food and Bioproducts Processing**, v. 125, p. 1–13, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308520305368>>.
- BALAKRISHNAN, M.; GAYATHIRI, S.; PREETHA, P.; PANDISELVAM, R.; JEEVARATHINAM, G.; DELFIYA, D. S. A.; KOTHAKOTA, A. Microencapsulation of bixin pigment by spray drying: Evaluation of characteristics. **Lwt**, v. 145, n. November 2020, p. 111343, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111343>>.
- BARANSKA, M. **Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. v. 141–540 p.
- BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. HPLC and spectrophotometric

determination of annatto in cheese. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 4, p. 359–364, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924>>.

BHANUSHALI, D.; KLOOS, S.; KURTH, C.; BHATTACHARYYA, D. Performance of solvent-resistant membranes for non-aqueous systems: solvent permeation results and modeling. **Journal of Membrane Science**, v. 189, n. 1, p. 1–21, jul. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738801003568>>.

BINDES, M. M. M.; TERRA, N. M.; PATIENCE, G. S.; BOFFITO, D. C.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Asymmetric Al₂O₃ and PES/Al₂O₃ hollow fiber membranes for green tea extract clarification. **Journal of Food Engineering**, v. 277, p. 109889, jul. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877419305321>>.

BIRKEDAL KRISTENSEN, S.; NIKBAKHT FINI, M.; BRUUN PEDERSEN, T.; LAURIDS SØRENSEN, J.; MUFF, J. Membrane based separation and purification of fusarubins from *Fusarium solani*. **Separation and Purification Technology**, v. 278, n. August 2021, 2022.

BOLOGNESI, V. J.; GARCIA, C. E. R. Annatto Carotenoids as Additives Replacers in Meat Products. In: **Alternative and Replacement Foods**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 355–384.

BRASIL. **PORTARIA Nº 540, DE 27 DE OUTUBRO DE 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.** Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0540_27_10_1997.html>.

BRASIL. RDC nº 4 de 15 de Janeiro de 2007. **DOU nº 12**, p. 1–11, 2007.

CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. de T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1689–1693, 2008.

CARDENAS-TORO, F. P.; ALCÁZAR-ALAY, S. C.; COUTINHO, J. P.; GODOY, H. T.; FORSTER-CARNEIRO, T.; MEIRELES, M. A. A. Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 94, p. 90–100, abr. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.006>>.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377–399, 2014.

CARVALHO, P. R. N. **O urucum: história, ciência, tecnologia e curiosidades.** Disponível em: <<http://www.ourucum.com.br>>.

CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G. da; FABRI, E. G.; TAVARES, P. E. da R.; MARTINS, A. L. M.; SPATTI, L. R. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do instituto agrônomo (IAC). **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 519–524, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052010000300002&lng=pt&tlng=pt>.

CASTRO-MUÑOZ, R.; DÍAZ-MONTES, E.; GONTAREK-CASTRO, E.; BOCZKAJ, G.; GALANAKIS, C. M. A comprehensive review on current and emerging technologies toward the valorization of bio-based wastes and by products from foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 46–105, jan. 2022.

CELLI, G. B.; LAWRENCE, P.; RAVANFAR, R.; ABBASPOURRAD, A. Solvent-mediated pressure-treated bixin-casein complexation for targeted color delivery. **Food Chemistry**, v. 278, p. 434–442, abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.083>>.

CHANUKYA, B. S.; RASTOGI, N. K. Ultrasound assisted forward osmosis concentration of fruit juice and natural colorant. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 426–435, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417716302176>>.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. [s.l.] CRC Press, 1998.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. D. C.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, jul. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611000483>>.

COELHO DOS SANTOS, D.; SILVA BARBOZA, A. da; RIBEIRO, J. S.; RODRIGUES JUNIOR, S. A.; CAMPOS, Â. D.; LUND, R. G. Bixa orellana L. (Achiote, Annatto) as an antimicrobial agent: A scoping review of its efficiency and technological prospecting. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 287, n. September 2021, p. 114961, abr. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874121011910>>.

COLOSIMO, D. F.; MINIM, V. P. R.; VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, L. A. Development, modeling and simulation of extraction and purification of bixin from annatto seeds (Bixa orellana L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 182, p. 478–489, jun. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876222001757>>.

CVEJIĆ, J.; ATANACKOVIĆ KRSTONOŠIĆ, M.; MIKULIĆ, M.; MILJIĆ, U. Polyphenols. In: GALANAKIS, C. M. B. T.-N. AND F. F. C. (SECOND E. **Nutraceutical and Functional Food Components**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 243–312.

DALL'ACQUA, S.; AK, G.; SUT, S.; ZENGIN, G.; YILDIZTUGAY, E.; FAWZI MAHOMOODALLY, M.; IBRAHIME SINAN, K.; LOBINE, D. Comprehensive bioactivity and chemical characterization of the endemic plant *Scorzonera hieraciifolia* Hayek extracts: A promising source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 137, n. May, p. 1–10, 2020.

DAVID, S.-L. J.; JULIÁN, G.-C. C.; LILIANA, V.-S. C.; AYALA-APONTE, A. A.; LILIANA, S.-C. Kinetics and bixin extraction time from achiote (*Bixa Orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 3, p. 1239–1246, 20 mar. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s13197-021-05209-y>>.

DOMINGUES, J. T.; ORLANDO, R. M.; SINISTERRA, R. D.; PINZÓN-GARCÍA, A. D.; RODRIGUES, G. D. Polymer-bixin nanofibers: A promising environmentally friendly material for the removal of dyes from water. **Separation and Purification Technology**, v. 248, n. April, p. 117118, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117118>>.

DOS SANTOS, E. J.; LOURENZANI, W. L.; LOURENZANI, A. E. B. S. HISTÓRICO E ASCENSÃO DO URUCUM NA MICRORREGIÃO DE DRACENA- SÃO PAULO. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 12, n. 1, p. 29–39, 27 mar. 2018. Disponível em: <<http://seer.tupa.unesp.br/index.php/BIOENG/article/view/616>>.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 5–22, fev. 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>>.

EL-ELIMAT, T.; FIGUEROA, M.; EHRMANN, B. M.; CECH, N. B.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1709–1716, 2013.

FERREIRA, F. B.; MAGALHÃES, F. de S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Enhanced conditions to obtain a clarified purple araçá (*Psidium myrtilloides*) fruit extract. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 9 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.13607>>.

FIELD, R. W.; WU, D.; HOWELL, J. A.; GUPTA, B. B. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, n. 3, p. 259–272, abr. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037673889400265Z>>.

FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P.-A.; WOLFENDER, J.-L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167–178, out. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.069>>.

GALANAKIS, C. M.; FOUNTOULIS, G.; GEKAS, V. Nanofiltration of brackish groundwater by using a polypiperazine membrane. **Desalination**, v. 286, p. 277–284, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2011.11.035>>.

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. Comparison of Volatile Compounds in Water- and Oil-Soluble Annatto (*Bixa orellana* L.) Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2010–2015, 1 mar. 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf011325h>>.

GÓMEZ-LOREDO, A.; GONZÁLEZ-VALDEZ, J.; RITO-PALOMARES, M. Insights on the downstream purification of fucoxanthin, a microalgal carotenoid, from an aqueous

two-phase system stream exploiting ultrafiltration. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1517–1523, 2015.

GORDILLO, B.; SIGURDSON, G. T.; LAO, F.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J.; GIUSTI, M. M. Assessment of the color modulation and stability of naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification. **Food Research International**, v. 106, n. January, p. 791–799, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.057>>.

GRIGALUNAS, M.; BRAKMANN, S.; WALDMANN, H. Chemical Evolution of Natural Product Structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 144, n. 8, p. 3314–3329, 2022.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; KRONEMBERGER, F. de A.; FERRAZ, H. C.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. *In: Purificação de produtos biotecnológicos: perações e processos com aplicação industrial.* [s.l.] Editora Blucher, 2020. p. 139–200.

HAGIWARA, A.; IMAI, N.; ICHIHARA, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; AOKI, H.; YASUHARA, K.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; SHIRAI, T. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague–Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 8, p. 1157–1164, ago. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691503001042>>.

HANDAYANI, I.; HARYANTI, P.; SULISTYO, S. B. Color and antibacterial activity of annatto extracts at various pH of distilled water solvent and extraction temperature. **Food Research**, v. 5, n. 6, p. 247–253, 2021.

HAROUNA-OUMAROU, H. A.; FAUDUET, H.; PORTE, C.; HO, Y.-S. COMPARISON OF KINETIC MODELS FOR THE AQUEOUS SOLID-LIQUID EXTRACTION OF TILIA SAPWOOD IN A CONTINUOUS STIRRED TANK REACTOR. **Chemical Engineering Communications**, v. 194, n. 4, p. 537–552, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00986440600992511>>.

HEIDUSCHKA, A.; PANZER, A. Zur Kenntnis des Bixins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 50, n. 1, p. 546–554, 25 jan. 1917. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.19170500191>>.

HENRY, B. S. Natural food colours. *In: Natural Food Colorants.* Boston, MA: Springer US, 1996. p. 40–79.

HO, W. S. W.; SIRKAR, K. K. (ed.). **Membrane Handbook.** Boston, MA: Springer US, 1992.

HOLME, I. B.; DIONISIO, G.; BRINCH-PEDERSEN, H. A roadmap to modulated anthocyanin compositions in carrots. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 1–20, 2021.

HUANG, S.; RAS, R. H. A.; TIAN, X. Antifouling membranes for oily wastewater treatment: Interplay between wetting and membrane fouling. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 36, p. 90–109, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029417301747>>.

HUSA, N. N.; HAMZAH, F.; SAID, H. M. Characterization and Storage Stability Study of Bixin Extracted from *Bixa orellana* Using Organic Solvent. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 358, n. 1, 2018.

JECFA/FAO. 67th JECFA - Chemical and Technical Assessment (CTA) 2006. **Assessment, Technical Europe, Western**, v. 1, n. 21, p. 1–21, 2006.

JUNQUEIRA, C. M.; DA SILVA CABRAL, D.; PENIDO, J. A.; MAGESTE, A. B.; VIRTUOSO, L. S. How does the use of surfactants in polymer-salt based aqueous two-phase systems affect the annatto dye (*Bixa orellana* L.) partitioning? **Fluid Phase Equilibria**, v. 478, p. 14–22, dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.08.013>>.

KAMILOGLU, S.; OZDAL, T.; CATALKAYA, G.; CAPANOGLU, E. Separation of Polyphenols and Carotenoids Using Nanofiltration. *In*: [s.l: s.n.]p. 205–238.

KAO, T. C. Z. R. Y. S. S. V. R. D. T. S. L. O. and C. M. **Membrane Technology and Environmental Applications**. Reston, VA: American Society of Civil Engineers, 2012.

KAPOOR, L.; RAMAMOORTHY, S. Strategies to meet the global demand for natural food colorant bixin: A multidisciplinary approach. **Journal of Biotechnology**, v. 338, n. July, p. 40–51, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.007>>.

KAZEMI, A. S.; BOIVIN, L.; MI YOO, S.; GHOSH, R.; LATULIPPE, D. R. Elucidation of filtration performance of hollow-fiber membranes via a high-throughput screening platform. **Journal of Membrane Science**, v. 533, p. 241–249, jul. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738817301205>>.

KHATTAB, H. A. A. H. Effect of Ginkgo Biloba Leaves Aqueous Extract on Carbon Tetrachloride Induced Acute Hepatotoxicity in Rats. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 48, n. 1, p. 483–495, 1 jul. 2012. Disponível em: <https://ejhm.journals.ekb.eg/article_16250.html>.

KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 523–529, 2003.

KOUL, V. K.; KOUL, S.; TIKOO, C. L. Process optimization for extraction and purification of Bixin from Annatto. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 10, p. 545–547, 1 set. 2003.

LANGI, P.; KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; PROESTOS, C. Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. *In*: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]p. 57–71.

LI, J.; WANG, D.; WANG, Y.; GAO, B.; WANG, Z. Surface Modification of Reverse Osmosis Membranes for Enhanced Boron Removal and Fouling Resistance. **ACS ES&T Water**, v. 1, n. 10, p. 2284–2292, 8 out. 2021. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsestwater.1c00262>>.

LIN, W. S.; HE, P. H.; CHAU, C. F.; LIOU, B. K.; LI, S.; PAN, M. H. The feasibility study of natural pigments as food colorants and seasonings pigments safety on dried tofu coloring. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 3, p. 220–228, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.09.002>>.

LUNDE, K.; ZECHMEISTER, L. Infrared Spectra and cis-trans Configurations of Some Carotenoid Pigments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 6, p. 1647–1653, 1 mar. 1955. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja01611a071>>.

MA, S.; ZHANG, H.; LI, Y.; LI, Y.; ZHANG, N.; OU, J.; YE, M.; WEI, Y. Fast preparation of hybrid monolithic columns via photo-initiated thiol-yne polymerization for capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1538, p. 8–16, 2018.

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Evaluation of pequi (Caryocar Brasiliense Camb.) aqueous extract quality processed by membranes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, n. October, p. 304–312, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.10.013>>.

MACHADO, M. T. C.; TREVISAN, S.; PIMENTEL-SOUZA, J. D. R.; PASTORE, G. M.; HUBINGER, M. D. Clarification and concentration of oligosaccharides from artichoke extract by a sequential process with microfiltration and nanofiltration membranes. **Journal of Food Engineering**, v. 180, p. 120–128, jul. 2016.

MADRONA, G. S.; TERRA, N. M.; FILHO, U. C.; MAGALHÃES, F. de S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Purification of phenolic compounds from genipap (Genipa americana L.) extract by the ultrasound assisted ultrafiltration process. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 41, p. 1–10, 2019.

MANIHURUK, F. M.; SURYATI, T.; ARIEF, I. I. Effectiveness of the red dragon fruit (Hylocereus polyrhizus) peel extract as the colorant, antioxidant, and antimicrobial on beef sausage. **Media Peternakan**, v. 40, n. 1, p. 47–54, 2017.

MANTOVANI, N. C.; GRANDO, M. F.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. EVALUATION OF ANNATTO (*Bixa orellana* L.) GENOTYPES THROUGH THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF FRUITS, SEEDS PRODUCTIVITY AND BIXIN CONTENT. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 2, p. 344–362, 28 jun. 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/9281>>.

MARIKANI, K.; SASI, A.; SRINIVASAN, V.; DHANASEKARAN, S.; AL-DAYAN, N.; VENUGOPAL, D. A Synergism of Eco-Friendly Dyeing of Cotton Fabric and Therapeutic Benefits of *Bixa Orellana* Seed. **International Journal of Life Science and Pharma Research**, v. 10, n. 5, p. P207–P214, 2020.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 1–15, 2016.

MCKEOWN, G. G. Composition of Oil-Soluble Annatto Food Colors. II. Thermal Degradation of Bixin. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 46, n. 5, p. 790–796, 1 out. 1963. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article/46/5/790-796/5732027>>.

MONDOR, M.; GIRARD, B.; MORESOLI, C. Modeling flux behavior for membrane filtration of apple juice. **Food Research International**, v. 33, n. 7, p. 539–548, ago.

2000. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996900000892>>.

MORAES, M. N.; ZABOT, G. L.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 262–271, jan. 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.007>>.

NAJAR, S. V.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). **Food Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 283–289, jan. 1988. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030881468890043X>>.

NAWAZ, H.; SHI, J.; MITTAL, G. S.; KAKUDA, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 2, p. 176–181, 2006.

NENADIS, N.; WANG, L.-F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H.-Y. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS •+ Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4669–4674, 1 jul. 2004. Disponível em:
<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0400056>>.

NZERIBE, B. Membrane Fouling - A Mini Review. 26 abr. 2016.

OLIVEIRA, D. L. de; GRASSI, T. L. M.; PAIVA, N. M.; SANTANA, B. N.; NAKAMURA, A. A.; BERMEJO-POZA, R.; PONSANO, E. H. G. Ultrafiltration for the recovery of proteins from surimi washing water. **Food Science and Technology**, v. 41, n. suppl 2, p. 458–464, 2021. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612021000600458&tIng=en>.

P., S.; P., S. Studies on the extraction of polyphenolic compounds from pre-consumer organic solid waste. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 82, p. 130–137, fev. 2020. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X19305295>>.

PAES, J.; DA CUNHA, C. R.; VIOTTO, L. A. Concentration of lycopene in the pulp of papaya (*Carica papaya* L.) by ultrafiltration on a pilot scale. **Food and Bioprocess Processing**, v. 96, p. 296–305, 2015. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308515001121>>.

PATEIRO, M.; MUNEKATA, P. E. S.; SANT'ANA, A. S.; DOMÍNGUEZ, R.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LORENZO, J. M. Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, n. November 2020, p. 108966, jan. 2021. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160520304608>>.

PERERA, C. O.; YEN, G. M. Functional Properties of Carotenoids in Human Health. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 2, p. 201–230, 25 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910601045271>>.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, ago. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399690600038X>>.

PHILIP, T. Purification and concentration of natural colorants by membranes. **Food Technol.**, v. 38, n. 12, p. 107–108, 1984.

PINTO, P. C. R.; MOTA, I. F.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. E. Membrane performance and application of ultrafiltration and nanofiltration to ethanol/water extract of Eucalyptus bark. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 234–243, ago. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586614002536>>.

POLIDORI, J.; DHUIQUE-MAYER, C.; DORNIER, M. Crossflow microfiltration coupled with diafiltration to concentrate and purify carotenoids and flavonoids from citrus juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 320–329, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856417309773>>.

POTERA, C. Forum The Artificial Food Dye Blues Invasion of the Bedbugs. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10, p. 428–431, 2010.

PRAJAPATI, R. A.; JADEJA, G. C. Natural food colorants: Extraction and stability study. **Materials Today: Proceedings**, v. 57, p. 2381–2395, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.151>>.

PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O. 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.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods¹. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 11–12, p. 1173–1181, dez. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584999002038>>.

PRIYADARSINI, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 1 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20091>>.

PRZYBYCIEL, M. Novel phases for HPLC separations. **LCGC North America**, v. 24, n. 4 SUPPL., p. 49–52, 2006.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396–3402, 1 ago. 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9913458>>.

QUIROZ, J. Q.; TORRES, A. C.; RAMIREZ, L. M.; GARCIA, M. S.; GOMEZ, G. C.; ROJAS, J. Optimization of the microwave-assisted extraction process of bioactive compounds from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). **Antioxidants**, v. 8, n. 2, 2019.

RADDATZ-MOTA, D.; PÉREZ-FLORES, L. J.; CARRARI, F.; MENDOZA-ESPINOZA,

J. A.; DE LEÓN-SÁNCHEZ, F. D.; PINZÓN-LÓPEZ, L. L.; GODOY-HERNÁNDEZ, G.; RIVERA-CABRERA, F. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1729–1741, 16 maio 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-017-2579-7>>.

RAHMALIA, W.; FABRE, J.-F.; USMAN, T.; MOULOUNGUI, Z. Aprotic solvents effect on the UV–visible absorption spectra of bixin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 131, p. 455–460, out. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.119>>.

RANA, D.; MATSUURA, T. Surface Modifications for Antifouling Membranes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 4, p. 2448–2471, 14 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr800208y>>.

REDDY, M. K.; ALEXANDER-LINDO, R. L.; NAIR, M. G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9268–9273, 2005.

REIS, M. H. M.; MADRONA, G. S.; FERREIRA, F. B.; DE SANTANA MAGALHÃES, F.; BINDES, M. M. M.; CARDOSO, V. L. Membrane Filtration Processes for the Treatment of Nonalcoholic Beverages. *In: Engineering Tools in the Beverage Industry*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 175–207.

RENARD, C. M. G. C. Extraction of bioactives from fruit and vegetables: State of the art and perspectives. **LWT**, v. 93, p. 390–395, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643818302871>>.

RODRIGUES, L. M.; ALCÁZAR-ALAY, S. C.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Bixin extraction from defatted annatto seeds. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, n. 3, p. 268–283, 2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, n. 2017, p. 200–205, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>>.

SANTOS, L. F.; DIAS, V. M.; PILLA, V.; ANDRADE, A. A.; ALVES, L. P.; MUNIN, E.; MONTEIRO, V. S.; ZILIO, S. C. Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. **Dyes and Pigments**, v. 110, p. 72–79, nov. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143720814001983>>.

SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 26, n. 8, p. 1123–1145, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030902942873>>.

SERVENT, A.; ABREU, F. A. P.; DHUIQUE-MAYER, C.; BELLEVILLE, M. P.; DORNIER, M. Concentration and purification by crossflow microfiltration with diafiltration of carotenoids from a by-product of cashew apple juice processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 66, n. July, p. 102519, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102519>>.

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>>.

SIYAVASH MADAENI, S.; MOHAMMADI, T.; KAZEMI MOGHADAM, M. Chemical cleaning of reverse osmosis membranes. **Desalination**, v. 134, n. 1–3, p. 77–82, abr. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916401001175>>.

SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K.; GARG, A.; SHARMA, R. K.; FIORINO, M.; AMEEN, S. M.; HADDAD, M. A.; AL-HIARY, M. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 102, n. 5, p. 1397–1400, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1397>>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144 LP – 158, 1 jan. 1965. Disponível em: <<http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.abstract>>.

SOBAŃSKA, A. W. Emerging or Underestimated Silica-Based Stationary Phases in Liquid Chromatography. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 631–655, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1760782>>.

SOUSA, L. dos S.; CABRAL, B. V.; MADRONA, G. S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 188–198, ago. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2016.05.029>>.

SU, S. K.; LIU, J. C.; WILEY, R. C. Cross-flow Microfiltration with Gas Backwash of Apple Juice. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 3, p. 638–641, maio 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04345.x>>.

SUN, Y.; QIN, Z.; ZHAO, L.; CHEN, Q.; HOU, Q.; LIN, H.; JIANG, L.; LIU, J.; DU, Z. Membrane fouling mechanisms and permeate flux decline model in soy sauce microfiltration. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 1, p. e12599, fev. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.12599>>.

SUTOR, K.; WYBRANIEC, S. Identification and Determination of Betacyanins in Fruit Extracts of Melocactus Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 41, p. 11459–11467, 14 out. 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c04746>>.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63–68, jan. 1959. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740100110>>.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 175–183, maio 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.006>>.

TAHAM, T.; SILVA, D. O.; BARROZO, M. A. S. Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 313–321, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.12.037>>.

TAY-AGBOZO, S.; STREET, S.; KISPERT, L. D. The carotenoid bixin: Optical studies of aggregation in polar/water solvents. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 362, n. May, p. 31–39, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.008>>.

TECHNAVIO RESEARCH. **Global Membrane Market For Food And Beverage Processing|Size, Share, Trends, Analysis and Forecast for 2020-2024| Research Report by Technavio.**

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO, POR CLAE, DE BIXINA E NORBIXINA EM COLORÍFICOS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, dez. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000300010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

TSUI, E. Characteristics of nanofiltration membranes in aqueous ethanol. **Journal of Membrane Science**, v. 237, n. 1–2, p. 61–69, jul. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738804001747>>.

VARDANEGA, R.; NOGUEIRA, G. C.; NASCIMENTO, C. D. O.; FARIA-MACHADO, A. F.; MEIRELES, M. A. A. Selective extraction of bioactive compounds from annatto seeds by sequential supercritical CO₂ process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 150, p. 122–127, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.01.013>>.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. de. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888–897, 9 set. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000300024&lng=pt&tlng=pt>.

VILAR, D. de A.; VILAR, M. S. D. A.; MOURA, T. F. A. D. L. E.; RAFFIN, F. N.; OLIVEIRA, M. R. De; FRANCO, C. F. D. O.; DE ATHAYDE-FILHO, P. F.; DINIZ, M. D. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/857292/>>.

WEISS, J. F.; LANDAUER, M. R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. **Toxicology**, v. 189, n. 1–2, p. 1–20, jul. 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X03001495>>.

WICZKOWSKI, W.; ROMASZKO, E.; SZAWARA-NOWAK, D.; PISKULA, M. K. The impact of the matrix of red beet products and interindividual variability on betacyanins bioavailability in humans. **Food Research International**, v. 108, p. 530–538, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.004>>.

WITONO, J. R.; RAMADHANY, P.; SANTOSO, H.; PUTRI, A. The potency of norbixin

as an active compound of natural dye in textile industry. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.437>>.

WOLFENDER, J.-L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 07, p. 719–734, 14 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088393>>.

WU, S.-E.; LIN, Y.-C.; HWANG, K.-J.; CHENG, T.-W.; TUNG, K.-L. High-efficiency hollow fiber arrangement design to enhance filtration performance by CFD simulation. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 125, p. 87–96, mar. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270117306931>>.

YAN, F.; YU, C.; ZHANG, B.; ZOU, T.; ZHAO, H.; LI, J. Preparation of freestanding graphene-based laminar membrane for clean-water intake via forward osmosis process. **RSC Advances**, v. 7, n. 3, p. 1326–1335, 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA27141C>>.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.009>>.

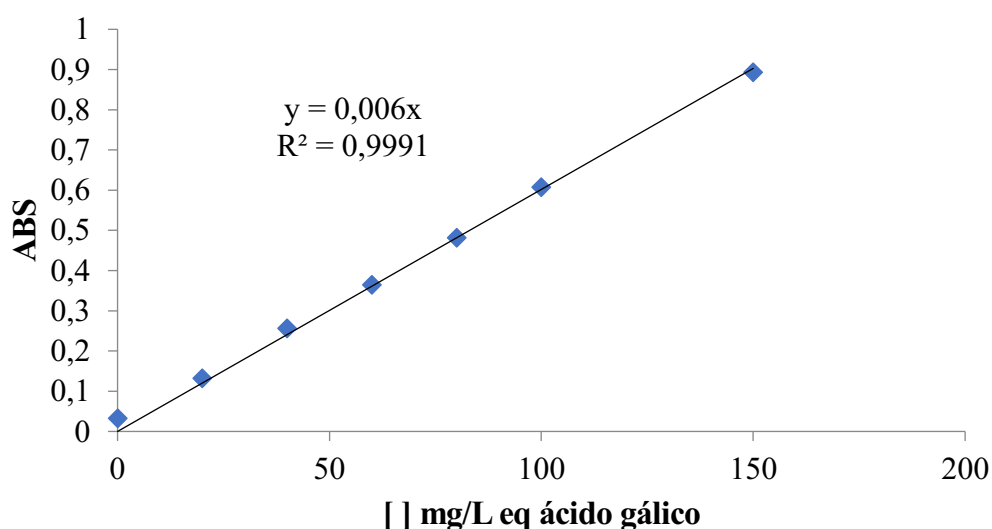
ZHU, F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. **Trends in Food Science & Technology**, v. 43, n. 1, p. 1–17, maio 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414002829>>.

ZHU, Z.; WU, Q.; DI, X.; LI, S.; BARBA, F. J.; KOUBAA, M.; ROOHINEJAD, S.; XIONG, X.; HE, J. Multistage recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. **Food and Bioproducts Processing**, v. 104, p. 40–47, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.04.008>>.

APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO FENÓLICOS

Para os cálculos da análise do teor de compostos fenólicos totais (TPC) utilizou-se a curva de calibração padrão de ácido gálico conforme Figura 23.

Figura - 23 Calibração padrão de ácido gálico



O cálculo da concentração de compostos fenólicos totais foi feito a partir da reta representada pela equação da reta.

$$y = 0,006x$$

Onde,

y = absorvância (nm)

x = (mg L⁻¹ de ácido gálico)

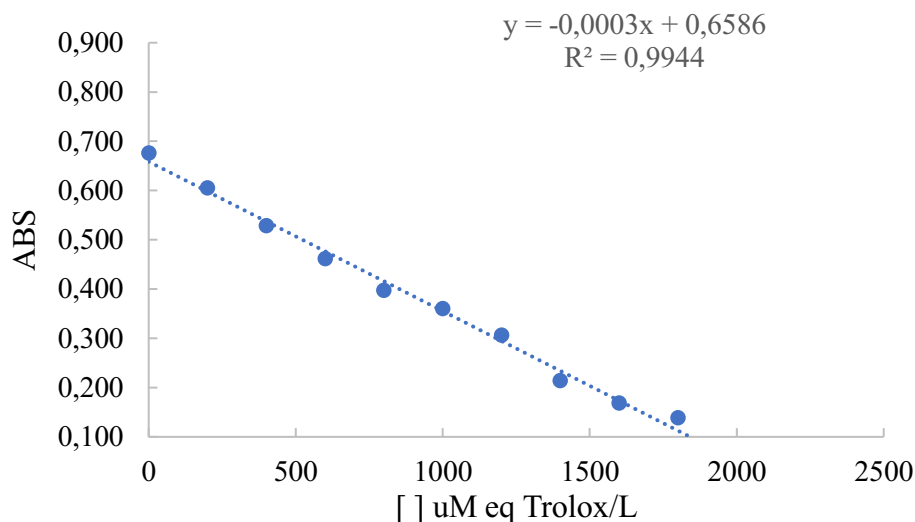
Através da linearização dos dados, obteve-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,99 indicando que o modelo apresentou 99% da variabilidade dos dados observados.

APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da atividade antioxidante nesse tópico serão apresentadas as curvas de calibração para os métodos ABTS E FRAP.

A Figura 24 apresenta a curva de calibração para método ABTS

Figura - 24 Calibração padrão de trolox por método ABTS



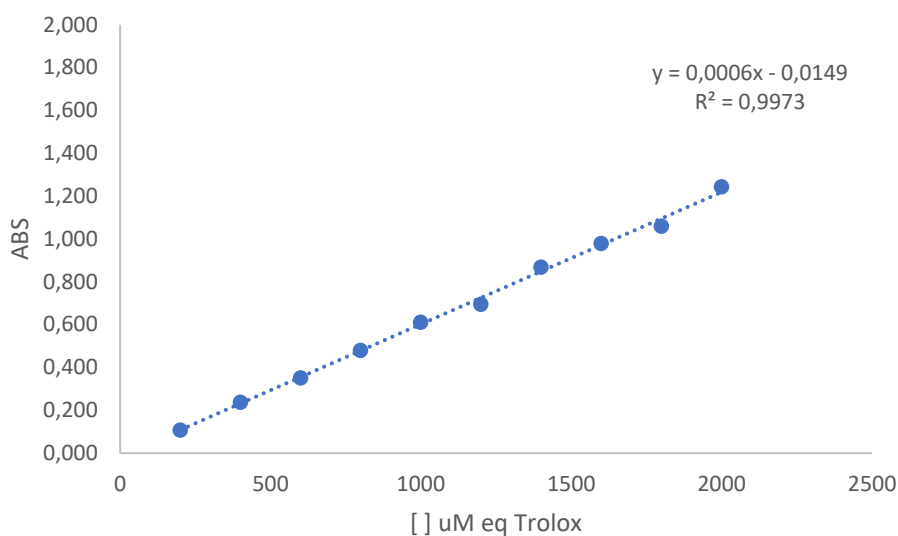
Para a quantificação do teor de antioxidantes pelo método ABTS tem que se substituir a absorbância da amostra pelo y da equação da reta $y = -0,0003x + 0,6586$ e ache o x. O valor final é calculado de acordo com a Equação 14:

$$\text{Cálculo do teor de anti oxidante} = \frac{x \mu\text{M eqi valentede trolox } L^{-1}}{\text{concentração da amostra } g L^{-1}} \quad (14)$$

Através da linearização dos dados, obteve-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,99 indicando que o modelo apresentou 99% da variabilidade dos dados observados.

A determinação da atividade antioxidante pelo método de redução de ferro é representada pela Figura 25.

Figura - 25 Calibração padrão de trolox por método FRAP



Para a quantificação do teor de antioxidantes pelo método FRAP tem que substituir a absorbância da amostra pelo y da equação da reta $y=0,0006x-0,0149$ e ache o x. O valor final é calculado de acordo com a Equação 15:

$$\text{Cálculo do teor de anti oxi dante} = \frac{x \mu M \text{ equi valentede trolox } L^{-1}}{\text{concentração da amostra } g L^{-1}} \quad (15)$$

Através da linearização dos dados, obteve-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,99 indicando que o modelo apresentou 99% da variabilidade dos dados observados.