

CAROLINA LIMA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

"OBTENÇÃO DE SEMENTES DESENGORDURADAS E DE ÓLEO RICO EM TOCOTRIENÓIS DE URUCUM POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica"

"OBTAINING DEFATTED SEEDS AND OIL RICH IN TOCOTRIENOLS FROM ANNATTO BY SUPERCRITICAL EXTRACTION: study of process parameters, scale-up and economical feasibility"

> CAMPINAS 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA LIMA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE

"OBTENÇÃO DE SEMENTES DESENGORDURADAS E DE ÓLEO RICO EM TOCOTRIENÓIS DE URUCUM POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica"

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

"OBTAINING DEFATTED SEEDS AND OIL RICH IN TOCOTRIENOLS FROM ANNATTO BY SUPERCRITICAL EXTRACTION: study of process parameters, scale-up and economical feasibility"

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Doctorate thesis presented to Food Engineering Postgraduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Food Engineering.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONTE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINA LIMA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE E ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a MARIA ANGELA DE ALMEIDA MEIRELES.

Assinatura da orientadora

CAMPINAS 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Albuquerque, Carolina Lima Cavalcanti de.

AL150 Obtenção de sementes desengorduradas e de óleo rico em tocotrienóis de urucum por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica / Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

> Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Extração com fluido supercrítico. 2. Custo de manufatura. 3. Vitamina E. 4. Bixa orellana L. 5. Aumento de escala. I. Meireles, Maria Angela de Almeida, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Obtaining defatted seeds and oil rich in tocotrienols from annatto by supercritical extraction: study of process parameters, scale-up and economical feasibility Palavras-chave em inglês: Supercritical fluid extraction Manufacturing cost Vitamin E Bixa orellana L. Scale-up Área de concentração: Engenharia de Alimentos **Titulação**: Doutora em Engenharia de Alimentos Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles [Orientador] Gislaine Chrystina Nogueira de Faria Kelly Hofsetz Miriam Verginia Lourenço Sandra Regina Salvador Ferreira Data da defesa: 25-02-2013 Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida por **Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque** aprovado pela Comissão Julgadora em ____ de _____ de 2013.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr.^a Gislaine Chrystina Nogueira de Faria DTA/UNICAMP Titular

> Prof.^a Dr.^a Kelly Hofsetz FCA/UNICAMP Titular

Prof.^a Dr.^a Miriam Verginia Lourenço UNAERP Titular

Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Salvador Ferreira EQA/CTC/UFSC Titular

Prof.^a Dr.^a Alessandra Lopez de Oliveira FZEA/USP Suplente

Prof.^a Dr.^a Christianne Elisabete da Costa Rodrigues FZEA/USP Suplente

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

À minha família, por todo o amor, todo o carinho e todo o cuidado por toda a torcida e força que me passavam a cada visita por todos os momentos que passamos juntos, e foram juntos mesmo, e principalmente, por me mostrar que não precisamos estar perto para estarmos juntos.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a M. Angela A. Meireles, pela credibilidade, orientação, paciência e fundamental apoio no desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho (ITAL/APTA), pelas imprescindíveis contribuições para a realização deste trabalho e à Dr.^a Eliane Gomes Fabri (IAC/APTA), pela cessão da matéria-prima urucum utilizada neste trabalho e pelas conversas enriquecedoras.

Ao Sr. Alejandro Espínola, da Kraki (Santo André, SP), por ter cedido a amostra comercial pasta de bixina e ao Sr. W.L. Leong, Carotech Inc. (Malaysia), por ter cedido a amostra comercial de óleo de palma, e contribuírem para o enriquecimento da pesquisa.

Aos membros da banca, pela contribuição para a finalização deste trabalho.

Ao Ari, técnico do LASEFI, pela presteza, paciência e amizade e aos secretários da Pós-Graduação e do Dpto de Engenharia de Alimentos, sempre muito solícitos.

Aos caros colegas que fazem ou fizeram parte do Grupo LASEFI (2006-2013), porque todos vocês de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Em especial,

Aos meus amigos de perto e de longe, brasileiros, colombianos, peruanos... irmãos que o coração escolheu, porque a convivência, quando esta era possível, o carinho, o apoio e a torcida de sempre foram fundamentais nesta etapa de minha vida.

À minha querida "mãedrinha", que por acaso ou destino, ou por ser mesmo um anjo, sempre esteve por perto, do início ao final deste ciclo, e ainda apoiando...

E ao meu amigo, companheiro, parceiro, irmão, namorado, que estava sempre perto, às vezes sem precisar estar junto, por ter ajudado a me tornar uma pessoa melhor.

ix

"Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior. Estas atitudes se refletirão em mudanças positivas no seu ambiente familiar. Deste ponto em diante, as mudanças se expandirão em proporções cada vez maiores. Tudo o que fazemos produz efeito, causa algum impacto." Dalai Lama

> "Passarinho que se debruça - o vôo já está pronto!" João Guimarães Rosa

"Manter-se fiel àquilo que se quer, nos leva a fazer o que é realmente necessário para chegar lá, não porque é uma obrigação, apenas quer tanto que se 'vê fazendo' e fazemos porque queremos que se torne realidade." Spencer Johnson

"Seja qual for a dificuldade, conserve a calma, trabalhando, porque, em todo problema, a serenidade é o teto da alma, pedindo o serviço por solução." André Luiz por Chico Xavier

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem." João Guimarães Rosa

xi

TESE DE DOUTORADO

Autora: Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque

Título: Obtenção de sementes desengorduradas e de óleo rico em tocotrienóis de urucum por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica.

Orientadora: Dr.^a Maria Angela de Almeida Meireles

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo do processo de extração supercrítica (SFE) de óleo de urucum, para obter sementes desengorduradas e extrato rico em tocotrienóis. O trabalho consistiu em um estudo dos parâmetros do processo, do aumento de escala e da viabilidade econômica. Uma revisão da agroindústria do urucum mostrou uma tendência crescente de seu uso devido ao aumento da demanda dos consumidores por produtos naturais e que as sementes são ricas em tocotrienóis, substâncias com ação antioxidante e hipocolesterolêmica. No entanto, a valorização socioeconômica dos produtores, a obtenção de extrato com maior qualidade e o aproveitamento dos subprodutos dos processos foram os principais pontos que ainda precisavam ser aprimorados. Desde que a tecnologia supercrítica tem a vantagem de obter extratos e resíduo livres de solvente, agregando valor aos produtos e subprodutos do processo, um estudo preliminar de viabilidade econômica do processo SFE de óleo de urucum com CO₂ supercrítico foi realizado, usando os dados disponíveis na literatura. O estudo mostrou que a SFE de óleo de urucum com dados não otimizados foi viável, uma vez que os custos de manufatura (COM) dos extratos, para as diversas escalas industriais, foram iguais a US\$ 382,82/kg (100 L), US\$ 258,54/kg (500 L) e US\$ 232,88/kg (1000 L). Diante disso, condições otimizadas de processo foram determinadas com ensaios experimentais em 313 e 333 K e 20, 31, e 40 MPa. A quantidade máxima de óleo foi obtida em 333 K/40 MPa. Nestas condições, um experimento cinético (OEC) foi realizado e o COM do extrato foi estimado em função do tempo de extração. Com a otimização do tempo de processo, o COM do extrato para as capacidades de 100 e 500 L decresceu para US\$ 124,58/kg e US\$ 109,27/kg, respectivamente. Um extrato mais concentrado em δ -tocotrienol, (14,6±0,4)%, foi obtido em 313 K/20 MPa. Nesta condição, foi obtido o menor teor de bixina no extrato, $(0,9 \pm 0,1)$ %. Logo, extrato rico em substâncias funcionais e sementes desengorduradas, e ricas em bixina para posterior extração, foram obtidas com o COM viável para diferentes escalas industriais. OECs em equipamento de 5 L, em 313 K/20 MPa, validaram o critério de aumento de escala usado na simulação do processo para a estimativa do COM: manter constantes a razão entre a massa de solvente e a massa de matéria-prima (S/F) e o tempo de residência do solvente, obtidos em escala de laboratório. As OECs em ambas as escalas apresentaram desempenho similares, tanto em rendimento de extrato, quanto de tocotrienóis. Os valores de COM dos extratos foram estimados para os cenários de investidor, produtor e indústria de colorantes, com custo de matéria-prima variando de 0,00-2,20 US\$/kg. Para o cenário do investidor, o tempo de processo favorável do ponto de vista econômico foi em 105 minutos, com COM de (115±5) US\$/kg para uma unidade de 500 L e S/F de 8,7. Para os cenários, produtor e a indústria, os menores COMs foram (40±6) US\$/kg, (15±2) US\$/kg, e (12±1) US\$/kg, para as capacidades de 50, 300 e 500 L, respectivamente, em 28 minutos e S/F de 3,1. O tempo de retorno de investimento variou entre 1-5 anos, para o produtor, que vende tanto o óleo, quanto o resíduo gerado: sementes desengorduradas e ricas em bixina; e para a indústria de colorantes, que utilizam as sementes desengorduradas para a produção do colorante, além de poder vender o óleo. Este estudo mostrou que a SFE é economicamente viável para escalas a partir de 50 L. Além disso, tem a vantagem de produzir sementes com teor de óleo reduzido/controlado e extrato com concentrações diferentes em δ-tocotrienol, apenas ajustando as condições operacionais do processo.

Palavras chave: *Bixa orellana* L., custo de manufatura, extração com fluido supercrítico, simulação de escala industrial, vitamina E.

DOCTORAL THESIS

Author:	Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque
Title:	Obtaining Defatted Seeds and Oil Rich in Tocotrienols from Annatto
	by Supercritical Extraction: study of process parameters, scale-up
	and economical feasibility.
Major Professor:	Dr. ^a Maria Angela de Almeida Meireles

ABSTRACT

This work presents a study of the supercritical fluid extraction (SFE) of annatto oil to obtain defatted seeds and extract rich in tocotrienols. The work consisted in studying the process parameters, the scale-up and economic feasibility. A review of the annatto agribusiness showed a trend of using annatto due to the increasing consumer demand for natural products because the seeds are rich in tocotrienols, which are antioxidant and hypocholesterolemic substances. However, the socioeconomic evaluation of the producers, the recovery of higher quality extract, and the use of process byproducts were found as the main points that still needed to be improved. Supercritical Technology has the advantage of obtaining solvent-free extracts and residue that add value to the products and byproducts of the process. Thus, a preliminary study of economic feasibility of the SFE process of annatto oil was carried out using the available data in literature. The study showed that the SFE of annatto oil was ecnomically feasible with no data optimized, since the cost of manufacturing (COM) of extracts, for various industrial scales, were US\$ 382.82/kg (100 L), US\$ 258.54/kg (500 L) e US\$ 232.88/kg (1000 L). Therefore, optimized conditions of the process were determined with the experimental assays at 313 e 333 K and 20, 31, and 40 MPa. Largers amounts of oil were obtained in 333 K/40 MPa. In these conditions, kinect experiments were carried out and the COM of extracts was estimated as a function of extraction time. The optimization of process time decreased the COM for the capacities 100 e 500 L to US\$ 124.58/kg to US\$ 109.27/kg respectively. Extract more concentrated in δ -tocotrienol, (14.6 ± 0.4)% was obtained at 313 K/20 MPa. In this condition, the lowest bixin content was obtained in the extract, (0.9 ± 0.1) %. Therefore, an extract rich in functional substances and defatted seeds, and rich in bixin for later

extraction were obtained with different feasible COM for industrial scales. The overall extraction curves (OECs) determined in a 5 L unit at 313 K/20 MPa showed that the scaling-up criterion used in the SFE simulation to estimate the COM was validated. The criterion was to keep constant the mass of solvent to mass of feed ratio (S/F) and the solvent residence time obtained in laboratory scale. The OECs in both scales had similar performance, with similar yield of extract and tocotrienols. The COM of the extracts was estimated for different scenarios considering three different stakeholders: investor, producer and colorant industries. The raw material cost ranged from 0.00 to 2.20 US\$/kg. In the investor's scenario, the best process time, from the economic standpoint, was 105 minutes, with COM (115±5) US\$/kg for a 500 L and S/F of 8.7. For producer and industry scenarios, the lowest COMs were (40 ± 6) US\$/kg, (15 ± 2) US\$/kg, e (12 ± 1) US\$/kg, obtained at 28 minutes and S/F of 3.1 for capacities of 50, 300 and 500 L, respectively. The payback period ranged between 1-5 years for the producer selling oil, waste, and defatted seed which has high bixin content. The colorant industry use defatted seeds for colorant production, and sells the oil. This study showed that the SFE is economically feasible for units of at least 50L. Moreover, the process has the advantage of producing seed with reduced or controlled oil content, and extract with different concentrations of δ tocotrienol, only by adjusting the operating conditions of the process.

Keywords: *Bixa orellana* L., industrial scale simulation, manufacturing cost, supercritical fluid extraction, vitamin E.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
LISTA DE TABELAS	XXIII
LISTA DE FIGURAS	XXV
ABREVIATURAS E SIGLAS	XXIX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	1
1.1.1 RENDIMENTO GLOBAL (X ₀)	5
1.1.2 CURVA GLOBAL DE EXTRAÇÃO (OEC)	8
1.1.3 ESTUDO DO AUMENTO DE ESCALA	11
1.1.4 CUSTO DE MANUFATURA (COM)	12
1.2 Seleção da matéria-prima: urucum (<i>Bixa orellana</i> L.)	15
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	
2.1 Geral	
2.2 Específicos	
3. ESTRUTURA DA TESE	
Referências	
CAPÍTULO 2 – TRENDS IN ANNATO AGROINDUSTRY: BIXIN PR	ROCESSING
TECHNOLOGIES AND MARKET	
ABSTRACT	
Keyword	
1. INTRODUCTION	43
2. ORIGIN AND CHARACTERISTICS	43
3. TECHNOLOGICAL ASPECTS	44
3.1. PRODUCTION AND PROCESSING OF SEEDS	44
3.2. COLORANT PRODUCTION PROCESSES	45
3.3. TECHNOLOGICAL FUNCTION, COMPOSITION AND APPLICATIONS	46

4. MARKET	47
5. TECHNOLOGICAL ADVANCES AND PERSPECTIVES	48
6. TECHNOLOGY DEVELOPMENT	49
7. CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS	50
ACKNOWLEDGMENTS	50
REFERENCES	51
CAPÍTULO 3 – ESTIMATE OF THE COST OF MANUFACTURING (COM) OF NATU	RAL
COLORANTS OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION	53
Abstract	55
Keywords	55
1. INTRODUCTION	55
2. MATERIALS AND METHODS	56
2.1. SELECTION OF THE RAW MATERIAL DATA:	56
2.2. SIMULATION OF THE SFE PROCESS	57
2.3. Scale up	57
2.4. ECONOMICAL EVALUATION	57
3. RESULTS E DISCUSSIONS	58
3.1. Turmeric (Curcuma longa L.)	58
3.2. Annatto (Bixa Orellana L.)	59
4. CONCLUSIONS	60
5. ACKNOWLEDGMENT	60
6. References	60
CAPÍTULO 4 - DEFATTING OF ANNATTO SEEDS USING SUPERCRITICAL CAR	BON
DIOXIDE AS A PRETREATMENT FOR THE PRODUCTION OF BI	XIN:
EXPERIMENTAL, MODELING AND ECONOMIC EVALUATION OF THE PROCESS.	63
ABSTRACT	67
Keywords	67
1. INTRODUCTION	67
2. Material and Methods	68
2.1. MATERIALS	68
2.2. RAW MATERIAL CHARACTERIZATION	68

2.3. CHEMICAL ANALYSIS	. 68
2.4. SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION PROCEDURE	. 69
2.4.1. GLOBAL YIELD ISOTHERMS (GYI)	. 69
2.4.2. OVERALL EXTRACTION CURVES (OEC) AND MODELING	. 69
2.5. ECONOMIC EVALUATION	. 69
2.5.1. COST OF MANUFACTURING	. 70
2.6. STATISCAL ANALYSIS	. 70
3. RESULTS AND DISCUSSION	. 71
3.1. CHARACTERIZATION OF ANNATTO SEEDS	. 71
3.2. TECHNICAL ANALYSIS	. 71
3.2.1. GLOBA YIELD ISOTHERMS (GYIS) AT S/F = 35	. 71
3.2.2. STUDY OF STATIC EXTRACTION TIME	72
3.2.3. OEC AND MODELING	. 73
3.3. ECONOMIC EVALUATION: COM OF ANNATTO EXTRACT	74
4. CONCLUSIONS	. 75
ACKNOWLEDGMENTS	/5
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES	75 75
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA	75 75 DE
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM.	75 75 DE 77
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO	75 DE 77 75
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM RESUMO PALAVRAS-CHAVES	75 DE 77 79 79
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO	75 DE 77 79 79 79
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO 2. MATERIAL E MÉTODOS	75 DE 77 79 79 79 79 80
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL.	75 DE 77 79 79 79 79 80 81
ACKNOWLEDGMENTS. REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO. 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL. B. ÓLEOS VOLÁTEIS	75 DE 77 79 79 79 79 80 81 82
ACKNOWLEDGMENTS. REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO. 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL. B. ÓLEOS VOLÁTEIS. C. COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES	75 DE 77 79 79 79 80 81 82 82
ACKNOWLEDGMENTS. REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL B. ÓLEOS VOLÁTEIS C. COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES D. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	75 DE 77 79 79 79 79 80 81 82 82 82
ACKNOWLEDGMENTS REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL. B. ÓLEOS VOLÁTEIS C. COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES D. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75 DE 77 79 79 79 80 81 82 82 82 82
ACKNOWLEDGMENTS. REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL B. ÓLEOS VOLÁTEIS C. COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES D. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 4. CONCLUSÃO.	75 DE 77 79 79 79 80 81 82 82 82 82 82 82 82
ACKNOWLEDGMENTS. REFERENCES CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA EXTRATOS SFE DE URUCUM. RESUMO PALAVRAS-CHAVES 1. INTRODUÇÃO 2. MATERIAL E MÉTODOS A. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL B. ÓLEOS VOLÁTEIS C. COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES D. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 4. CONCLUSÃO. AGRADECIMENTOS	75 DE 77 79

CAPÍTULO 6 - EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE TOCOTRIENÓIS DE URUCUM:
EXPERIMENTOS CINÉTICOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, VALIDAÇÃO DO AUMENTO
DE ESCALA E VIABILIDADE ECONÔMICA99
RESUMO
PALAVRAS-CHAVES
1. INTRODUÇÃO
2. MATERIAL E MÉTODOS
2.1. MATERIAL
2.2. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA
2.3. CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO (OECS)
2.3.1 OECS EM ESCALA DE LABORATÓRIO E MODELAGEM MATEMÁTICA 106
2.3.2 OECS EM ESCALA PILOTO E CRITÉRIO DE AUMENTO DE ESCALA 106
2.4. Composição química dos extratos
2.5. Estimativa do custo de manufatura dos extratos (COM) 109
2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 111
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES 111
3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE URUCUM
3.2. VALIDAÇÃO DO CRITÉRIO DE AUMENTO DE ESCALA
3.2.1. RENDIMENTO EM EXTRATO
3.2.2. RENDIMENTO EM COMPOSTOS DE INTERESSE
3.3. ETAPA DE SEPARAÇÃO: RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
3.4. OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO
3.4.1. OTIMIZAÇÃO DO PONTO DE VISTA DA QUALIDADE DO EXTRATO
3.4.2. OTIMIZAÇÃO DO PONTO DE VISTA DO COM ECONOMICAMENTE VIÁVEL
4. CONCLUSÕES
AGRADECIMENTOS
REFERÊNCIAS
CONCLUSÕES GERAIS141
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS147
APÊNDICE
ANEXOS

MEMÓRIA DO PERÍODO DO DOUTORADO253

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Processos de produção de colorantes a partir de sementes de urucum18
Tabela 3.1 – Table 1. SFE process parameters57
Tabela 4.1 - Table 1 Physical characteristics of the raw materials, operating parameters of
the process, and experimental results71
Tabela 4.2 - Table 2 Content ^a of alpha, beta, gamma, and delta tocotrienols (T3) and
tocopherols (T1) in the commercial sample, Soxhlet extract, and SFE extracts73
Tabela 5.1- Especificações dos padrões de compostos e reagentes utilizados na análisepor CCD
Tabela 5.2 - Identificação dos extratos SFE das IRG de UP1 aplicados nas cromatofolhas.
Tabela 5.3 - Identificação dos padrões e extratos nas cromatofolhas de CCD com altura
de eluição e Rf, sendo 8 cm a eluição até a fronteira do solvente
Tabela 6.1 - Dados operacionais do processo SFE e resultados experimentais em 313
K/20 MPa114
Tabela 6.2 - Composição química dos extratos SFE de urucum obtidos da OEC PS1 em
cada separador da unidade piloto
Tabela 6.3 - Parâmetros cinéticos obtidos do modelo do ajuste dos dados experimentais
da OEC LS1124
Tabela 6.4 - Dados econômicos obtidos da simulação do processo SFE com custo de
matéria-prima de US\$ 2,20/kg e receita com sementes desengorduradas e com óleo SFE
de urucum (cenário do investidor)129
Tabela 6.5 - Fatores que compõem o custo de manufatura dos extratos: matéria-prima de
US\$ 2,20/kg e receita com sementes desengorduradas e com óleo SFE de urucum
(cenário do investidor)
Tabela 6.6 - Dados econômicos obtidos da simulação do processo SFE: matéria-prima de
US\$ 0,00/kg e receita com sementes desengorduradas e com óleo SFE de urucum
(cenário do produtor); e receita com óleo SFE de urucum (cenário da indústria)131
Tabela 6.7 - Fatores que compõem o custo de manufatura dos extratos: matéria-prima de
US\$ 0,00/kg para os cenários do produtor e da indústria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Definição de estado supercrítico para um componente puro: PT - Ponto
Triplo; PC - Ponto Crítico; Pc - Pressão crítica; Tc - Temperatura crítica (adaptado de
BRUNNER, 1994 apud BRUNNER, 2005)2
Figura 1.2 - Diagrama pressão - temperatura - densidade do CO2 (QUISPE-CODORI,
2005 apud Brogle, 1998)
Figura 1.3 - Isotermas de rendimento global (IRG) de extratos de folha de A. annua
obtidas com CO ₂ supercrítico (QUISPE-CONDORI, 2005)7
Figura 1.4 - Esquema de uma Curva Global de Extração (OEC) típica, apresentando as
três regiões distintas da extração: \Box , Δ , \circ ; as respectivas três retas que descrevem cada
região como CER: etapa de taxa de extração constante; FER: etapa com taxa
decrescente de extração; e DC: etapa controlada pela difusão; e as intersecções das
retas: t _{CER} , t _{FER} , e t _{CER2} 10
Figura 1.5 – Estrutura química dos isômeros de bixina e de norbixina (WIKIPÉDIA, 2012b;
WIKIPÉDIA, 2012c)16
Figura 1.6 – Estrutura química dos isômeros de Tocoferóis (T1) e de Tocotrienóis (T3)
(WIKIPÉDIA, 2012a)
Figura 1.7 - Esquema das etapas do desenvolvimento do projeto e as atividades
realizadas24
Figura 2.1 – Fig. (1). The evolution of publications including articles (–) and patents (), by
decade50
Figura 2.2 - Fig. (2). Patents according to the International Patents Classification from
2000 to 2011
Figura 3.1 – Fig. 1 – OEC and COM from Turmeric SFE extract (0.005 m ³)58
Figura 3.2 – Fig. 2 – COM composition from Turmeric SFE extract (0.005 m ³)58
Figura 3.3 – Fig. 3 - COM composition of Turmeric SFE extract
Figura 3.4 – Fig. 4 - COM of Turmeric SFE extract
Figura 3.5 – Fig. 5 - COM of Annatto SFE extract
Figura 3.6 – Fig. 6 - COM composition of Annatto SFE extract

Figura 4.1 – Fig. 1. Scheme of pressure profile extraction method and dynamic extraction step used to determine the GYI: three cycles of CO2 pressurization, static extraction and a Figura 4.2 – Fig. 2. Flowsheet of the SFE process designed in the SuperPro Designer simulator used for economic analysis......70 Figura 4.3 - Fig. 3. Kinetic curves obtained at 333 K and 31 MPa using a 6.57 mL extraction vessel with 4.5 g of annatto seeds; (\triangle) KC₁: 17.3 ×10⁻⁵ kg/s, 240 min, S/F = Figura 4.4 – Fig. 4. Overall extraction curve (OEC) of extract (O) and bixin content (◊) in CO2 at 333 K and 40 MPa using a 290 mL extraction vessel with 190.3 ± 0.7 g of annatto Figura 4.5 – Fig. 5. Recovery of extract (\bigcirc) with respect to total extract obtained by Soxlet method, and recovery of bixin content (0) in relation to total bixin content in the seeds.....73 Figura 4.6 – Fig. 6. Specific COM (US\$/kg) by process time at 333 K/40 MPa, 0.005 m³. 74 Figura 4.7 - Fig. 7. COM (US\$/kg) of annatto extract for various process times for 300 K/20 MPa and the contribution of each component for vessel capacity of 0.005 m³......74 Figura 4.8 - Fig. 8. COM (US\$/kg) of annatto extract for various process times for 300 K/20 MPa and the contribution of each component for vessels capacities of 0.1 and 0.5 m³. Figura 5.1- CCD dos extratos obtidos das IRG e bixina (Bix): seleção de fase móvel......83 Figura 5.2 – Extratos das IRG de UP1: região do visível sem revelador.85 Figura 5.3 - Extratos das IRG de UP1: região UV 254 nm sem revelador em cromatofolha Figura 5.4 – Extratos das IRG de UP1: região UV 366 nm sem revelador.85 Figura 5.5 – Extratos das IRG de UP1: região UV 366 nm sem revelador em cromatofolha Figura 5.7 - Extratos das IRG de UP1: região UV 366 nm com revelador NP em Figura 5.8 - Extratos das IRG de UP1: óleos voláteis na região do visível com revelador

Figura 5.9 – Padrões, extratos SFE e Tocomin 30%: a: região do visível; b: região UV 254
nm sem revelador em cromatofolha UV-sensível; c: região do visível com revelador DPPH
em t0; e d: região do visível com revelador DPPH em t3091
Figura 5.10 - Padrões, extratos SFE e Tocomin 30%: óleos voláteis na região do visível
com revelador AS e compostos antioxidantes na região do visível com revelador DPPH
em t3091
Figura 5.11 - Extratos (5-50 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH em
a: t0; b: t15; c: t3092
Figura 5.12 - Extratos (50-135 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH
em a: t0; b: t15; c: t3092
Figura 5.13 - Extratos (135-260 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH
em a: 0 min.; b: 15 min.; c: 30 min93
Figura 5.14 – Extratos (260-420 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH
em a: 0 min.; b: 15 min.; c: 30 min93
Figura 5.15 - Extratos (5-135 min.) da OEC7: região do visível94
Figura 5.16 - Extratos (135-420 min.) da OEC7: UV 254 nm
Figura 5.17- Extratos (5-420 min.) da OEC7: região UV 366 nm com revelador NP em
cromatofolha UV-sensível94
Figura 5.18 - Extratos (5-420 min.) da OEC7: região do visível sem revelador95
Figura 5.19 - Extratos (5-420 min.) da OEC7: óleos voláteis na região do visível com
revelador AS95
Figura 6.1 - Dados experimentais de rendimento em extrato, em relação à matéria-prima
seca (b.s.), em função do tempo, obtidos de LS1, e a duração dos três períodos da curva
de extração: CER, FER e DC113
Figura 6.2 - Dados experimentais de rendimento em extrato, em relação à matéria-prima
seca (b.s.), obtidos de LS1 (O), LS2 (Δ), PS1 (\Box): rendimentos em função do tempo (a) e
em função de S/F (b)115
Figura 6.3 - Dados experimentais de rendimento em Tocotrienóis (b.s), de γ -T3 (O) e δ -T3
(Δ), obtidos nos extratos das OECs: LS1 (símbolos vazios) e PS1 (símbolos cheios)119
Figura 6.4 - Dados experimentais de rendimento em bixina (b.s.) obtidos das OECs: LS2
(Δ) e PS1(O)120

Figura 6.5 - Rendimentos obtidos em PS1 (\Diamond), nos separadores S1 (\Box), S2 (Δ) e S3 (G))
durante PS1, e em PS2 (X)12	!1
Figura 6.6 - Teor de γ -T3 (azul) e δ -T3 (vermelho) no extrato durante LS1 mais o obtido r	10
processo de limpeza (CP – <i>Cleaning Process</i>)12	:6
Figura 6.7 - Teor de γ -T3 (azul) e δ -T3 (vermelho) no extrato durante PS1 mais o obtic	lo
no processo de limpeza (CP – <i>Cleaning Process</i>)12	27
Figura 6.8 - Estimativa do COM de óleo SFE de urucum com custo de matéria-prima c	le
US\$ 2,20/kg (a) e US\$ 0,00/kg (b)13	4

ABREVIATURAS E SIGLAS

- AS: solução de anisaldeído sulfúrico
- BG: banho de gelo
- BT: banho térmico
- b.s.: base seca
- b.u.: base úmida
- b₀, b₁, b₂, b₃: parâmetros do modelo de ajuste de retas à OEC
- C1, C2: parâmetros do modelo de ajuste de retas à OEC
- CCD: cromatografia em camada delgada
- CE: célula de extração
- CER: (constant extraction rate) período de taxa constante de extração
- CO2: dióxido de carbono
- COL: (cost of labor) custo de mão de obra
- COM: (cost of manufacturing) custo de manufatura
- CP: compressor
- CQC: (cost of quality control) custo com controle de qualidade
- CRM: (cost of raw material) custo de matéria-prima
- CUT: (cost of utilities) custo de utilidades
- CWT: (cost of waste treatment) custo de tratamento de resíduos
- d_B:diâmetro do leito de extração
- DC: (diffusion controlled) período controlado por difusão
- d_p: diâmetro de partícula
- FC: frasco de coleta
- FCI: (fixed cost of investment) custo de investimento
- FER: (falling extraction rate) período de taxa decrescente de extração
- GRAS: (generally recognized as safe) comumente reconhecido como seguro
- H_B: altura do leito de extração
- IRG: isotermas de rendimento global
- LPSE: (*low pressure solvent extraction*) extração com solventes orgânicos a baixa pressão
- LS: (laboratory scale) curva global de extração em escala de laboratório

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

m_{Ext}: massa de extrato

MP: matéria-prima

NP: solução de aminoetil difenilborinato

OEC: (overall extraction curve) curva de extração

P: pressão

PS: (pilot scale) curva global de extração em escala piloto

Pc: pressão crítica

Q_{CO2}: vazão de CO₂

R_{CER}: rendimento no período CER

Rf: índice de retenção

S/F: razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima

S1, S2, S3: separadores

SFE: (supercritical fluid extraction) extração com fluido supercrítico

T: temperatura

T_c: temperatura crítica

T1: tocoferol

T3: tocotrienol

t: tempo

t_{CER}: duração do período CER

t_{CER2}: duração do período CER2

t_{FER}: duração do período FER

t_{RES}: tempo de residência do solvente no leito

UM: urucum misto

UP1: urucum safra 2010

UP2: urucum safra 2011

UV: ultravioleta

X₀: rendimento global

Y_{CER}: concentração de soluto no solvente na saída do extrator durante o período CER

 ϵ : porosidade do leito

ρ: densidade

ρ_a: densidade aparente do leito

ρ_r: densidade real das partículas

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

Esta tese apresenta um estudo do processo de extração com fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction* - SFE) que obtém, simultaneamente, óleo rico em tocotrienóis de urucum (*Bixa orellana* L.) e sementes desengorduradas ricas em bixina, usando o dióxido de carbono como solvente.

O projeto foi realizado no LASEFI – Laboratório de Tecnologia Supercrítica: extração, fracionamento e identificação de extratos vegetais, dando continuidade às pesquisas que vem sendo realizadas há mais de 25 anos, desenvolvendo processos para a obtenção de compostos naturais e bioativos de plantas aromáticas, condimentares e medicinais.

Nos últimos 10 anos, os estudos no LASEFI têm incluído avaliações técnicoeconômicas de viabilidade de implantação do processo SFE no Brasil (LEAL; TAKEUCHI; MEIRELES, 2007; PEREIRA; MEIRELES, 2007; PEREIRA; ROSA; MEIRELES, 2007; LEAL, 2008; LEAL et al., 2008; CAVALCANTI, 2009; NAVARRO-DIAZ et al., 2009; PRADO et al., 2009; PRADO, 2009; PRADO; LEAL; MEIRELES, 2009; VEGGI, 2009; VEGGI et al., 2009; LEAL et al., 2010; PRADO, 2010; PRADO et al., 2010; NAVARRO-DIAZ, 2010; PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011; ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012; FARIAS-CAMPOMANES, 2012). A intenção é agregar valor à biodiversidade brasileira, sugerindo um melhor emprego de seus recursos naturais e valorizando socioeconomicamente as regiões produtoras, usando uma tecnologia que obtém extratos com grau alimentício e é ambientalmente amigável.

1.1 PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

O processo SFE é uma operação unitária por contato, entre uma matriz sólida e um solvente supercrítico, que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físicoquímicas dos fluidos em estado supercrítico: alto poder de solvatação, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (BRUNNER, 1994).

Um componente puro é considerado um fluido supercrítico quando sua temperatura (T) e pressão (P) são maiores que seus valores críticos, T_c e P_c , respectivamente (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005). A pressão crítica é definida como

a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura. Analogamente, a temperatura crítica é considerada a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A região crítica tem sua origem no ponto crítico e, acima de Tc e Pc, a substância é considerada fluido supercrítico, quando variações de pressão e de temperatura não modificam fortemente as propriedades do fluido (RIZVI et al., 1986). A Figura 1.1 apresenta um diagrama de fases típico de uma substância pura.





O uso de fluidos em estado supercrítico em processos de extração é interessante porque esses fluidos apresentam propriedades de transporte, como difusividade e viscosidade, com valores intermediários entre os dos gases e líquidos (BRUNNER, 2005). A alta difusividade e a baixa viscosidade, características dos gases, conferem um alto poder de penetração em diferentes matrizes, o que favorece a transferência de massa no processo de extração. Enquanto que a alta densidade, característica dos líquidos, proporciona um poder de solvatação semelhante ao apresentado pelos líquidos (RIZVI et al., 1986).

O dióxido de carbono (CO₂) é o solvente mais usado na extração supercrítica por estar disponível em alta pureza, ser barato, não tóxico, não inflamável e de fácil remoção do soluto, pois é removido pela simples diminuição da densidade; por dissolver

compostos não polares ou levemente polares, podendo ter a seletividade modificada pela adição de cossolventes; e por suas propriedades críticas serem relativamente baixas que o tornam favorável como solvente de extração, uma vez que não expõe compostos termosensíveis a altas temperaturas e nem necessita de unidades de extração que suportem altíssimas pressões de operação, reduzindo o custo de investimento e, consequentemente, os custos de manufatura do extrato (UQUICHE; DEL VALLE; ORTIZ, 2004; BRUNNER, 2005; VASCONCELLOS, 2007).



A Figura 1.2 apresenta o digrama pressão-temperatura-densidade do CO₂.

Figura 1.2 – Diagrama pressão – temperatura – densidade do CO₂ (QUISPE-CODORI, 2005 apud Brogle, 1998).

A densidade do CO₂ supercrítico está relacionada com o seu poder de solvatação. A variação de temperatura e pressão tem efeito na densidade do CO₂ e consequentemente na capacidade de solubilização do soluto (Figura 1.2). O efeito da temperatura na solubilidade é complexo devido à combinação de dois fatores: o aumento da temperatura eleva a pressão de vapor do soluto melhorando sua solubilidade no fluido supercrítico. Porém, o aumento da temperatura também diminui a densidade do solvente diminuindo seu poder de solvatação (SOUSA et al., 2002; PEREIRA e MEIRELES, 2010). Em pressões muito elevadas, a maior influência na solubilidade é dada pela alteração da pressão de vapor do soluto com a temperatura, uma vez que o aumento da temperatura implica em pequena diminuição de densidade do solvente. Em pressões baixas, o aumento da temperatura decresce drasticamente a densidade do solvente e a solubilidade diminui. Portanto, quanto maior a densidade, maior será o poder de extração do fluido, entretanto, menor será a sua seletividade (REVERCHON; TADDEO; DELLA PORTA, 1995; BRUNNER, 2005).

A SFE é realizada em batelada, onde o empacotamento da matéria-prima, de onde se obtém o extrato, é realizado em cilindro (extrator) de aço inoxidável a pressão atmosférica. O extrator é fechado, pressurizado e aquecido até as condições operacionais de pressão e temperatura. O processo consiste nas etapas de extração e separação do extrato do solvente (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; SOVOVÁ, 2005):

- A etapa de extração dinâmica inicia quando o solvente no estado supercrítico (fluido) é bombeado através do extrator, fluindo continuamente através da matéria-prima sólida. O fluido difunde pela matriz, dilatando sua estrutura celular e diminuindo a resistência ao transporte de massa, facilitando assim a solubilização dos compostos que são transportados para a superfície do sólido, escoando para a saída do extrator;
- A etapa de separação do extrato do solvente ocorre quando a densidade do fluido é reduzida, diminuindo drasticamente seu poder de solubilização, e o soluto precipita em um separador, na saída do extrator. Esta etapa pode ser realizada por variação da temperatura e/ou pressão. Em escala de laboratório, a separação pode ser realizada em pressão atmosférica e o solvente pode ser descartado ao ambiente. Em escalas maiores, o solvente deixa o dispositivo de coleta em pressões abaixo da pressão de operação, porém bem acima da pressão atmosférica, e é recirculado para reaproveitamento.

Na etapa de extração, a temperatura e a pressão do fluido são ajustadas para maximizar os rendimentos nos compostos de interesse. Enquanto que na etapa de separação, a temperatura e a pressão são ajustadas para que a solubilidade seja reduzida, assegurando a precipitação do extrato e possibilitando a reciclagem do solvente (QUISPE-CONDORI, 2005).

A pesquisa e desenvolvimento de um processo SFE incluem estudos de viabilidade técnica, otimização e aumento de escala. Além disso, o custo de manufatura (*Cost of Manufacturing* – COM) do extrato e a rentabilidade do processo são fatores importantes para se determinar a viabilidade econômica de implantação de uma unidade SFE industrial. Por isso, para uma análise preliminar do COM, os seguintes dados experimentais devem estar disponíveis (MEIRELES, 2003; QUISPE-CONDORI, 2005; MEIRELES, 2008; PEREIRA; MEIRELES, 2010): as isotermas de rendimento global (IRG) e as curvas globais de extração (*Overall Extraction Curves* - OEC); acompanhados de uma extensiva caracterização química e funcional dos extratos.

1.1.1 RENDIMENTO GLOBAL (X₀)

A análise da viabilidade técnica é a primeira etapa de um processo SFE. O estudo das condições operacionais de temperatura e pressão do solvente e a caracterização química do extrato determinam a viabilidade técnica do processo, uma vez que os resultados indicam a condição (temperatura e pressão) de máximo rendimento em compostos de interesse e/ou mínima coextração de compostos indesejáveis (QUISPE-CONDORI, 2005).

Segundo Meireles (2008), a SFE de matrizes vegetais é complexa por natureza: no extrator estão em contato o CO₂ supercrítico e a matriz vegetal (estrutura celulósica+mistura de soluto), em que o soluto é uma mistura multicomponente que dependerá da natureza da matriz vegetal; e a estrutura celulósica também é uma mistura multicomponente, com todos os materiais insolúveis incluindo proteínas, carboidratos, sais etc., que são insolúveis no solvente, deste modo totalmente inerte. Por isso, a medida de solubilidade do soluto no solvente supercrítico deve incluir, não só as interações entre estes componentes, como também a interação entre a estrutura celulósica e o soluto, o que torna o estudo bastante complexo devido aos inúmeros compostos presentes na mistura.

Segundo Rodrigues et al. (2002), a solubilidade de um sistema matriz vegetal+CO₂ pode ser medida executando uma série de ensaios experimentais no método dinâmico, em diferentes vazões de solvente para cada condição de temperatura e pressão de extração, para identificar a vazão em que o solvente deixa o extrator saturado em soluto.

5

Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos

Segundo Sousa et al. (2002), este procedimento é necessário porque em vazões muito baixas o efeito da dispersão axial irá interferir na medida de solubilidade; em vazões altas, o tempo de contato entre o solvente e o soluto será menor que o necessário para saturar o solvente. No entanto, o estudo da solubilidade por este método se torna demorado e oneroso porque requer inúmeros e longos experimentos com variação de vazão para cada condição operacional (RODRIGUES et al., 2002; MEIRELES, 2008).

O rendimento global (X₀) é a quantidade de material solúvel que pode ser extraída de determinada quantidade de matéria-prima em uma dada pressão e temperatura do solvente na extração, expresso como a relação entre a massa de material solúvel pela massa de matéria-prima sólida (MEIRELES, 2003).

O X₀ depende da seletividade do solvente em determinada temperatura e pressão de extração, levando em consideração as interações entre estrutura celulósica+mistura de soluto+solvente. Por isso, a solubilidade do soluto no solvente supercrítico não poder ser determinada através de experimentos de X₀, uma vez que é mais representativo da etapa de extração (matriz vegetal+solvente) à etapa de separação (soluto+solvente), sendo mais útil na escolha da temperatura e pressão do processo de extração (RODRIGUES et al., 2003; SOUSA et al., 2005; MEIRELES, 2008; PRADO, 2009). No entanto, o comportamento de X₀ com a temperatura e a pressão pode ser usado como indicativo de solubilidade, uma vez que permite visualizar o comportamento da solubilidade do extração (RODRIGUES et al., 2003; QUISPE-CONDORI, 2005; PRADO, 2009).

Na Figura 1.3 é apresentado o comportamento das IRGs do sistema *Artemisia annua*+CO₂. O aumento da temperatura ocasionou o aumento da pressão de vapor do soluto e a diminuição da densidade do solvente. O aumento da temperatura em uma mesma pressão, para pressões menores que 250 bar, causou a diminuição da solubilidade do soluto, pois o efeito da densidade do solvente foi predominante em relação ao efeito da pressão de vapor do soluto; e em pressões maiores que 250 bar, causou o aumento da solubilidade do soluto, pois o efeito da pressão de vapor do soluto foi predominante em relação ao efeito da densidade do solvente. A pressão onde ocorre a inversão de X₀ nas curvas das IRG, 250 bar, é denominada de pressão de inversão (QUISPE-CONDORI, 2005).

6


Figura 1.3 – Isotermas de rendimento global (IRG) de extratos de folha de *A. annua* obtidas com CO₂ supercrítico (QUISPE-CONDORI, 2005).

Assim, os resultados obtidos das IRG permitem visualizar o comportamento do sistema, proporcionando informações necessárias para a seleção das condições operacionais otimizadas de extração.

Dados da literatura mostram que algumas metodologias aplicadas ao processo SFE foram desenvolvidas para aumentar sua eficiência e seletividade, como os métodos de perfil de pressão e de fracionamento na etapa de extração e de separação (SMITH JR. et al., 2003; SETIANTO et al., 2009; PEREIRA, 2002; BRAGA, 2005; PRADO, 2010; PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011).

O método de perfil de pressão consiste de etapas de pressurização e despressurização realizadas em sequência. O aumento da eficiência no rendimento da SFE, através do uso de CO₂ com pulsos de pressão, é atribuído à capacidade de modificar a membrana celular da matéria-prima pelo efeito da expansão rápida do gás, permitindo que os compostos de interesse fiquem mais facilmente disponíveis (SMITH JR. et al., 2003; SETIANTO et al., 2009). Smith Jr. et al. (2003) verificaram que as SFEs de castanha de caju realizadas com etapas de despressurização intermediárias a extração aumentaram os rendimentos e diminuíram a quantidade de CO₂ necessária para a extração, concluindo que o método SFE com perfil pressão foi uma técnica eficaz de separação. Pereira (2002) obteve alcalóides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis*,

Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos

conhecida como jasmim, leiteira de dois irmãos e casca de cobra, com SFE usando CO₂+etanol como solvente, e também obteve aumento de rendimento com a aplicação do perfil de pressão durante a extração.

Métodos de fracionamento na etapa de extração podem ser realizados por estágios: inicialmente a baixa pressão, para retirada de compostos voláteis, e posteriormente em altas pressões, para recuperação de compostos mais pesados, com ou sem cossolvente (BRAGA, 2005). Na etapa de separação, o fracionamento é possível e eficiente através de separadores posicionados em série, onde produtos diferentes podem ser obtidos através da manipulação das condições de temperatura e pressão de operação (PRADO, 2010; PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011). Entretanto, segundo os autores, são necessários mais estudos sobre o equilíbrio de fases de extratos complexos obtidos a partir de matrizes biológicas para uma maior eficiência da etapa de separação do processo de SFE.

Depois que um processo é considerado tecnicamente viável, um estudo de otimização é realizado. Nesta etapa, as informações necessárias para a análise da viabilidade econômica de um processo, como dados da matéria-prima, dados cinéticos, de rendimento e tempo de extração, qualidade do extrato e condições de fracionamento, são determinadas. As OECs descrevem o processo SFE de forma global fornecendo informações de tempo requerido para uma batelada (ciclo de extração) e parâmetros importantes para estimativa de COM.

1.1.2 CURVA GLOBAL DE EXTRAÇÃO (OEC)

O estudo de otimização dos parâmetros da SFE considerando o processo global é realizado selecionando a condição de melhor eficiência em rendimento de extrato e/ou composto de interesse.

A OEC é uma curva construída relacionando os dados de massa de soluto em função do tempo, ou da quantidade de solvente, obtidos em períodos predeterminados durante a extração. Ao longo do processo SFE, a taxa de obtenção do extrato não é uma função linear no tempo. Uma OEC típica pode ser descrita por três etapas (MEIRELES, 2008):

• Etapa de taxa de extração constante (*Constant Extraction Rate* - CER): período em que ocorre extração do soluto mais facilmente acessível da superfície

externa da partícula a uma velocidade aproximadamente constante. Nesta etapa predomina o fenômeno de convecção.

- Etapa com taxa decrescente de extração (*Falling Extraction Rate* FER): período em que começa a aparecer resistência à transferência de massa na interface sólido-fluido, sendo importante o efeito tanto da transferência de massa por convecção quanto por difusão. Parte do soluto encontra-se menos acessível, seja porque grande parte do soluto extraível não está disponível na superfície das partículas da matriz vegetal ou porque o rompimento das células da matriz vegetal não foi uniforme.
- Etapa controlada pela difusão (*Difusion Controled* DC): período caracterizado pela retirada do extrato através do mecanismo de difusão. Nesta etapa não há soluto na superfície da partícula sólida.

Segundo Meireles (2008), uma OEC pode ser descrita por um *spline* linear, ou seja, por segmentos de retas. A massa de extrato (ou rendimento) pode ser calculada a partir da Equação 1.1.

$$m_{EXT} = \left(b_0 - \sum_{i=1}^{i=N} C_i \, b_{i+1}\right) + \sum_{i=1}^{i=N} b_i \, t$$
1.1

onde m_{EXT} é a massa do extrato recuperada (ou o rendimento da extração no tempo t); b₀...b_i são os coeficientes lineares das retas ajustadas; C_i é o valor do tempo na intersecção entre a i-ésima e a (i+1)-ésima retas; e t é o tempo de extração.

Para os casos cujo perfil da OEC corresponde a um spline com duas retas, a massa de extrato pode ser calculada pela Equação 1.2 e pela Equação 1.3 em casos que corresponde a um spline com três retas.

$$m_{EXT} = (b_0 - C_1 b_2) + (b_1 + b_2) \times t$$
1.2

$$m_{EXT} = (b_0 - C_1 b_2 - C_2 b_3) + (b_1 + b_2 + b_3) \times t$$
1.3

A Figura 1.4 apresenta um esquema das três regiões distintas da extração.

A intersecção entre as duas primeiras retas determina o término do período de taxa constante de extração (t_{CER}) e a intersecção entre a segunda e terceira retas determina o final do período de taxa decrescente de extração (t_{FER}); a partir deste ponto inicia-se o período de extração controlado pela difusão (DC).



Tempo, Quantidade de solvente

Figura 1.4 – Esquema de uma Curva Global de Extração (OEC) típica, apresentando as três regiões distintas da extração: \Box , Δ , \bigcirc ; as respectivas três retas que descrevem cada região como CER: etapa de taxa de extração constante; FER: etapa com taxa decrescente de extração; e DC: etapa controlada pela difusão; e as intersecções das retas: t_{CER}, t_{FER}, e t_{CER2}.

O período CER pode ser utilizado como tempo de processo em estimativas preliminares do COM de extratos SFE porque de 50-90% do rendimento total da extração são obtidos durante este período (MEIRELES, 2008; TAKEUCHI et al., 2008; PEREIRA; MEIRELES, 2010). Segundo Leal (2008), para o caso de ajuste de duas retas, quando o período FER não é observado, o t_{CER} é uma boa estimativa de tempo de processo. Para os casos cujo perfil da OEC corresponde a um spline com três retas, o t_{CER2}, que é intersecção das retas da etapa CER e da etapa DC, é uma estimativa mais adequada do tempo de processo.

Segundo Bravi et al. (2002), a otimização de um processo de SFE também pode ser alcançada através da produção contínua de extrato. Como não se pode produzir extrato continuamente com apenas um extrator e sob a hipótese de que a fase inativa (carregamento do sólido no extrator, pressurização, despressurização e descarregamento) e ativa (extração) do ciclo de trabalho do extrator requer um tempo determinado, um mínimo de duas unidades independentes de extração seria necessário para se conseguir a produção contínua. A duração dessas fases pode determinar a regularidade desejada na produção de extrato e o número mínimo de extratores através da Equação 1.4:

$$n_e = \left[2 \times \frac{t_e + t_r}{t_e}\right]$$
 1.4

onde: n_e é o número de extratores; t_e é o tempo de extração e t_r é o tempo total de empacotamento e desempacotamento do leito, mais o tempo de despressurização e pressurização do extrator.

Quando o processo está otimizado, um estudo de aumento de escala é realizado. Nesta etapa, os parâmetros de processo selecionados em escala de laboratório são validados e as exigências de insumos e de recirculação do solvente são otimizadas.

1.1.3 ESTUDO DO AUMENTO DE ESCALA

Para simplificar o estudo do aumento de escala do processo SFE, um critério simples e eficiente é manter constantes a proporção entre massa de solvente (S) e massa de matéria-prima (F), S/F, e o tempo de residência do solvente (PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011). Segundo Prado et al. (2011), este critério se mostrou adequado para os estudos de aumento de escala, uma vez que a cada tempo de extração considerado, o rendimento em extrato foi similar para diferentes geometrias de leito de extração. Consequentemente, este critério assume que o rendimento do processo SFE possui mesmo desempenho em escala industrial, quando são empregadas as mesmas condições de processo utilizadas em escala laboratorial (ROSA; MEIRELES, 2005; PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011).

Prado (2010) estudou o aumento de escala do processo SFE adotando o critério de manter constantes o S/F e o tempo de residência do solvente. Cinco matérias-primas foram usadas, sendo empregadas diferentes partes das plantas: cravo-da-índia (botão floral), gengibre (rizoma), resíduo de cana-de-açúcar (torta de filtro), cidrão (folha) e semente de uva. O critério adotado se mostrou eficiente porque as OECs determinadas em escala piloto tiveram comportamento e rendimento similar às OECs determinadas em escala de laboratório. O estudo mostrou que os dados obtidos em escala de laboratório puderam predizer o comportamento do processo em escala piloto e, assim, auxiliar no desenvolvimento da tecnologia SFE em escala industrial, uma vez que pode ser utilizado

com segurança para estimativas de custos de manufatura. Além disso, o método diminui o tempo e o custo empregados no desenvolvimento do processo SFE (PRADO, 2010; PRADO; PRADO; MEIRELES, 2011).

O conhecimento obtido em SFE não deve ser generalizado para todas as matrizes biológicas, uma vez que os mecanismos de transferência de massa podem ser diferentes entre espécies e partes da planta utilizadas (REVERCHON; MARRONE, 1997). Portanto, cada matéria-prima deve ser estudada particularmente para se determinar a viabilidade econômica de implantação de uma unidade SFE industrial através da estimativa do COM do extrato.

1.1.4 CUSTO DE MANUFATURA (COM)

O custo de implantação de um processo é composto pelo Custo Total de Investimento e pelo Custo Operacional.

O Custo Total de Investimento é composto pelo Custo Fixo de Investimento, calculado com base no custo de compra do equipamento e outros elementos de custo que dependem do equipamento (instalação, impostos territoriais, engenharia etc.); pelo Capital de Giro, que é a liquidez disponível necessária para operar o negócio, calculado com base nas contribuições dos itens de custo (mão de obra, matéria-prima, energia e tratamento de resíduo); e Custo de Startup, validação e inicialização do processo, calculado com base (porcentagem) no Custo Fixo.

O Custo Operacional é o custo diretamente dependente da taxa de produção, como gastos com matérias-primas, mão-de-obra, equipamentos, tratamento ou descarte de resíduos, energia, transporte, publicidade e vendas, *royalties*, pesquisa e desenvolvimento, descarte de produto entre outros. Esses itens do custo estão distribuídos em três categorias: custos fixos, custos diretos e despesas gerais. Os custos fixos consideram os itens que não são dependentes da taxa de produção e, por isso, devem ser considerados mesmo quando o processo não estiver em operação, como os custos de aquisição de equipamentos e relacionados (depreciação, manutenção, seguro etc.); Os custos diretos incluem os itens que dependem diretamente da taxa de produção, como matéria-prima, mão de obra, energia etc.; e despesas gerais, que envolvem os gastos administrativos, gastos com vendas, com pesquisa e desenvolvimento, entre outros (TURTON et al., 2003; ROSA; MEIRELES, 2005; PEREIRA; MEIRELES, 2007). O

COM específico é definido como a razão entre o Custo de Manufatura e a massa total de extrato produzida (ROSA; MEIRELES, 2005).

Uma das dificuldades em adotar a tecnologia SFE como opção de processo de extração é o custo de investimento ser relativamente alto. No entanto, estimativas de COM de extratos de várias matérias-primas vegetais tem mostrado que o processo SFE é de fato uma alternativa competitiva para a produção de extratos bioativos (LEAL; TAKEUCHI; MEIRELES, 2007; PEREIRA; MEIRELES, 2007; PEREIRA; ROSA; MEIRELES, 2007; LEAL, 2008; LEAL et al., 2008; NAVARO-DIAZ et al., 2009; PRADO, 2009; PRADO et al., 2009; PRADO;LEAL;MEIRELES, 2009; VEGGI, 2009; VEGGI et al., 2009; LEAL et al., 2010; PRADO, 2010; PRADO et al., 2010; NAVARO-DIAZ, 2010; ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2010; FARIAS CAMPOMANES, 2012; PRADO et al., 2012).

Estes estudos mostraram que a otimização dos parâmetros do processo aumentou a taxa de produção, fazendo da SFE um processo técnico e economicamente viável com várias vantagens, comparadas aos métodos convencionais de extração. O COM de extratos SFE se mostrou competitivo com as tecnologias tradicionais devido ao fato de que o custo da matéria-prima é o principal fator que afeta o COM de extratos vegetais, e não o custo de investimento inicial, e que a tecnologia SFE pode ser viável dependendo do valor da matéria-prima.

Um método para estimar o COM de extratos SFE foi apresentado por Rosa e Meireles (2005). O cálculo do COM é baseado na metodologia sugerida por Turton et al. (2003), que propõe que o COM pode ser estimado quando os seguintes custos são conhecidos: custo fixo de investimento (*Fixed Cost of Investment* - FCI), custo de mão de obra (*Cost of Operational Labor* - COL), custo de matéria-prima (*Cost of Raw Material* - CRM), custo de tratamento de resíduos (*Cost of Waste Treatment* - CWT) e custo de utilidades (*Cost of Utilities* - CUT).

- <u>FCI</u>: representa a fração do custo fixo do projeto que inclui os itens de custo que estão relacionados ao equipamento, como depreciação, manutenção (instalação em geral), seguro etc.
- <u>COL</u>: inclui todos os custos dependentes de trabalho operacional e não operacional: benefícios, salários da supervisão, gastos com suprimentos operacionais (EPIs, roupas, ferramentas, etc.) e administrativos.

- <u>CRM</u>: inclui os custos de todas as matérias-primas necessárias para o funcionamento do processo. No caso do processo SFE inclui a matriz vegetal a ser extraída, levando em conta os custos de pré-tratamento como secagem, cominuição, classificação, limpeza etc.; e a reposição de CO₂ perdido na despressurização do extrator.
- <u>CWT</u>: corresponde ao custo de tratamento e/ou descarte de resíduo do processo. No processo SFE com CO₂ como solvente, o único resíduo é a matriz vegetal exaurida, livre de solvente orgânico e, por isso, nenhum resíduo crítico precisa ser tratado. Neste caso o custo pode ser negligenciado.
- <u>CUT</u>: corresponde ao custo de energia requerida para processo como um todo. No caso do processo SFE, é a energia relacionada com o ciclo do solvente, como os trocadores de calor: aquecimento elétrico, resfriamento de água, e energia requerida para os equipamentos em geral.

A proposta de Turton et al. (2003) considera que cada um desses custos tem uma contribuição ponderada na composição do COM, como apresentado pela equação 1.5:

 $COM = (0,304 \times FCI) + (2,73 \times COL) + [1,23 \times (CRM + CWT + CUT)]$ 1.5

Para realizar cálculos de estimativas de COM, as simulações dos processos em computador vêm sendo cada vez mais utilizadas. A vantagem do uso de simuladores está na economia do uso de insumos e equipamentos de operação e na diminuição do tempo de desenvolvimento de projetos de processos e aumento de escala e da análise das informações e implementação do projeto, para muitos processos industriais (ROULF et al., 2001; KWIATKOWSKI et al., 2006). Nesta etapa, as exigências de insumos e de recirculação do solvente e quaisquer questões relacionadas com a circulação de materiais são otimizadas.

Bravi et al. (2002) utilizaram um simulador de processos para avaliar a otimização da extração supercrítica de óleo de girassol determinando o número ideal de extratores e reduzindo o custo com energia de recompressão do solvente, para um processo contínuo, em aproximadamente 28%. Leal et al. (2007) e Takeuchi et al. (2006) simularam diferentes condições de operação (temperatura e pressão) no separador do processo SFE, a fim de estudar o impacto no COM de extratos supercríticos, e verificaram diferenças da ordem de 2 a 4% no COM final. As melhores condições de operação na

etapa de separação do processo SFE foram otimizadas e a menor perda de extrato e CO₂ foram em 4 MPa e 303 K.

Estudos recentes de SFE têm apresentado estimativas de COM dos extratos de várias matérias-primas, calculados pelo simulador de processo SuperPro Design[®] versão 6.0 (PRADO et al., 2009; PRADO, 2009; VEGGI, 2009; LEAL et al., 2010; PRADO, 2010; NAVARRO-DIAZ, 2010; ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2010; FARIAS-CAMPOMANES, 2012; PRADO et al., 2012). O simulador executa análises detalhadas do gasto energético e do balanço de massa em todas as etapas do processo, fornecendo estimativas de COM confiáveis (INTELLIGEN INC., 1995).

Segundo a *AACE[®]* International (1997), Association for the Advancement of Cost Engineering International, dependendo do grau de definição do projeto, a estimativa do COM pode ser dividida em cinco classes, nomeadas Classes 1, 2, 3, 4 e 5. A estimativa de Classe 5 é baseada no mais baixo grau de definição de projeto. Enquanto que a estimativa de Classe 1 é a mais próxima da definição e maturidade do projeto total (*AACE[®]* INTERNATIONAL, 1997; LEAL, 2008).

O simulador de processos SuperPro Designer[®] é um simulador de estimativa de custo Classe 3 porque necessita ter um fluxograma completo com todos os equipamentos envolvidos no processo a ser estudado (TURTON et al., 2003). A metodologia usada por este simulador para o cálculo de COM é a mesma descrita por Turton et al. (2003) e proposta por Rosa e Meireles (2005) para a estimativa de COM dos extratos SFE.

Portanto, com relativamente poucos dados experimentais é possível obter estimativas iniciais e confiáveis de COM, com nível suficiente de definição de projeto. A simulação da SFE fornece dados importantes sobre o custo do processo e do extrato que, aliado aos benefícios do produto final obtido, pode tornar a tecnologia uma opção atrativa entre os processos convencionais de extração.

1.2 SELEÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA: URUCUM (*BIXA ORELLANA* L.)

O urucum é conhecido pelo uso de seus colorantes naturais, a bixina e a norbixina (Figura 1.5), para conferir cor em produtos elaborados pelas indústrias de alimentos, de cosméticos e de fármacos. No Brasil, é conhecido principalmente por seu uso como condimento, o colorífico (FAO, 2006).

Os colorantes podem ser usados como corante e como pigmento. A diferença básica está na solubilidade do colorante no meio em que é incorporado. O corante atribui

cor através da alteração da cor do meio, onde o colorante é solúvel. Enquanto que o pigmento confere cor através da sua dispersão no meio, sendo o colorante não solúvel neste meio (SARON; FELISBERTI, 2006). Assim, o colorante pode agir como corante ou pigmento, dependendo da aplicação e da natureza do meio.

A Figura 1.5 apresenta a estrutura química da bixina e da norbixina, os principais colorantes presentes nas sementes de urucum.



Figura 1.5 – Estrutura química dos isômeros de bixina e de norbixina (WIKIPÉDIA, 2012b; WIKIPÉDIA, 2012c).

O urucum tem uma fração lipídica rica em tocotrienóis e geranil geraniol, que podem ser usados como suplemento nutricional, nutracêutico, em alimentos e bebidas funcionais etc. (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998; TAN, 2005; ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012).

Os tocotrienóis pertencem ao grupo das vitaminas lipossolúveis, vitamina E, que, apesar de ser mais popularmente conhecida como α -tocoferol, também é composta pelos isômeros: α -, β -, γ - e δ - tocoferol (T1) e tocotrienol (T3) (Figura 1.6). Enquanto muito se sabe sobre os T1, pesquisas vêm evidenciando que os T3 são superiores aos T1 em suas propriedades de atividade antioxidante (TAN, 2005) e de redução do colesterol (PEARCE et al., 1992). Na verdade, o α -T1 foi associado à má absorção de T3 (TAN, 2005) além de atenuar ou interferir na ação dos tocotrienóis de redução do colesterol (QURESHI et al.,

1996). δ-T3 tem sido associado a efeitos hipocolesterolêmicos e se mostrou eficiente no tratamento de doenças cardiovasculares e de câncer (TAN, 2005; TAN; FOLLEY, 2002).



A Figura 1.6 apresenta a estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis.

Figura 1.6 – Estrutura química dos isômeros de Tocoferóis (T1) e de Tocotrienóis (T3) (WIKIPÉDIA, 2012a).

Recentemente foi descoberto que o urucum tem o maior teor de δ -T3, superando as duas principais fontes até então conhecidas, o óleo de palma e o farelo de arroz (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998; ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012). Além disso, tem a vantagem de conter apenas traços de α -T1 em sua composição (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012), enquanto que ambas as fontes óleo de palma e o farelo de arroz contêm quantidades significantes de α -T1 (TAN, 2005; AMERICAN RIVER NUTRITION INC. 2009). Devido à recente descoberta, as informações sobre os tocóis de urucum ainda são escassas (FREGA; MOZZON; BOCCI, 1998; TAN; FOLLEY, 2002; TAN, 2005; HARDER et al., 2007; TAN, 2008; AMERICAN RIVER NUTRITION INC. 2009; CASTRO; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2011; CHISTÉ et al., 2011; ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2012).

Estudos recentes mostraram que o extrato de urucum também pode ser eficaz na prevenção da peroxidação lipídica (CHISTÉ et al., 2011) e o mecanismo antioxidante sugere que provavelmente os tocotrienóis estejam atuando junto com a bixina, que também tem propriedades antioxidantes (KIOKIAS; GORDON, 2003), para proteger as gorduras insaturadas da oxidação (CASTRO; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2011).

No Brasil, o urucum é uma planta economicamente importante e é cultivada em todas as regiões brasileiras exclusivamente para a comercialização do colorante (ALBUQUERQUE; MEIRELES, 2011). Segundo Franco et al. (2008), o beneficiamento da semente de urucum tem início no momento posterior à colheita e consiste nas seguintes etapas: recolhimento dos frutos no campo, pré-secagem dos frutos, "descachopamento",

peneiramento, secagem das sementes, ensacamento, armazenamento e classificação. Após a classificação, o urucum é comercializado e a maioria é destinada à produção de colorífico, nos estados do Nordeste, e à produção de corantes naturais no mercado do Sudeste do Brasil.

Os processos industriais atualmente empregados para extração do colorante são: processo mecânico de abrasão utilizando óleo vegetal, ou solução aquosa de hidróxido de sódio ou potássio, como agentes de suspensão; e processo de extração com um ou mais solventes orgânicos (FAO, 2006; FRANCO et al., 2008). A Tabela 1.1 apresenta as tecnologias de obtenção dos colorantes, a partir de sementes de urucum, mais utilizadas pela indústria.

Matéria-prima:	Sementes de urucum					
Solvente:		Água aquecida	Etanol	Óleo vegetal aquecido (com ou sem etanol)	NaOH ou KOH	NaOH
Sequência de operações utilizadas:	Extração por abrasão	Х	Х	Х	Х	Х
	Peneiragem	Х	Х	Х	Х	Х
	Aquecimento			Х	Х	Х
	Filtração	Х	Х	Х	Х	Х
	Reação (HCI)					Х
	Decantação					Х
	Filtração					Х
	Secagem	Х	Х			Х
	Moagem		Х			
	Padronização				Х	
	Envase	Х	Х	Х	Х	Х
Produto:		Bixina >90%	Bixina >30%	Bixina ou Norbixina <1%	Sal de Norbixina	Norbixina

Tabela 1.1 – Processos de produção de colorantes a partir de sementes de urucum.

Fonte: CARVALHO, 2010.

Estudos de SFE com sementes de urucum existentes na literatura abordaram a etapa de extração com foco na obtenção da bixina, avaliando a influência das condições operacionais do processo no seu rendimento (CHAO et al., 1991; DEGNAN et al., 1991; ANDERSON et al., 1997; SILVA, 1999; BRPI0605425-0, 2006; NOBRE et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Chao et al. (1991), analisaram a viabilidade técnica de extração de bixina com o processo SFE em modo dinâmico e caracterizaram os extratos comparando a qualidade

com o obtido por clorofórmio e etanol (1:3). Análises em HPLC mostraram que extratos SFE obtidos em 333 K/31 MPa continham muitos terpenos, sendo o majoritário o diterpeno geranil geraniol que também foi encontrado no extrato orgânico, mas não tão enriquecido quanto no extrato SFE. Nobre et al. (2006), realizaram SFE de óleo de urucum em 303 K/20 MPa, para obtenção de bixina com CO₂ e CO₂+etanol em duas vazões: sem cossolvente, o rendimento obtido em 2,0 ×10⁻⁵ kg CO₂/s foi menor que o obtido em 1,1 ×10⁻⁵ kg CO₂/s, concluindo que o aumento da vazão diminuiu o rendimento possivelmente devido à transferência de massa ser controlada pela difusão no interior na partícula; com cossolvente, o rendimento não foi influenciado pela vazão e aumentou com o aumento da pressão e da temperatura, porém obtiveram baixa eficiência de extração do colorante.

Degnan et al. (1991), determinaram o rendimento e a qualidade do extrato de urucum em CO₂ supercrítico através do método estático por 30 minutos e compararam com o da bixina pura. Em todas as condições estudadas, as concentrações de bixina pura, e de extrato e bixina da semente aumentaram com o aumento da temperatura e da pressão. Com a realização de uma cinética, os autores observaram que a solubilidade de bixina foi influenciada pela quantidade de óleo nas sementes, pois quando a concentração de óleo tendeu a zero, a concentração de bixina das sementes de urucum e da bixina pura. Silva et al. (2008), determinaram IRGs para a bixina das sementes de urucum e da bixina pura em CO₂ supercrítico pelo método estático por 24 h. O rendimento de bixina foi observado um ponto de inversão da solubilidade da bixina. Os autores observaram que a solubilidade foi influenciada pela presença de óleo nas sementes e que a matriz sólida (geralmente inerte) teve pouquíssimo efeito no seu rendimento. O óleo foi caracterizado e o perfil de ácidos graxos foi similar ao do óleo de soja, sendo 68% destes de ácidos graxos insaturados (oléico e linoléico).

O documento de patente BRPI0605425-0, depositado em 17/11/2006, mostra um processo de extração e purificação dos colorantes de urucum, com uma coluna de adsorção em série ao equipamento de SFE de forma a se obter um extrato enriquecido destes colorantes. O processo produz um extrato com 46,5% de pureza (bixina/extrato, m/m), sem citar o quanto de bixina é efetivamente extraído das sementes.

Nestes estudos, segundo os autores, o rendimento de bixina não aumentou com a moagem das sementes possivelmente devido à localização do colorante na superfície da

semente. Apesar disso, foi observado que o processo SFE com CO₂ como solvente não foi eficiente para a obtenção da bixina, nem mesmo quando o óleo das sementes atuou como cossolvente, uma vez que a concentração de bixina no solvente foi relativamente baixa, 0,001-0,050 g/kg de CO₂. No entanto, levando em consideração a natureza apolar do CO₂ no estado supercrítico, que extrai óleo rico em compostos antioxidantes das sementes, o processo SFE pode ser empregado com foco na extração do extrato de urucum. Para uma análise de viabilidade econômica, os parâmetros operacionais disponíveis na literatura são insuficientes e, por isso, estudos de otimização das condições operacionais devem ser realizados a fim de se obter parâmetros necessários para estimar os custos de manufatura dos extratos SFE de urucum.

Atualmente, as regiões Sudeste e Norte são as maiores produtoras de urucum no Brasil, com 69% da produção. Os estados de São Paulo e de Rondônia produzem juntos cerca de 40% da produção nacional. No entanto, o maior valor pago por quilograma de semente foi em São Paulo (R\$3,38) e nos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul (R\$3,01), enquanto que em Rondônia, o valor foi R\$2,60 (IBGE, 2012). A variação da qualidade das sementes, principalmente em teor de bixina, que ocorre entre variedades e regiões produtoras, é o principal motivo do baixo valor agregado à matéria-prima pelas indústrias de colorantes.

Ultimamente, grandes produtores de outras culturas estão migrando para o cultivo de urucum¹. O forte investimento em pesquisa e desenvolvimento na sua cadeia produtiva em São Paulo, melhorando a qualidade das sementes, fez do estado um dos principais produtores do colorante natural no mundo (FABRI et al., 2009).

Para as regiões Norte e Nordeste do país, a cultura do urucuzeiro é de grande importância porque 78,2 % do seu cultivo têm origem na agricultura familiar (FRANCO, 2007). No início da década de 90, o estado da Paraíba possuía uma considerável área de plantio chegando a liderar o ranking nacional com 48% da produção nacional (IBGE, 1989 apud FRANCO, 2007). Atualmente, a Paraíba produz 6,8% da produção nacional, com valor pago por quilograma de semente de R\$ 2,02 (IBGE, 2012). Porém, a tendência é melhorar devido à iniciativa do Governo do Estado com o programa Revitalização do Urucuzeiro, que busca a sustentabilidade e a eficiência competitiva da cadeia produtiva, com perspectiva de transformar em benefícios sociais e econômicos para o Nordeste,

¹ Informação pessoal de Eliane Gomes Fabri – Em: 2ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum, 2 de dezembro de 2010, Campinas/SP/Brasil.

considerando a visível procura pelo produto, o que permite condições satisfatórias de comercialização a curto, médio e longo prazo (FRANCO, 2007).

Assim, a seleção do urucum como matéria-prima objeto desse trabalho foi motivada por suas características de ingrediente natural e de propriedades funcionais dos extratos, além da importância socioeconômica para as regiões produtoras. O estudo visou o desenvolvimento de um processo de extração com a tecnologia supercrítica, em que se obtém, simultaneamente, óleo rico em antioxidantes e sementes desengorduradas ricas em bixina. A finalidade foi a de gerar novos atrativos para a cadeia produtiva de urucum, além de estimular o investimento de empresários para a inserção deste processo em unidades de extração de colorantes naturais, beneficiando indiretamente agricultores familiares da região produtora através da geração de emprego e renda.

Somada às vantagens econômicas, a proposta deste projeto de pesquisa foi a de também apresentar os benefícios ambientais e sociais importantes que a Tecnologia Supercrítica promove, com produtos mais puros e livres de resíduos de solventes orgânicos. De fato, o respeito ao meio ambiente e à saúde dos consumidores é um apelo importante para a diferenciação dos extratos naturais obtidos através da SFE, uma vez que se observa uma tendência generalizada do mercado (indústria de alimentos, fármacos e cosméticos) pela busca por produtos que gerem vantagens econômica, social e ambiental.

Sementes da variedade Piave e sementes mistas (várias plantas) de urucum foram cedidas do Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, instituto de pesquisa da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pela Dr.^a Eliane Gomes Fabri, pesquisadora do departamento de horticultura. As sementes mistas pertenciam a várias plantas diferentes e o *blend* não tinha um padrão de composição. Por isso, decidiu-se descontinuar a pesquisa com as sementes mistas, uma vez que teores de bixina iriam variar bastante entre lotes desta matéria-prima. Além disso, o teor de bixina medido foi de (1,66 \pm 0,05)% nas sementes. Os resultados experimentais obtidos com as sementes mistas estão apresentados no Apêndice (item 2.5 Resultados experimentais de urucum (UM – sementes mistas)). Para este trabalho, a variedade Piave (5% de bixina, aproximadamente) foi selecionada.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 GERAL

Avaliar a viabilidade econômica do processo de extração supercrítica, em diferentes escalas, para desengordurar as sementes de urucum e deixá-las ricas em bixina e obter óleo rico em tocotrienóis, usando o dióxido de carbono como solvente.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o estado da arte da agroindústria do urucum;
- Simular o processo SFE em diferentes escalas e estimar o COM do extrato de urucum usando dados existentes na literatura;
- Determinar experimentalmente os parâmetros necessários à otimização do processo e que não foram encontrados na literatura:
 - Caracterizar física e quimicamente as sementes de urucum utilizadas nos ensaios experimentais;
 - Otimizar as condições operacionais do processo SFE em escala de laboratório, determinando as IRG em 313 e 333 K e 20, 31 e 40 MPa;
 - Otimizar o tempo de processo em escala de laboratório, determinando as OECs nas condições operacionais em que se obteve o produto final desejado;
 - Ajustar os dados das OECs obtidas ao *spline* de linhas retas para calcular os parâmetros cinéticos do processo SFE;
- Validar o critério de aumento de escala aplicado na simulação do processo SFE, determinando OECs em unidade de SFE em escala piloto, com célula de extração de 5 L e três separadores de 1 L, usando como referência os dados experimentais obtidos em escala de laboratório;
- Determinar a composição química dos extratos de urucum obtidos por SFE;
- Simular o processo SFE e estimar o COM dos extratos, em escalas de laboratório, piloto e industriais, usando os dados experimentais otimizados com respeito às sementes desengorduradas e aos tocotrienóis;
- Analisar a viabilidade econômica do processo SFE, levando em consideração o produto final desejado: maior rendimento em óleo e/ou maior rendimento em compostos antioxidantes para as escalas de processo estudadas.

3. ESTRUTURA DA TESE

A tese está disposta em capítulos, compostos de trabalhos e artigos científicos publicados e que serão publicados, que apresentam as etapas do desenvolvimento do projeto. O **Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos** versa sobre a fundamentação teórica da SFE e das etapas de desenvolvimento do processo: otimização dos parâmetros operacionais, estudo do aumento de escala e a estimativa de COM dos extratos; sobre a motivação da escolha do urucum como matéria-prima de estudo, levando em consideração as características de ingrediente natural e funcional, além da sua importância socioeconômica para as regiões produtoras; sobre os objetivos da tese, geral e específicos; e sobre a estrutura da tese, que elucida as etapas do desenvolvimento do projeto. A estrutura da tese de forma objetiva pode ser vista no esquema das atividades realizadas da Figura 1.7.

Durante os primeiros anos de doutorado, uma pesquisa sobre o estado da arte da agroindústria do urucum foi realizada e está apresentada no **Capítulo 2 - Trends in Annatto Agroindustry: Bixin Processsing Technologies and Market**. Esta primeira etapa teve como objetivo identificar soluções, avanços tecnológicos e tendências na ultima década, relacionados ao mercado do urucum e seus subprodutos, abrangendo as tecnologias de produção dos colorantes e de compostos nutracêuticos, visando também prevenir a duplicação de esforços em pesquisa e desenvolvimento. A análise do desenvolvimento tecnológico foi realizada por meio da observação das recentes atividades de pesquisa e desenvolvimento, e publicações de patentes na área.

A revisão mostrou que o urucum é rico em tocotrienóis e geranil geraniol, substâncias nutracêuticas com conhecida ação antioxidante; além disso, que há uma tendência crescente do uso do urucum devido, tanto ao aumento da demanda dos consumidores por produtos naturais, quanto aos avanços de soluções tecnológicas importantes nos vários setores da cadeia produtiva, para transformar o colorante principal, a bixina, em formas mais estáveis, encontrar novas aplicações e diminuir problemas de fornecimento. Tais avanços resultaram no aumento da área de produção devido às vantagens oferecidas, que foram fundamentais para agregar valor ao urucum e, consequentemente, proporcionar importantes benefícios socioeconômicos às regiões produtoras.



Figura 1.7 – Esquema das etapas do desenvolvimento do projeto e as atividades realizadas.

Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos

No entanto, a revisão também mostrou que muito ainda necessita ser melhorado e que, entre outros, os seguintes pontos precisam ser levados em consideração:

- A valorização socioeconômica dos produtores: no Brasil, o cultivo do urucum é majoritariamente feito por pequenos produtores configurando como agricultura familiar. Os principais compradores são as grandes indústrias de fabricação de colorantes, que definem o preço de venda do urucum, baseado no teor de bixina das sementes. Quanto menor for o teor de bixina, menor será o valor oferecido aos produtores, deixando-os sem alternativa para escoar sua produção;
- A obtenção de extrato com maior qualidade: os processos mais utilizados pelas indústrias de colorantes utilizam soluções alcalinas, óleo vegetal e/ou solventes orgânicos para a obtenção do colorante. Estes processos, geralmente, apresentam deficiências em relação à seletividade e à pureza do extrato obtido. Além disso, para a remoção dos solventes empregados na extração, são demandadas várias operações unitárias. Isto, além de aumentar o custo do processo, não elimina o solvente completamente, restringindo o uso no mercado de fármacos, por exemplo;
- Aproveitamento dos subprodutos dos processos: em processos que utilizam a etapa de saponificação para a obtenção do colorante, a eficiência aumenta quando o teor de óleo nas sementes é baixo. No caso de processos que usam soluções alcalinas ou solventes orgânicos para extração do colorante, a fase oleosa, rica em substâncias antioxidantes e obtida como subproduto, geralmente é descartada. As sementes, com resíduos de solventes, são descartadas ou usadas para ração animal.

Diante dos problemas acima mencionados, uma alternativa é o uso de tecnologias mais limpas que sejam seletivas em relação aos compostos de interesse e que não deixem resíduos de solventes para que o produto seja utilizado sem restrição pelas indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas. E o processo SFE é uma opção porque tem a vantagem de melhorar a seletividade do solvente com o ajuste das condições de processo (temperatura e pressão); porque usa o CO₂ como solvente, que é atóxico e inerte; e porque os subprodutos do processo podem ser aproveitados, pois não deixa resíduos de solventes, nem no extrato, nem na matriz biológica. Ainda nesta pesquisa, estudos de SFE usando urucum como matéria-prima, com foco na extração da

Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos

bixina, foram encontrados na literatura (CHAO et al., 1991; DEGNAN; VON ELBE; HARTEL, 1991; ANDERSON et al., 1997; SILVA, 1999; NOBRE et al., 2006; SILVA et al., 2008). Os estudos mostraram que, apesar de o processo ter sido tecnicamente viável, ele não foi eficiente para a obtenção do colorante, nem mesmo quando o óleo das sementes atuou como cossolvente, uma vez que a concentração de bixina no solvente foi relativamente baixa, 0,001-0,050 g/kg de CO₂.

Baseado no contexto da baixa eficiência do processo SFE para a obtenção de bixina; da presença de substâncias nutracêuticas, com conhecidas propriedades funcionais, na fração oleosa das sementes; da indesejável presença dessa fração oleosa, pelas indústrias de produção do colorante que utilizam a etapa de saponificação para a extração de bixina; e, consequentemente, do interesse dessas indústrias em adquirir sementes de urucum com o mínimo teor de óleo possível, motivo pelo qual o descartam; a etapa seguinte do projeto foi realizar um estudo preliminar de viabilidade econômica do processo SFE de óleo de urucum com CO₂ supercrítico, usando os dados disponíveis na literatura.

Um estudo de simulação do processo SFE e estimativa de COM dos extratos de urucum e de cúrcuma foi realizado, usando apenas dados da literatura. O trabalho completo foi publicado no II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids - II PROSCIBA 2010 e está apresentado no Capítulo 3 - Estimate of the Cost of Manufacturing (COM) of Natural Colorants Obtained by Supercritical Fluid Extraction. O processo SFE foi simulado em escalas piloto e industrial, usando o software SuperPro Designer[®] versão 6.0. Os parâmetros de processo utilizados no estudo foram os obtidos por Chao et al. (1991) e Braga (2005), para urucum e cúrcuma, respectivamente. A cúrcuma (Curcuma longa L.) foi selecionada para este estudo porque também é usada como condimento e colorante natural com propriedades antioxidantes, com aplicação nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002) e principalmente porque os parâmetros do processo SFE de cúrcuma já tinham sido otimizados por Braga (2005), com estudos de viabilidade técnica e de otimização através da determinação das IRGs e das OECs, estimando o tempo de processo mais adequado. O objetivo desta etapa foi analisar a viabilidade econômica do processo SFE, sem a necessidade de realizar ensaios experimentais, economizando o uso de insumos necessários nesta fase.

Com os parâmetros de processo SFE de cúrcuma otimizados, o cálculo do COM para a escala piloto (5 L) variou de US\$ 251,21/kg a US\$ 435,81/kg, em cada ponto da OEC, e permitiu determinar o tempo de processo economicamente viável, em 37 minutos. Enquanto que para o urucum, apesar de existirem dados de SFE do extrato, os parâmetros cinéticos necessários para a simulação do processo e estimativa de COM não estavam disponíveis. Ainda assim, a simulação do processo em diferentes escalas industriais mostrou que a SFE de óleo de urucum foi viável, desde que os COMs do extrato tiveram valores iguais a US\$ 382,82/kg (100 L), US\$ 258,54/kg (500 L) e US\$ 232,88/kg (1000 L). Portanto, é possível diminuir o COM dos extratos com parâmetros de processo otimizados. Além disso, a quantidade e disponibilidade dos compostos funcionais presentes no extrato de urucum devem ser analisados a fim de verificar a qualidade do produto final.

Diante desses resultados, a próxima etapa para o desenvolvimento do processo SFE de urucum foi realizar ensaios experimentais de IRGs e OECs, caracterizar os extratos, determinar os parâmetros operacionais otimizados e estimar o COM dos extratos. O objetivo foi obter as condições otimizadas de processo com maior rendimento em extrato, rico em substâncias funcionais, e deixar as sementes ricas em bixina para posterior extração; além de obter o COM mais baixo com a otimização do processo. Este estudo está apresentado no **Capítulo 4** – **Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: experimental, modeling and economic evaluation of the process.** No Apêndice estão detalhados o procedimento operacional da unidade SFE utilizada neste estudo (item 1.1 Unidade Spe-ed SFE); os resultados experimentais obtidos (item 2.1 Resultados experimentais: Capítulo 4); o procedimento do ajuste da OEC a um spline (item 2.3 Procedimento do ajuste dos dados experimentais); e o cálculo da porosidade do leito e das partículas (2.4 Medição de propagação de erros).

As condições de processo estudadas no referido estudo foram: 313 e 333 K e 20, 31, e 40 MPa, tendo sido a quantidade máxima de óleo obtida em 333 K/40 MPa. Nestas condições, um experimento cinético foi realizado para se obter informações sobre o tempo de processo. O COM do extrato foi calculado em função do tempo de extração para estimar o tempo de processo economicamente viável. A estimativa foi realizada usando o simulador comercial SuperPro Designer[®] versão 6.0. O processo SFE foi simulado em escalas de laboratório (5 L) e industriais (100 e 500 L) e o layout consistiu de dois

Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos

extratores para simular uma extração semicontínua. O critério de aumento de escala utilizado foi o de manter constante a razão entre a massa de solvente (S) e a massa de matéria-prima (F), e o tempo de residência do solvente no leito de extração. Foi observado que a eficiência do processo, 85%, em obter o extrato das sementes foi similar ao processo Soxhlet quando sementes inteiras foram utilizadas. Com a otimização do tempo de processo, o COM do extrato para as capacidades de 100 e 500 L decresceu para US\$ 124,58/kg e US\$ 109,27/kg, respectivamente. Para a planta piloto, com dois extratores de 5 L, o COM estimado foi de US\$ 292,50/kg. Um extrato mais concentrado em δ -tocotrienol, (14,6 ± 0,4)%, foi obtido em 313 K/20 MPa. Nesta condição, obteve-se o menor teor de bixina no extrato, (0,9 ± 0,1)%. Portanto, dependendo do produto final desejado, é possível obter extrato livre de solventes, com máxima quantidade de óleo, ou com máxima concentração em δ -tocotrienol, apenas modificando as condições de temperatura e pressão de operação do processo. Além disso, o processo tem a vantagem de produzir sementes de urucum com teor de óleo reduzido, onde a quantidade de óleo das sementes pode ser facilmente controlada.

Os extratos SFE obtidos das IRGs e da OEC foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Estas análises estão apresentadas no **Capítulo 5** – **Cromatografia por Camada Delgada (CCD) de extratos SFE de urucum**. Neste trabalho, compostos com atividade antioxidante, fenólicos e aqueles com características de óleo volátil foram detectados nos extratos SFE de urucum. Os compostos antioxidantes γ -T3 e δ -T3, assim como o esqualeno e o β -sitosterol, foram identificados através da comparação com estes mesmos compostos presentes na amostra comercial Tocomin 30%. Através das análises por CCD foi possível observar as mudanças no perfil químico destes extratos e auxiliou nas tomadas de decisões durante o desenvolvimento do projeto, direcionando as atividades da pesquisa com respeito à seleção dos compostos de interesse que deveriam ser estudados.

Ensaios experimentais em unidade piloto (5 L) foram realizados usando o critério de aumento de escala adotado na simulação de processos SFE. O objetivo foi validar o critério que considera que, mantendo constantes a razão S/F e o tempo de residência do solvente, o comportamento das OECs determinadas em escala de laboratório prediz o comportamento das OECs determinadas em escala maiores; e, consequentemente, poder usar os dados de laboratório de SFE de óleo de urucum com segurança para estimativas

de COM. Este trabalho está apresentado no *Capítulo 6 – Extração Supercrítica de Tocotrienóis de urucum: experimentos cinéticos, composição química, validação do aumento de escala e viabilidade econômica.* No Apêndice estão detalhados os procedimentos operacionais das unidades SFE utilizadas neste estudo (item 1.1 Unidade Spe-ed SFE e item 1.2 Unidade piloto Thar (5 L)); os resultados experimentais obtidos (item 2.2 Resultados experimentais: Capítulo 6); o procedimento do ajuste da OEC a um spline (item 2.3 Procedimento do ajuste dos dados experimentais); e o cálculo da porosidade do leito e das partículas (2.4 Medição de propagação de erros).

Neste estudo, as condições otimizadas em relação ao teor máximo de tocotrienóis, e ao menor teor de bixina, foram utilizados. Para isso, OECs foram determinadas em escalas de laboratório (290 mL) e piloto (5,15 L) em 313 K/20 MPa. Todos os extratos obtidos foram caracterizados quanto ao teor de bixina e tocóis totais. O efeito do tempo no rendimento e na composição do extrato foi analisado. O critério de aumento de escala foi validado com sucesso e simulações do processo SFE foram realizadas em escalas piloto e industrial para se determinar o tempo de processo economicamente viável. Os cenários analisados consideraram que a matéria-prima tinha preço de venda igual a US\$ 2,20/kg (investidor) e US\$ 0,00/kg, para produtor e indústria de colorantes, uma vez que o processo SFE seria inserido na cadeia de produção da bixina. O tempo de retorno variou de 1 a 5 anos, mostrando que o processo SFE foi viável para unidades industriais a partir de 50 L, tanto para o produtor, que vende o resíduo gerado: sementes desengorduradas e ricas em bixina; quanto para a indústria de colorantes, que utilizam as sementes desengorduradas para a produção do colorante. Adicionalmente, a SFE pode controlar o teor de óleo nas sementes e obter extratos com diferentes concentrações de δ-tocotrienol e, sabendo que os processos SFE são únicos na sua capacidade de produzir produtos livres de solvente, os COMs dos extratos podem ser competitivos em relação a outros processos de extração.

Enfim, diferentemente dos trabalhos citados que focou na obtenção de bixina com o processo SFE, no presente trabalho foi desenvolvido um processo que empregou o CO_2 supercrítico na extração do óleo de urucum diretamente da semente, com alta eficiência e com baixa remoção de colorantes (aproximadamente 0,1%), possibilitando a obtenção simultânea, tanto do óleo com fração enriquecida em δ -tocotrienol, quanto de sementes desengorduradas ricas em colorantes para a posterior extração. O processo desenvolvido

Capítulo 1 – Introdução geral e objetivos

pode ser realizado em escala industrial e gera dois subprodutos aproveitáveis industrialmente sem resíduos de solventes tóxicos e sem a necessidade da pré-extração do óleo, empregando solventes aquosos e/ou orgânicos ou seu fracionamento em várias etapas.

REFERÊNCIAS

AACE INTERNATIONAL - Association for the Advancement of Cost Engineering International. Recommended Practice (Draft): Cost Estimate Classification System. **Cost Engineering**, v. 39, n. 4, p. 22-25, 1997.

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.

ALBUQUERQUE, C.L.C.; MEIRELES, M.A.A. Estimate of the cost of manufacturing (COM) of natural colorants obtained by supercritical fluid extraction. In: II IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS – II PROSCIBA, 2010, Natal, Brasil. **PROSCIBA 2010 pen-drive** (SC113).

ALBUQUERQUE, C.L.C.; MEIRELES, M.A.A. Trends in annato agroindustry: bixin processing technologies and Market. **Recents Patents on Engineering**, v. 5, p. 94–102, 2011.

AMERICAN RIVER NUTRITION INC. Annatto tocotrienols: Reshaping the vitamin Elandscape.Nutraceutical Business & Technology, v. 5, n. 3, p. 38-41, de maio-junho de2009,ISSN1745-8307.Disponívelem:http://viewer.zmags.com/publication/4f9a932c#/4f9a932c/40.Acesso em: 15 de fevereirode 2011.

ANDERSON, S.G.; NAIR, M.G.; CHANDRA, A.; MORRISON, E. Supercritical fluid carbon dioxide extraction of annatto seeds and quantification of trans-bixin by high pressure liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 247-249, 1997.

BRAGA, M.E.M. **Obtenção de compostos bioativos de** *Curcuma Ionga* **L. e** *Lippia**Alba* **M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. 2005. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.**

BRAVI, M.; BUBBICCO, R.; MANNA, F.; VERDONE, N. Process optimization in sunflower oil extraction by supercritical CO2. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 2753-2764, 2002.

BROGLE, H. CO₂ as a solvent: Its properties and applications. Chemistry and Industry, v. 12, p. 385-390, 1982.

BRUNNER, G. **Gas Extraction:** An Introdution to Fundamentas of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process. 1.ed. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, 1994. 387 p.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal** of Food Engineering, v. 67, p. 21-33, 2005.

CARVALHO, P.R.N. Os Corantes do urucum. In: REUNIÃO NACIONAL DA CADEIA PRODUTIVA DO URUCUM, 2ª, 2010, Campinas. **2ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do urucum**. Campinas: ITAL, APTA, 2010. ISBN 978-85-7029-105-9.

CASTRO, W.F.; MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 126-131, 2011.

CAVALCANTI, R.N. **Obtenção de Extrato de Matriz Oleaginosa de Origem Amazônica via Tecnologia Supercrítica:** Determinação das Isotermas de Rendimento Global, dos Parâmetros de Processo e Caracterização Química dos Extratos. 2009. 145 f. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHAO R.R; MULVANEY, S.J.; SANSON, D.R.; HSIEH, F; TEMPESTA, M.S. Supercritical CO2 Extraction of Annatto (Bixa orellana) Pigments and Some Characteristics of the Color Extracts **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 80-83, 1991.

CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, p. 419-426, 2011.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

DEGNAN, A.J.; VON ELBE, J.H.; HARTEL, R.W. Extraction of annato seed pigment by supercritical CO2. Journal of Food Science, v. 56, p. 1656-1659, 1991.

FABRI, E.G.; LATESTA, C.S.; RÓS-GOLA, A.; TERAMOTO, J.R.S.; PANTANO, A.P. **Ocorrência de urucum no Estado de São Paulo**. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Urucumsp/urucumsp.htm. Acesso em 5 agosto 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Annatto Extracts: **Chemical and Technical Assessment**. 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/cta_annatto.pdf>. Acesso em: 24 de maior de 2007.

FARIAS-CAMPOMANES, A. Recuperação de compostos bioativos via extração supercrítica e convencional dos resíduos de uva provenientes do processamento do Pisco. 2012. 224 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FRANCO, C. F. O. **EMEPA extrai do urucum o mais elevado teor de corante do Brasil**. 13 de julho de 2007. Disponível em: < http://www.paraiba.pb.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=24004&Itemi d=2>, Acesso em 09/05/2008. FRANCO, C.F.O.; FABRI, E.G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLLI, M.H.; HARDER, M.N.C.; RUCKER, N.C.A.; **Urucum**: Sistemas de produção para o Brasil. 1. ed. João Pessoa: EMEPA, APTA, 2008. 112 p.

FREGA, N.; MOZZON, M., BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography–mass spectrometry, **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 1723–1727, 1998.

HARDER, M.N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; COELHO, A.A.D.; SAVINO, V.J.M.; FRANCO, C.F.O. Cholesterol and iron availability in yolk of laying hens feed with annatto (*Bixa orellana*). **Animal**, v. 1, p. 477-482, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de Dados Agregados: Agricultura. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11&i=P> Acesso em 10 de março de 2012.

INTELLIGEN Inc., 1995. **SuperPro Designer-User's Guide**, Scotch Plains, New Jersey. Disponível em: http://www.intelligen.com/> Acesso em: 01/06/2007.

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

KWIATKOWSKI, J. R.; MCALOON, J. A.; TAYLOR, F.; JOHNSTON, J. B. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 288–296, 2006.

LEAL, P.F. Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor. 2008. 275 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LEAL, P.F.; KFOURI, M.B.; ALEXANDRE, F.C.; FAGUNDES, F.H.R.; PRADO, J.M.; TOAMAB, M.H.; MEIRELES, M.A.A. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 38–45, 2010.

LEAL, P. F.; MAIA, N. B.; CARMELLO, Q. A. C.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Sweet basil (Ocimum basilicum) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): global yields, chemical compositions, antioxidante activity, and estimation of the cost of manufacturing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 326-338, 2008.

LEAL, P.F.; TAKEUCHI, T.M.; MEIRELES, M.A.A. Comparison of two anethole sources (*Foeniculum vulgare* and *Crothon zethntneri*) in terms of supercritical extraction economical evaluation. In: I IBEROAMERICAN CONFERENCE ON SUPERCRITICAL FLUIDS, **I PROSCIBA**, 2007, Foz do Iguaçu, Brasil.

MEIRELES, M.A.A. Supercritical Extraction from Solid: Process Design Data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 321–330, 2003.

MEIRELES, M.A.A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, José (Org.). **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds**. Boca Raton: CDC Press – Taylor and Francis Group, 2008, 243-274.

NAVARRO-DIAZ, H.J. **Obtenção dos extratos de orégano andino via destilação por arraste a vapor e extração com dióxido de carbono supercrítico**: Estudo econômico e do processo. 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NAVARRO-DÍAZ, H.J.; CARVALHO, G.C.; LEAL, P.F.; PRADO, J.M.; MEIRELES, M.A.A. Obtaining of extracts from Origanum vulgare and Cordia verbenacea via supercritical technology and steam distillation: process and economical Study. In: 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2009, Arcachon, França.

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

PEARCE, B.C.; PARKER, R.A.; DEMON, M.E.; QURESHI, A.A.; WRIGHT, J.J.K. Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 3595-3606, 1992.

PEREIRA, C.G. Extração de alcalóides indólicos de *Tabernaemontana catharinensis* (DC.) com dióxido de carbono supercrítico + etanol. 2002. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PEREIRA, G.C.; MEIRELES, M.A.A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 407–413, 2007.

PEREIRA, G.C.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Extraction and isolation of indole alkaloids from Tabernaemontana catharinensis A.DC: Technical and economical analysis. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 232–238, 2007.

PEREIRA, C.G., MEIRELES, M.A.A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food Bioprocess Technol**, v. 3, p. 340-372, 2010.

PRADO, I.M. **Uso de simulador no estudo de aumento de escala e viabilidade econômica do processo de extração supercrítica de produtos naturais**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PRADO, I.M.; ALBUQUERQUE, C.L.C.; CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M.A.A. Use of a Commercial Process Simulator to Estimate the Cost of Manufacturing (COM) of Carotenoids Obtained Via Supercritical Technology from Palm and Buriti Trees. In: 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2009, Arcachon, França.

PRADO, J.M. **Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leito fixo**. 2010. 250 f. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PRADO, J.M.; ASSIS, A.R.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M.R.; MEIRELES, M.A.A. Manufacturing cost of supercritical-extracted oils and carotenoids from Amazonian plants. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 348-369, 2010.

PRADO, J.M.; DALMOLIN, I.A.L.; CARARETO, N.D.D.; BASSO, R.C.; MEIRELLES, A.J.A.; OLIVEIRA, J.V.; BATISTA, E.A.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 249–257, 2012.

PRADO, J. M.; LEAL, P. F.; MEIRELES, M. A. A. Comparison of manufacturing cost of thyme extract obtained by supercritical fluid extraction and steam distillation. In: 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2009, Arcachon, França.

PRADO, J.M.; PRADO, G.H.C.; MEIRELES, M.A.A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugar cane residue. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 231-237, 2011.

QUISPE-CONDORI, S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua, Cordia verbenacea, Ocimum selloi, Foeniculum vulgare.* 2005. 239 f. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

QUISPE-CONDORI, S.; SÁNCHEZ, D.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; ZETZL, C;BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 40-48, 2005.

QURESHI, A.A.; PEARCE, B.C.; NOR, R.M.; GAPOR, A.; PETERSON, D.M.; ELSON, C.E. Dietary α -tocopherol attenuates the impact of γ -tocotrienol on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in chickens. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 389-394, 1996.

REVERCHON, T.; TADDEO, R.; DELLA PORTA, G. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 8, p. 302-309, 1995.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Supercritical extraction of clove bud esssential oil: isolation and mathematical modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 3421-3428, 1997.

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

RIZVI, S. S. H., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A., DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, v. 40, n. 6, p. 55-65, 1986.

ROSA, P.T.V, MEIRELES, M.A.A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 235–240, 2005.

ROULF, S.A.; DOUGLAS, S.A.; MOO-YOUNG, M.; SCHARER J. M. Computer simulation for large scale bioprocess design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 229–234, 2001.

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

SETIANTO, W.B.; YOSHIKAWA, S.; SMITH JR, R.L.; INOMATA, H.; FLORUSSED, L.J.; PETERS, C.J. Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (Anacardium occidentale) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 203-210, 2009.

SILVA, G.F. **Extração de Pigmentos do Urucum com CO2 Supercrítico**. 1999. 208 f. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, G.F., GAMARRA, F.M.C., OLIVEIRA, A.L., CABRAL, F.A. Extraction of Bixin from Annatto Seeds using Supercritical Carbon Dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 2, p. 419-426, 2008.

SMITH JR., R.L.; MALALUAN, R.M.; SETIANTO, W.B.; INOMATA, H.; ARAI K. Separation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut Shell liquid with supercritical carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 1–7, 2003.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 35-52, 2005.

SOUSA, E.M.B.D.; CHIAVONE-FILHO, O.; MORENO, M.T.; SILVA, D.N.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A. Experimental resoults for the extraction of essencial oil from *Lippia sidoides* Cham. Using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 2, p. 229-241, 2002.

TAKEUCHI, T.M.; LEAL, P.F.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Impact of a Non-Ideal Flash Separation on the Economical Evaluation of Clove Bud Oil Obtaining via Supercritical Technology. In: IBEROAMERICAN CONFERENCE ON PHASE EQUILIBRIA

AND FLUID PROPERTIES FOR PROCESS DESIGN, **VII EQUIFASE**, 2006, Morélia, México.

TAKEUCHI, T.M.; LEAL, P.F.; ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. Study of the phase equilibrium formed inside the flash tank used at the separation step of a supercritical fluid extraction unit. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 447-459, 2008.

TAN, B. 14431 Holt Ave, Santa Ana, CA 92705, US. **Annatto extract compositions, including geranyl geraniols and methods of use**. A61K 36/185. US20080031985. 27 agosto 2007, 7 fevereiro 2008. United States Patent and Trademark Office – USPTO.

TAN, B. Appropriate spectrum vitamin E and new perspectives on desmethyl tocopherols and tocotrienols, **Journal American Nutraceutical Association**, v. 8, p. 35–42, 2005.

TAN, B. 49 North Hampton Road, Amherst, MA 01002, US; FOLEY, J. 196 Triangle Street, Amherst, MA 01002, US; AMERICAN RIVER NUTRITION INC. 31 Campus Plaza Road, Hadley, MA 01035, US. **Tocotrienols and geranylgeraniol from Bixaorellana byproducts**. C07D 311/72 C07C 29/80 33/02. US6350453. 24 maio 2000, 26 fevereiro 2002. United States Patent and Trademark Office – USPTO.

TURTON, R.; BAILIE, R.C.; WHITING, W.B.; SHAEIWITZ, J.A. **Analysis, synthesis and design of chemical processes**. 2. ed. New Jersey, EUA: Prentice Hall, 2003. 977 p.

UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon cioxide extractiona of red pepper (Capsicum annuum L.) oleoresin. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 55-66, 2004.

VASCONCELLOS, C.M.C. Extração Supercrítica de Óleos Voláteis de Achyrocline satureioides (Macela) e Vetiveria zizanioides (Vetiver): Determinação da Cinética de Extração e Estimativa de Custos de Manufatura. 2007. 102 f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração:** estudo experimental e simulação dos processos. 2009. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VEGGI, P.C.; PRADO, I.M.; VAZ, N.; PRADO, J.M.; MEIRELES, M.A.A. Manufacturing cost of extracts from jackfruit (Astocarpus heterophyllus) leaves obtained via supercritical technology and solvent extraction. In: 9th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUPERCRITICAL FLUIDS, 2009, Arcachon, França.

WIKIPÉDIA **Bixina**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Bixina>. Acesso em: 27 de outubro de 2012a.

WIKIPÉDIA **Tocotrienol.** Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Tocotrienol. Acesso em: 27 de outubro de 2012b.

WIKIPÉDIA **Tocopherol.** Disponível em: < http://en.wikipedia.org/wiki/Tocopherol>. Acesso em: 27 de outubro de 2012c.

CAPÍTULO 2 – TRENDS IN ANNATO AGROINDUSTRY: BIXIN PROCESSING TECHNOLOGIES AND MARKET

Carolina L. C. Albuquerque and M. Angela A. Meireles.

Artigo publicado em Recents Patents on Engineering, 5, 94–102, 2011.

ISSN: 1872-2121. DOI: 102174/187221211796320738

AVISO DE DIREITO DE AUTOR

Este artigo é de propriedade da Bentham Science Publishers Ltda. Você pode baixar cópia do mesmo em um único computador, para fins pessoais ou não comerciais de uso temporário, levando em conta os direitos de autor e outros avisos da marca. No entanto, nenhum conteúdo do artigo baixado pode ser copiado, reproduzido, distribuído, republicado ou postado. Também é proibida a modificação do conteúdo do artigo para qualquer propósito, o que constitui uma violação dos direitos autorais da Bentham Science Publishers Ltda e/ou seus fornecedores.
Recent Patents on Engineering 2011, 5, 94-102

Trends in Annatto Agroindustry: *Bixin* Processing Technologies and Market

C.L.C. Albuquerque and M.A.A. Meireles

LASEFI (Laboratory of Supercritical Technology: Extraction, Fractionation, and Identification of Vegetable Extract)/DEA/FEA (School of Food Engineering)/UNICAMP (University of Campinas), Rua Monteiro Lobato, 80, Cid. Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas, SP, Brazil

Received: April, 13, 2011 Revised: May 04, 2011 Accepted: May 14, 2011

Abstract: This paper presents an overview of the annatto agro industry by reviewing publications related to colorant technology production, the market, and the worldwide intellectual property protection. The aim was to identify solutions, technological advances and trends by observing the research and development activities and publication of patents in this area. In the last decade, the demand of annatto use in the food, cosmetics and pharmaceutical industries increased. Advances in technology are observed throughout the production chain, such as improvements in raw material production, seed characteristics, colorant manufacturing processes and colorant formulations with the extract; socioeconomic benefits for the production regions are also observed.

Keywords: Bixa orellana L, colorant, market, production chain, technological aspects, technological development, trade.

INTRODUCTION

Until the mid-19th century, the animal and plant kingdoms provided colorants for dyeing textiles, for preparing cosmetics, and for making foodstuffs more attractive. After the discovery of ways to synthesize the natural colorants, they were gradually replaced in food and cosmetics. The success of replacing natural by synthetic colorants resulted from a variety of factors: the comparatively low cost, reliability of supply, consistency of quality and the attributes of great color resistance in textiles as well as a greater stability in food [1].

Over the years, several studies have indicated problems related to allergies and other health hazards, such as insomnia, anemia, hyperthyroidism and kidney disease, caused by the ingestion of synthetic colorants, which are banned by most countries in jellies, confectionery, powders, ice cream toppings and cookies [2]. Moreover, consumers are concerned about possible health risks associated with synthetic food additives [1, 3]. These issues have presented a favorable opportunity for the natural products sector.

In 1995, the *Food and Agriculture Organization* of the United Nations (FAO) noted that annatto market trends in developed countries were showing increased importation in the extract form and that there were strict requirements for seed quality with regard to the concentration of bixin. FAO also noted investment trends in annatto seed processing facilities by producers without a colorant extraction household unit because of the expansion of the food industries in deve-

1872-2121/11 \$100.00+.00

loping countries with a resulting increase in the demand for seeds [1].

The aim of this study was to identify solutions, technological advances and trends by observing the latest research and development activities and the publication of patents in the annatto agroindustry. Evaluation of the newest technology can prevent the duplication of effort and investments in research and development. In addition, periodic updates about the changes in certain industries can strongly influence the markets.

Because, several articles can be found in literature discussing and summarizing the analytical aspects related to the annatto pigments chemistry [4-10], this issue will not be addressed in this review.

ORIGIN AND CHARACTERISTICS

The annatto tree is native to Central and South America, but it is also grown in Africa and Asia. Although the annatto seed is harvested in many tropical countries including Bolivia, Ecuador, Jamaica, the Dominican Republic, East and West Africa (Kenya), India and the Philippines, the main producers are in Brazil and Peru [11].

In Brazil and in other South America countries, annatto is used as a spice and seasoning in traditional cooking, and its seeds are often sold as a mixture with other ingredients to be added to soups and meat dishes [11]. In Europe and North America, annatto seeds and annatto extracts have been used for two hundred years to add color to food, especially to dairy products such as cheese. Currently, annatto is the most used natural colorant in the food industry [11].

The annatto colorant is obtained from the outer layer of the seeds from the Urucuzeiro tropical tree (*Bixa orellana* L.). The fruits of the Urucuzeiro consist of a pod covered with fleshy spines that varies in size and shape, with ten to

© 2011 Bentham Science Publishers

^{*}Address correspondence to this author at the LASEFI (Laboratory of Supercritical Technology: Extraction, Fractionation, and Identification of Vegetable Extract)/DEA/FEA (School of Food Engineering)/UNICAMP (University of Campinas), Rua Monteiro Lobato, 80, Cid. Universitária Zeferino Vaz, 13083-862, Campinas, SP, Brazil; Tel: +55.19.3521.4033; Cell: +55.19.8111.9474; Fax: +55.19.3521.4027; E-mail: meireles@fea.unicamp.br

Trends in Annatto Agroindustry

fifty small seeds [11]. A well-developed fruit may have up to seventy annatto seeds [12]. These seeds are covered with a resin coating of color ranging from orange to red; the resin coating is where the commercial pigment is extracted from [11].

The main colorant component in annatto is bixin. Bixin is primarily present as *cis*-bixin; nonetheless, *trans*-bixin, *trans*-norbixin and *cis*-norbixin [11] are also present. *cis*bixin is soluble in several organic solvents and provides an orange color, but it is largely insoluble in vegetable oil. Because of its instability, *cis*-bixin can be easily converted to the *trans* isomer, which is the most stable form that has properties similar to the *cis* form; the *trans* isomer also exhibits a red color in solution, and it is soluble in vegetable oil. Under specific conditions of temperature and pH, bixin can be converted to the water-soluble *cis*-norbixin, i.e., the dicarboxylic acid that is soluble in polar solvents and provides an orange color [9].

Because of the increasing demand for natural colorants. strict specifications are imposed on the carotenoids present in the food colorant annatto, especially with respect to their chemistry and biochemistry. Between 1996 and 1999, studies were published on the discovery of new minor carotenoids called apocarotenoids that were isolated in trace amounts from the annatto seed coat by chromatography techniques; further separation was performed on a flash column, and the final isolation was applied to thin-layer chromatography (TLC). The final purification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The structure of the compounds was established by spectroscopic methods (ultraviolet-visible and NMR spectroscopy, as well as mass spectrometry). According to the authors, the structural elucidation of the carotenoids present in the annatto leads to a better comprehension of the biosynthesis of bixin, which should be considered the main pigment in annatto [13-16]. Thus, the biosynthetic pathway of bixin was proposed [17] and described [18]. The technique consists of the inclusion of three genes that govern bixin biosynthesis into Escherichia coli that are thus engineered for lycopene-induced bixin synthesis and present an alternative for expanding the supply of bixin [17].

The total pigment content in the pericarp of the seed consists of approximately 80% bixin, can vary between the same production area and can depend on the variety and environmental conditions of the producing region [1, 12]. Until 1995, the better-quality seeds in the world market contained more than 3% bixin; however, there were also producers with seeds that contained only 2% bixin [1]. In 2003, the bixin content of the seeds in Brazil reached 5% in the state of São Paulo vs. a 3.5% national average [2]. Currently, the bixin content can vary from 1% to 6% [12].

The crude seeds have the following typical composition: 40-45% cellulose; 3.5% to 5.5% sugar; 0.3% to 0.9% essential (volatile) oil; 3% fixed oil (lipids); 1% to 4-5% pigment; and 13-16% protein, alpha and beta carotene, tannins and saponins. In addition, an emphasis is placed on the high concentration of delta tocotrienol, which is higher than the levels normally found in other plant species (140-147 mg/100 g in dry hexane extract) [3].

TECHNOLOGICAL ASPECTS

Production and Processing of Seeds

The annatto begins the production of seeds at 3 years of age with a peak in the yield between 4 and 5 years of age; a good yield is obtained for up to 12 years and then it declines after 20 years. The production varies considerably with weather conditions [1, 19]. The average productivity of annatto seeds can reach up to 900 kg per hectare, depending on the variety, growing conditions and soil management [19, 20].

According to Iqbal [20], the average annual world production ranged from 10,000 to 11,000 tons of seed, of which 60.2% was from Latin America, 27.4% from Africa and 12.4% from Asia. Peru was the largest producer [1, 20], with 32% of the world market and seeds that were exported all over the world, followed by Kenya, where the production was almost entirely exported to Japan, and Brazil, where most of the production was consumed locally [19].

According to the FAO [11], the amount of annatto seeds harvested annually in producing countries was estimated to be 14,500 tons up until 1999. Approximately 7,500 tons were used as food coloring all over the world. The remaining 7,000 tons were consumed locally in Brazil, Peru and Ecuador primarily as a seasoning/ condiment [11] called *colorau*, which consists of a mixture of annatto colorant (or ground seed), corn or cassava flours, vegetable oil and salt [21].

From 2000 to 2009, there was an increase in the production and cultivated area in Brazil, with average rates of 2.7% and 2.8%, respectively. In 2003, Brazil had approximately 6,000 hectares of plantations [2]. In 2009, the cultivated area occupied 11,707 hectares, and its production reached 12,472 tons. The main producing regions are in the North, Northeast and Southeast of Brazil with 5,310, 3,507 and 2,187 tons, respectively, produced in 2009 [22].

In Brazil, annatto is an economically important plant, and it is grown in all Brazilian regions; however, the Western region of São Paulo is the main annatto producer in the world [23], followed by the Northeast region, with approximately 48% of the national production [24]. Currently, the state of Rondônia located in Northern Brazil is the world's main producer [25]. The annatto cultivation occurs primarily as a family farming activity that fulfills an important socioeconomic role in the largest producing regions; in addition, more than 78% of the areas are in the Northern and Northeastern regions [26] and more than 80% of the areas are in the São Paulo State [23].

The annatto seed processing begins at the moment following the harvest and is of great importance due to the direct influence on the quality of the final product. It comprises the steps of gathering the fruit in the field; pre-drying the fruits; withdrawing the pods; screening; and seed drying, packaging, storage, grading and marketing [12]. All steps are critical to avoid the loss of quality and quantity of bixin; therefore, the steps must be properly executed.

The harvest of pods is performed manually with a knife or pruning shears [1], and after the fruits are gathered from the field, the pods should be dried to reduce moisture and

96 Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2

facilitate the withdrawal and sieving because higher humidity results in a greater loss of bixin during storage [12]. Drying can be performed in the sun or by using artificial dryers to accelerate the process at peak harvest or during wet periods to prevent mildew and the germination of seeds [1].

The withdrawal of pods is performed outdoors by beating the seeds with sticks or by mechanical removal [1, 11, 12]; foreign material is removed by sieving or ventilation [1]. Although these operations cause a loss of bixin, the friction created by the sticks causes more significant bixin loss than the mechanical method of removal or the friction caused by sieving [12].

The seeds can be dried in direct sunlight or in artificial dryers with forced ventilation, but bixin will be lost by exposure to sunlight and oxygen [12]; artificial dryers provide a smaller loss of bixin when a maximum temperature of 60 $^{\circ}$ C is adopted to avoid excessive drying [1] and consequent thermal degradation.

The packaging and storage should be performed in wellventilated places with little light incidence because bixin losses are directly proportional to storage time [12]. The identity and quality characteristics of the seeds are determined by classification standards; moisture should be equal or less than 14% and bixin content larger than 1.8% [12].

Colorant Production Processes

Industrially, the spice or *colorau* production occurs by three distinct processes. Two of these processes consist of the annatto seeds being mixed with vegetable oil and then heated (or not) in a blender for a sufficient period of time to allow the partial migration of the pigments into the oil. Then, corn seeds and salt can be added to the mix and subsequently milled and sieved for homogenization, or corn flour and salt are mixed until the colorant is transferred to the flour and sieved to separate the exhausted seeds. The third process consists of a corn flour and salt mixture with the colorant already extracted from annatto seeds dissolved in the vegetable oil [21].

The proportion of oil in the seed is usually 1:10 but can vary depending on the amount of pigment in the seeds. In addition, the proportion of annatto seeds and corn flour required to obtain the desired color of the spice varies, but it generally consists of a ratio of 1:3 to 1:5. The third process allows for better quality control of the spice because it does not depend on the annatto seed quality [21].

For the extract production, annatto seeds can be processed in two fundamentally different ways that are already used industrially: one is by mechanical abrasion using a suitable suspending agent (e.g., vegetable oil, aqueous potassium or sodium hydroxide), followed by removal of the seed (sieving). The other is by extraction with one or more organic solvents, which is also used as a means of producing annatto concentrates (i.e., the extracts) [11, 24]. The annatto seeds are not milled because the bixin is found on the seed surface [11, 27].

The traditional process of obtaining the annatto colorant consists of the extraction with vegetable oil. The seed extrac-

tion is performed at high temperatures (approximately 70 °C), and then the extract is separated from the seeds by sieving [11, 27]. Industrially, machines that promote the scraping of the seed surface or friction between them are used in the extraction step to mechanically remove the colorant [11, 27]. However, this process results in low productivity that is primarily caused by the shape of the seeds, which have crevices that are difficult to reach mechanically [27], and the limited solubility of bixin in oil [11]. An alternative is the addition of ethanol to the extraction step. Ethanol dissolves the resin that binds the pigment to the grain and reduces the vegetable oil density; this facilitates the penetration into the seed crevices and thereby increases the concentration of colorant. After the extraction, ethanol can be recovered by heating the extract at 110 degrees Celsius [27]. After the extraction and separation step, the extracts are cooled, filtered, packaged and sold [27].

The result from this process is a solution that may contain bixin and/ or norbixin [1, 27] as well as its degradation products (e.g., *trans*-bixin) at high concentrations, but the extract has a greater stability under light and heat, providing a more yellow hue with a minimum colorant concentration of 10% [9, 11, 27].

The extraction with organic solvents provides the bixin crystals. The process consists of extracting the seeds and shaking or simply washing them with an organic solvent to release the pigments. The extract is sieved to separate the grains, which are returned to the extraction process. At the end of the process, the total extract is filtered, dried and then milled [27]. Specific processes are used for the separation of fats and waxes, the crystallization of bixin, and the drying of the extract [11].

The extract typically contains a high bixin concentration that reaches values above 30%, depending on the seed quality. The predominant pigment is the *cis*-bixin, which has a lower solubility in oil than its *trans* form [27]. Microcrystalline bixin products with 80% to 97% purity have also been developed in response to the need for more concentrated annatto extracts [11]. They can be sold in their pure form or they can be processed by the colorant manufacturers according to specific applications [11], such as suspensions in oil or the preparation of water-soluble norbixin salts [1, 11].

Extraction with alkaline solutions is a more commonly utilized process to obtain the colorant from annatto seeds. The process consists of the mechanical abrasion provided by maceration or shaking of the seeds with aqueous alkali, usually potassium or sodium hydroxide [11, 27]. This process is known to transform bixin (as an ester) into a diacid salt 'norbixate', allowing it to be dissolved in water [9, 27]. However, the conversion of bixin to norbixin can be controlled by the alkali concentration and temperature of the extraction, which allows the removal of seed pigments without the total conversion of bixin to norbixin [27]. After the extraction step, the resulting suspension is filtered, and the extract can be dried or acidified to pH values below 6 (e.g., with sulfuric acid) to precipitate the bixin or norbixin. The precipitate is filtered, resulting in a paste that can be stored under refrigeration or dried and then ground to obtain a granular powder [1, 11, 27].

Albuquerque and Meireles

Trends in Annatto Agroindustry

The salt norbixin can be obtained in three ways: a) by extraction with a strongly alkaline solution at high temperatures (approximately 70 °C), after which it is dried and crushed into a powder with a color content between 1-15%; b) by acid-precipitation, where the product can then be filtered, dried and crushed into a granular powder with a concentration between 25% and 50% [11] to produce an extract that can be further processed in different formulations [27]; or c) by treatment with dried bixin crystals obtained by other extraction technologies [1, 11]. The extract containing approximately 25% *cis*-bixin can be obtained by extraction with cold aqueous alkali [1, 11]; subsequently, it can be processed in a variety of oil-soluble formulations by dissolving or suspending it in oil [11].

One process implemented in the seed production unit is to obtain a crude extract by soaking the seeds in hot water and then filtering and concentrating them into a paste [1]. The process consists of extracting the seeds by mechanical abrasion in hot water or extracting the seeds in hot water by friction. Subsequently, the seeds are separated by sieving and returned to the extraction process until they are almost exhausted of colorant. The colorant is separated from the aqueous extract by centrifugation or filtration and is cooled or dried for sale. [27]; the processed extracts primarily consist of *cis*-bixin.

Another process option that is performed on the laboratory scale is the supercritical fluid extraction (SFE) of bixin. The SFE process begins when the solvent in the supercritical state is fed into the extractor and is distributed throughout the fixed bed formed by a solid substrate. During the extraction, the solvent dissolves the soluble compounds, and then the mixture of solute and solvent is separated into flash tanks by a rapid reduction in pressure and/ or increase in temperature. The solvent is cooled, re-pressurized and returned to the extractor [28].

SFE studies of annatto seeds have been performed. The authors noted that the SFE-extraction was more selective for bixin than for some terpenoids as compared to some organic solvents [29]. In addition, the seed oil and the co-solvent acted as an auxiliary in the colorant extraction [30-32], and the colorant yield did not increase when grinding the seeds [29, 32]; however, the process was not selective enough to obtain enriched fractions of bixin [33]. The recent patent PI 0605425-0 [33] protects a supercritical extraction process of annatto pigments and the purification in a series through a fractionator (adsorption column), with CO_2 as the solvent. The novelty is the introduction of the fractionator in a series to obtain rich fractions of bixin. The process consists of the extraction of soluble compounds from an extractor and the fractionation of these compounds by adsorption in the hydrophilic material. Subsequently, the rich bixin extract is collected in a room that is pressure and temperature controlled. Norbixin can then be recovered by the addition of a co-solvent and changing of the pressure and temperature conditions, thereby enhancing the extraction of this hydrophilic pigment. The flash tank can have trap systems to recover volatiles compounds, if they exist. The process can be continuous or semi-continuous, depending on the number of extractors and fractionators in a series, and it can be operated with or without a co-solvent.

Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2 97

Currently available industrial processes of bixin extraction often have deficiencies in terms of selectivity and the level of compound purity with respect to the generation of waste solvents and various subsequent unit operations, such as decantation, centrifugation, the removal of solvent, and drying, which result in a high energy cost to produce small quantities of colorant [24, 33]. In addition, conventional solvent extractions typically involve a large amount of solvent per mass unit of active product [33]. Furthermore, the toxicity of the solvents used, the compound degradation and the process selectivity are the primary points that should be considered in a manufacturing process [28]. The SFE process has the advantage of extracting bixin without the pretreatment of seeds and can be used under median temperatures; in addition, its use can prevent the problems encountered with conventional processes of solvent extraction, such as high energy costs, environmental concerns, toxicity, and the generation/ retrieval of large quantities of solvent waste [29]. The SFE process has been associated with innovative products, such as new food ingredients that are not comparable to those obtained by conventional extraction methods with solvents or by distillation [34].

Technological Function, Composition and Applications

According to the FAO [1], natural colorants are used to give color to food, and natural dyes are used to impart color to textiles and other non-food products. In addition, the FAO [11] states that the oil-soluble colorant is bixin dissolved or suspended in oil, whereas the water-soluble colorant consists of the dissociated form of norbixin in an alkaline solution.

Depending on the hue required for the product and the need for the colorant to be soluble in oil or water, the formulations are produced as oil-soluble and/ or water-soluble; thus, they are marketed as solutions, suspensions, emulsions and powders after the standardization of the colorant content. The chemical structure of the colorant obtained in each extraction process determines the hue in the final product [11].

Many natural colorants have not been well suited for use in water-based food systems; thus, they have primarily been used in hydrophobic environments and in a limited number of water-based foods. This limitation has been the major obstacle for industries. Bixin is used in food industry sectors (e.g., in the production of margarine, butter, cheese, yogurt, sausages, ice cream, beverages and sweets) and medical and pharmaceutical industries (e.g., for breast cancer detection, healing ointments, remedies for fever, and the reduction of cholesterol and triglyceride levels) and cosmetics (e.g., lipsticks, nail polish, shampoo, conditioners, and suntan and hair dyes) [26].

The oil-soluble annatto consists of bixin that is dissolved or suspended in oil; the solution typically consists of 0.05 to 1% bixin, and the suspension contains 0.1 to 8% of bixin. The advantages of suspensions consisting of strong colors include the economic factors and better storage stability [11]. Oil-soluble annatto colorant is generally used for coloring foods with a high fat content, such as processed cheeses and margarines, bakery products, biscuits fillings, snacks, sauces and creamy desserts [1, 11].

98 Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2

Water-soluble annatto consists of norbixin, potassium or sodium salt and is commercially available as in diluted liquid solutions (0.1% to 4.0% at high pH) [11] and powder (1% to higher than 20%) [27]. This colorant is not acid-proof and precipitates at pH values below 7. Thus, it is not normally used in acidic solutions (e.g., clear soft drinks without pulp), but it is suitable in acidic foodstuffs with matrix or solid structures (i.e., where it is absorbed by proteins and/ or starches). These features are valuable for the use of this composition in products such as cheese and breakfast cereals [11].

The use of water-soluble colorant has increased considerably in industries beyond the traditional dairy industries. Applications can be extended to cheese, breakfast cereals, cakes, drinks, snacks, ice cream, sausage packaging, puddings, chocolate fillings, smoked fish, soups, sauces, pickles, confectionery and animal feed. Water-soluble annatto colorant is also available in a powdered form, and applications can therefore be extended to powdered products [1, 11]. Many food products have an aqueous phase with a pH value below 7. In many cases, this acidic environment can cause the precipitation of the unstable pigment, resulting in a change of the color hue [35].

The patent US7229490 [35] provides ready-to-use water dispersible compositions containing natural hydrophilic, water-insoluble pigments that are useful for the coloring of edible and pharmaceutical products; these compositions do not migrate in the products and they are acid-proof. One of the compositions of this invention is composed of norbixin in the form of particles obtained by acid precipitation of the norbixin alkaline solution, and it is dispersed in an aqueous phase to generate a hydrocolloid that contains a carbohydrate. These components are mixed to obtain a composition with a pH value of 7 (at most) and at least 5% water (by weight); the mixing can be optionally followed by comminution to obtain discrete pigment bodies (no greater in size than 10×10^{-6} m). Subsequently, the composition may be dried to obtain a material containing less than 5% water (by weight).

According to the description of the invention, the advantage of this composition is that it does not give rise to migration problems, as is the case with powdered products; the composition does not contain undesirable additives, and the colorant does not precipitate, separate or accumulate on surfaces or change its color hue at low pH values (acid-proof). The non-powdered forms are more readily dispersed in aqueous systems, their manufacturing does not include a drying step, which implies a low-cost process, and the pigments are not damaged by heat and oxygen. This composition is suitable for the coloring of liquid food products, such as soft drinks, carbonated beverages and milk products [35].

Emulsified annatto colorant contains bixin and/ or norbixin in combination with an emulsifier, which allows the colorant to be miscible in both oil and water and to be used in products containing both phases. Depending on the emulsifier, the acid stability of water-soluble bixin/ norbixin can be improved. These products are usually sold in the liquid form with a concentration below 3% (ranging from 1 to 2.5% bixin/ norbixin) [11, 27]. Emulsified annatto colorants are often used in products such as processed cheese, ice cream, soups, bakery and dairy products [11]. The acidstable, emulsified material can be used in juices, liquors, jams and dessert gelatin [11].

MARKET

The demand for annatto colorants from the food industry has increased since the 1980s because of the prohibition of synthetic colorants and also because of consumer preference for natural products [1]. The exported product has been shipped to markets of developed countries, where annatto extracts have been used as a natural colorant in the food and cosmetics industries [1].

Currently, the predominant markets of annatto are in the US, Western Europe and Japan, although there is a significant trade of seeds among suppliers in South and Central America, where annatto is used as a colorant and as a condiment in foods [1, 11].

Annatto comprises 90% of all natural colorants consumed in Brazil and approximately 70% of the whole share of natural colorants consumed in the world [22]; usually, the price of annatto seeds is determined by the bixin content. According to the FAO [1], in the middle of the 1980s there was a scarcity of annatto in Peru because of low productivity levels and a high local demand for the extract producers. At that time, there was a huge increase in the price of annatto seeds, which reached \$2,300 USD per ton in 1987. Encouraged by high prices and the augmented demand for annatto worldwide, farmers started to grow annatto; as a consequence, the great production of seeds resulted in falling prices. In 1992, the UK paid \$800 to \$1,000 USD per ton of seed with 3% bixin content [1]. In January of 1993, according to the International Trade Commerce (cited by Iqbal [19]), the market price of Peruvian annatto was \$700 USD per ton, whereas Brazilian annatto was sold at \$450 USD per ton. The justification for the lower prices of Brazilian seeds was the excess of production during the high price seasons, which caused overproduction (and lower prices). Also, there was a lack of support from research and development groups that resulted in Brazil cultivating annatto varieties with a bixin content of 2.7% when markets demanded 2.7% to 3.7% bixin.

Although annatto was produced in many developing countries, less than a third (approximately 27%) was locally industrialized because most processing factories were located in Peru, Kenya and Brazil [19]. According to the FAO [1], acceptance from the major buyers and the increase of trade from locally produced extracts began to flourish in 1980. Previously, all imports were related to seeds and not to the extracts [1]. Extraction of the bixin before exportation began in the early 1990s, and extracts consisted of more than half of all annual production. Multinational corporations from the main markets of Peru, the US and Western Europe established annatto processing factories in Lima to foster the integration of production and trade. Subsequently, the extracts were shipped to multinational food industries abroad [1]. Conversely, most of the Brazilian production was sold to local markets, which used thousands of tons of annatto primarily as a condiment rather than as a colorant [1]. Currently, approximately 60% of annatto seeds harvested in Brazil are used to produce the colorant (colorau) [21].

Trends in Annatto Agroindustry

According to the International Trade Centre statistics (cited by Iqbal [19]), world imports of annatto extracts increased four times as much as annatto seed imports did between 1988 and 1992. During the same period, Japan increased its consumption by 4 tons, and the European Economic Community used approximately 2 tons of seed and up to 650 tons of the extracts. Usually, annatto extracts traded in the market are either crude, in the powdered form, in a water-soluble paste (20% to 40% norbixin), in a solution in oil or concentrated or purified bixin. In 1988, prices were \$1,500 USD per ton of seed, \$30,000 USD per ton of extract with 30% bixin content, and \$107,000 USD per ton of bixin crystals [1].

In 2003, the Brazilian market paid \$0.17 USD per percent of bixin or \$0.50 USD per kilogram of seed to producers [2]; in 2008, the price increased to \$0.48 USD per percent of bixin or \$1.91 USD per kilogram of seed [36]. Currently, prices are similar (i.e., \$0.48 USD per percent of bixin and \$1.93 USD per kilogram of seed). Assuming an average of 4% colorant and an annual production of 12,472 tons of seed in Brazil, the total amount of bixin available for extraction would be 500 tons.

TECHNOLOGICAL ADVANCES AND PERSPEC-TIVES

As a result of restrictive laws and prohibitions towards synthetic dyes in importing countries as well as the competitive advantages of synthetic compounds, such as the greater stability, higher dyeing capacity and lower cost, food additive industries and research centers have invested in research and development to transform natural colorants to be more stable under light and heat, to find new applications and to overcome problems of extract supply [2].

Considering the need of a constant and better supply for the leading manufacturers of dyes in Brazil, there was a migration of the best harvests from the North and Northeast, where the best seeds were located, to the Southeast of Brazil that reduced transport costs and allowed manufactures to buy seeds with higher content of bixin [2]. Thus, the Southeast, primarily São Paulo, began to produce the best annatto in the country, which contained up to 5% bixin in contrast to the national average of 3.5% [22]. Currently, farmers with large areas cultivated with other crops are shifting their production to annatto because of the new expectations of annatto being sold as an extract and also as a source of natural antioxidants.

With respect to the current advances in the process of extraction, three main extraction processes can be unified into a single alkaline extraction for water-soluble colorants; starting from the extract, the oil-soluble concentrate can be obtained by mixing it with vegetable oil and/ or blends with other dyes [2]. Such a process can also generate a semi-processed colorant that is locally concentrated and replaces the crude seed trade, thereby facilitating the storage, transport and marketing [27].

SFE technology is a rapid, efficient and clean process to extract natural products from vegetable matrices, and it can be used industrially for colorant extraction because the process obtains products without toxic waste, with no degradation of the active component and with high purity; these

Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2 99

products are suitable for use in the pharmaceutical, cosmetic and food industries [28, 31]. The process uses CO_2 as the solvent, which is non-toxic, inert, low in cost and does not generate organic solvent residue [33]. The colorant production using the SFE process provides a byproduct-free seed that can be exploited commercially.

New applications and improvement of the stability under light and heat (e.g., the development of an acid-proof formulation [35] for carbonated beverages and juices) have emerged, where the only previous alternative was using the synthetic colorants previously mentioned; another technological accomplishment was the development of packaging barriers against light, heat, oxygen and microorganisms to protect the colorant in products with higher added value (e.g., milk) and increase the shelf life of the product [2]. The encapsulation of the colorant provided a water-soluble emulsion and increased use of this colorant in other products. A novel method (patent US20100112073 [37]) was used to encapsulate natural colorants in a stable manner within polymeric nanoparticles as an effective way to improve the dispersion in water and to produce a homogeneous color without altering a food's consistency and taste. The claims state that the nanoparticles are composed of a hydrophobic (non-polar, water-insoluble) core dissolved in an organic solvent, which are mixed into an aqueous phase containing a surfactant (intermediate layer) to form an emulsion. The emulsion is mixed with a polymeric solution (outer layer) in the presence of a cross-linking agent. The final product is completely water-soluble and stable with no phase separation, precipitation or color change after several weeks, depending on the nanoparticle size and the solvent used [37].

The disadvantage of this method is the use of organic solvents to dissolve the nonpolar compounds. Although the inventors stated that the solvent is completely eliminated from the final product, studies have shown that it is not possible to remove the solvent completely.

The byproduct solutions from the annatto extraction, which consist of the oily phase obtained from the processes with alkaline water or organic solvent that are generally discarded, contain tocotrienols and geranylgeraniol. Tocotrienols have been associated with hypocholesterolemic effects and are believed to be useful in the treatment of cardiovascular disease and cancer. Tocotrienols have several sources, e.g., in rice bran, soybean, sesame and palm oils. However, each source of this tocol generally contains more than a single tocol, including tocopherols. For example, rice bran and palm oils generally have both tocotrienols and tocopherols; in addition, alpha-tocopherol has been reported to attenuate certain effects of tocotrienols, such as the cholesterol suppressive activity of gamma-tocotrienol. Furthermore, tocotrienols and tocopherols are difficult to separate because of their structural similarities. Geranylgeraniols occur naturally in linseed oil, cedrela toona wood and the tomato fruit. Potential uses for geranylgeraniols include the synthesis of tocotrienols. Geranylgeraniols have also been employed in the treatment of elevated blood cholesterol and are suspected to be useful for the treatment of human prostate cancer. The separation of geranylgeraniol from terpenoid compounds can be difficult due to their similar structures [38].

100 Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2

Patent US6350453 [38] describes a method used to form to cotrienol and geranylgeraniol compositions. The method utilizes the evaporation of water or organic solvent from the annatto extraction byproduct to form a tocotrienol composition. The distillation steps can be conducted to separate the geranylgeraniol composition from the tocotrienol to form a geranylgeraniol distillate with a concentration of approximately 40 – 80% (weight). Furthermore, distillation steps can be performed to obtain the tocotrienol distillate from the tocotrienol composition with a concentration of approximately 20-90% (weight). The tocotrienols and geranylgeraniol are distilled in suitable evaporators in at least one operation.

This method provides a very high concentration of deltatocotrienol, i.e., up to 700 times greater than other sources, such as rice bran and palm oil, as well as free alphatocopherol, which is an advantage because the separation step from the tocopherols is not required.

Patent US20080031985 [39] relates to the composition and use of the annatto seed extract containing nonsaponifiable terpenoids, geranylgeraniols and tocotrienols. Among the various compositions, a composition of the annatto extract containing geranylgeraniols inhibits cancer growth; causes a decrease in triglycerides in humans; and reverses insulin resistance, metabolic syndrome, prediabetes, diabetes and/ or diabetes-related cardiovascular diseases. Another annatto extract composition containing tocotrienols free of tocopherols decreases triglycerides.

Compared to synthetic colorants, the higher cost of formulations based on natural colorants is still an important barrier in the market; however, new applications of natural technologies are emerging in markets that are able to add value and provide excellent chances of return, justifying an average annual growth in consumption between 5% and 9% [2]. Taking into account the demand for foods without synthetic additives, which are more attractive to consumers, the annatto colorant presents the advantages of high added value and natural origin. Recent studies have presented the functional properties of the annatto colorant. Annatto extracts obtained with different solvents in an ultrasonic bath and at room temperature showed a correlation between antioxidant and colorant concentration, and the authors concluded that solvents with medium polarity, particularly methanol, should be used to obtain an extract with good free radical scavenging capacity and color properties [40]. In another study, norbixin maintained its oxidative stability when it replaced sodium erythorbate, which is a synthetic additive used as an antioxidant in sausage formulations, and it was one of the most efficient antioxidant additives among the natural pigments tested (lycopene, zeaxanthin and b-carotene) [41]. The antioxidant activity is related to some beneficial actions, such as anticancer activity that was verified in organic extracts of annatto seeds. The authors concluded that the cisbixin was contributed to the promising anticancer activity in organic extracts of annatto seeds and also exerted cytotoxic effects. Because of the impressive ex vivo selectivity of antimyeloma activity in samples from myeloma patients and against resistance in highly drug-resistant myeloma cell lines, further studies of cis-bixin as an anticancer therapeutic candidate are warranted [42]. Thus, new applications should Albuquerque and Meireles

be explored for the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

To increase the competitiveness of Brazilian annatto producers, bixin processing units in local cultures should be built to reduce the seed transportation volume by more than 50%, accelerate the production chain and increase the income of farmers, who would otherwise sell the extract to colorant manufacturers [2, 27].

TECHNOLOGY DEVELOPMENT

A possible way to verify the technological development of a particular technology is to review publications and patent applications in the area, which are excellent indicators of innovation; they might be useful to measure the effects of research and development (R&D) on the productivity, structure and development of a given technology or specific industry [43]. An accurate measurement is difficult to obtain, but an estimate can be obtained through the observation of the numbers of publications returned from a search.

To analyze the technological development of annatto, we used the ISI Web of KnowledgeSM research platform because it allowed us to use a greater number of keywords, tags, and combinations to search for articles indexed since 1900 as well as over ten million inventions and twenty million patents since 1963. Our search for articles in journals was performed using the Web of Science® database that restricts searches to certain fields (i.e., the title, summary, keywords, author and Keywords Plus[®], which is an index of words that occur frequently in the titles of references for a given article). The search for patents was conducted using the database and Derwent Innovations Index, which restricts the search to the title and abstract fields within a record of a patent. The period of publications chosen was from January 2000 to January 2011. Subsequently, the results were refined by the year of publication and by the sector, using the international patent classification (IPC).

The terms used in our search for articles and patents were "Bixin", "Norbixin", and also the names adopted by various nationalities for annatto, i.e., "*Bixa orellana*" (scientific name), "Urucum" (in Brazil/ Bolivia), "analytic" (Honduras), "Roucou" (France), "Orleanstrauch" (Germany), "Orleans Laum" (Germany), "safflower" (Portugal), "Annatto" (USA/ UK), and "Achiote" (US / UK), using a variety of combinations offered by the search engine.

According to the results, our search resulted in 473 articles and 410 patents to date. Approximately 48% of all the articles and 60% of all the patents were published in the last decade. Fig. (1) shows the evolution of the articles and patents related to annatto over the decades. There were increases of approximately 60% and 70% in numbers of articles and patents, respectively, from the year 2000 to the present time compared with previous decades.

In the last decade, 281 patents classified by IPC were published exclusively in Section A - Human Needs and 217 (77%) patents in Section C – Chemistry and Metallurgy; approximately 40% and 45 patents were distributed in classes A23 - Food and Food Products, its Processing, not covered by other classes, and A61 - or Veterinary Medical Science, Hygiene. Thus, a restricted search of the Human

Trends in Annatto Agroindustry

Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2 101

Needs Section in the class of food, medicine and hygiene was performed to analyze what subclasses of patents were published regarding annatto and its colorants Fig. (2).



Fig. (1). The evolution of publications, including articles (-) and patents (-), by decade.

The distribution of patents showed that with respect to the class of food products, many were classified in the subclass of food products or beverages, followed by subclasses of dairy products and food products specially adapted for animals. In the class of Veterinary Medical Science and Hygiene, the most patents are classified in the subclass "mainly preparations for medical, dental and hygiene purposes" followed by subclasses "specific therapeutic activity of chemical compounds or medicinal preparations", and "specific use of cosmetic or similar preparations for personal hygiene".

These figures confirm the trend of increasing interest in obtaining annatto colorants that are able to be used in food, cosmetics and pharmaceuticals through new technologies for colorant production or other sectors connected to the annatto production chain. The increase in the research of annatto, both in the food and medical fields, shows that industries are increasingly seeking to associate the benefits of natural colorants with actual products.

CURRENT & FUTURE DEVELOPMENTS

Because strict regulatory requirements make the approval of synthetic colorants difficult to obtain, there is a continuous need for coloring agents for an increasing number of natural foods that incorporate natural colorants. Therefore, further studies of clean technologies for annatto colorant extraction with environmental benefits (e.g., free organic solvents) are necessary, as we have observed a generalized market trend (e.g., in the food, pharmaceutical and cosmetic industries) by searching for products that generate economic, social and environmental benefits. Therefore, the development and optimization of processes are fundamentally important to add value to the product.

This review demonstrated the increasing use of annatto as a natural colorant through an increase in technological solutions for obtaining the colorant and using it in different applications. Among the many advantages, some of the most interesting are as follows: the use in carbonated beverages, which was not previously possible due to the low pH of these products; the potential applications in cosmetics and pharmaceuticals with extracts obtained by processes that obtain products with high purity using residue-free solvents (e.g., by extraction with supercritical fluids); and the socioeconomic benefit to generating employment and income production with the increased value of annatto colorant. This study presents an overview of R&D on technologies for colorant production and in other sectors of the annatto productive chain.



Fig. (2). Patents according to the International Patents Classification from 2000 to 2011: (A23). Food or Foodstuffs; Their Treatment, not covered by other classes; (A23C). Dairy products; milk or cheese substitutes; make thereof. (A23D). Edible oils or fats. (A23F). Coffee; tea; their substitutes; manufacture, preparation or infusion thereof. (A23G). Cocoa; cocoa products; substitutes for cocoa or cocoa products; confectionery; chewing gum; ice-cream; preparation or infusion thereof. (A23J). Protein composition for foodstuffs; working-up proteins for foodstuffs; phosphatide compositions for foodstuffs. (A23K). Feeding-stuffs especially adapted for animals; method especially adapted for production for thereof. (A23L). Foods, foodstuffs, or non-alcoholic beverages; their preparation or treatment; preservation of foods or foodstuffs, in general. (A23P). Shaping or working of foodstuffs, not fully covered by a single other subclass. (A61). Medical or veterinary science; hygiene. (A61K). Preparations for medical, dental or toiletry purposes. (A61P). Specific therapeutic activity of chemical compounds or medicinal preparations. (A61Q). Specific use of cosmetics or similar toiletry preparations.

ACKNOWLEDGMENTS

C.L.C. Albuquerque would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (143092-2008-1) for the PhD assistantship. The authors acknowledge the financial support of CNPq. 102 Recent Patents on Engineering 2011, Vol. 5, No. 2

REFERENCES

- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Non-Wood Forest Products 4. Natural colorants and dyestuffs. Available at: www.fao.org/docrep/V8879E/V8879E00.htm. (Accessed on: January 25, 2011).
- [2] Furtado M. Colorants: Food industry adheres to the natural colorants. Available at: http://www.quimicaederivados.com.br/ index.php?sessao=reportagem&id=534&codigo_revis=421. (Accessed on: May 24, 2007).
- [3] Oliveira JS. Characterization, extraction and purification by chromatography of annatto compounds (*Bixa orellana* L.). PhD Thesis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, February 2005.
- [4] Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. Food Addit Contam 1994; 11: 301-15.
- [5] Scotter MJ, Wilson LA, Appleton GP, Castle L. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. J Agric Food Chem 1998; 46: 1031-8.
- [6] Bareth A, Strohmar W, Kitzelmann E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. Eur Food Res Technol 2002; 215: 359-64.
- [7] Montenegro MA, Rios AO, Mercadante AZ, Nazareno MA, Borsarelli CD. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. J Agric Food Chem 2004; 52: 367-73.
- [8] Rehbein J, Dietrich B, Grynbaum MD, Hentschel P, Holtin K, Kuehnle M, Schuler P, Bayer M, Albert K. Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. J Separ Sci 2007; 30: 2382-90.
- [9] Scotter M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. Food Addit Contam 2009; 26: 1123-11.
- [10] Ramamoorthya S, Dossa FP, Kundua K, Satyanarayana VSV, Kumarb V. Molecular characterization of bixin - An important industrial product. Ind Crop Prod 2010; 32: 48-53.
- [11] FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Annatto Extracts: Chemical and Technical Assessment. Available at: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/cta_annatto.pdf. (Accessed on: May 24, 2007).
- [12] Franco CFO, Fabri EG, Barreiro Neto M., Manfiolli MH, Harder MNC, Rucker NCA. Annatto: Production systems for Brazil. 1st ed. EMEPA: João Pessoa 2008.
- [13] Mercadante AZ, Steck A, Rodrigues-Amaya D, Pfander H, Britton G. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. Phytochem 1996; 41: 1201-3.
- [14] Mercadante AZ, Steck A, Pfander H. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. J Agric Food Chem 1997; 45: 1050-4.
- [15] Mercadante AZ, Steck A, Pfander H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoides from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. Phitochem 1997; 46: 1379-83.
- [16] Mercadante AZ, Steck A, Pfander H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. Phytochem 1999; 52: 135-9.
- [17] Bouvier F, Dogbo O, Camara B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). Science 2003; 300: 2089-90.
- [18] Giuliano G, Rosati C, Bramley PM. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. Trends Biotechnol 2003; 21: 513-5.
- [19] Iqbal M. International trade in non-wood forest products: an overview. FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: http://www.fao.org/docrep/x5326e/ x5326e00.htm. (Accessed on: November 25, 2010).
- [20] Satyanarayana A, Prabhakara Rao PG, Rao DG. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). J Food Sci Technol 2003; 40: 131-41.
- [21] Carvalho PRN. Production of colorific. Proceedings of the 2nd National Meeting of the Annatto Production Chain, Campinas, Brazil, December 2, 2010.
- [22] Teramoto JRS, Fabri EG. The annatto crop in the State of Sao Paulo. Proceedings of the 2nd National Meeting of the Annatto Production Chain, Campinas, Brazil, December 2, 2010.

Albuquerque and Meireles

- [23] Fabri EG, Latesta CS; Rós-Gola A, Teramoto JRS, Pantano AP. Occurrence of annatto in the State of São Paulo. Available at: http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Urucumsp/urucumsp.htm. (Accessed on: August 5, 2009).
- [24] Franco CFO. EMEPA extracts the highest colorant content from annatto in Brazil. Available at: http://www.paraiba.pb.gov.br/ index.php?option=com_content&task=view&id=24004&Itemid=2 (Accessed on: May 5, 2008).
- [25] Globo Amazônia. The country's biggest producer, Rondônia, supplies the Southeast with annatto. Available at: http://www.globoamazonia.com/Amazonia/0,,MUL1617232-16052,00-MAIOR+PRODUTOR+DO+PAIS+RONDONIA+ABASTECE+O +SUDESTE+COM+URUCUM.html. (Accessed on: January 29, 2011).
- [26] Franco CFO. Agriculture in the State of Paraíba generates wealth for exporters. Available at: http://www.paraiba.com.br/ noticia.shtml?13610. (Accessed on: May 4, 2007).
- [27] Carvalho PRN. The colorants from annatto. Proceedings of the 2nd National Meeting of the Annatto Production Chain, Campinas, Brazil, December 2, 2010.
- [28] Pereira CG, Meireles MAA. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. Food Bioprocess Technol 2010; 3: 340-72.
- [29] Chao RR, Mulvaney SJ, Sanson DR, Hsieh F, Tempesta MS. Supercritical CO₂ extraction of annatto (*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the color extracts. J Food Sci 1991; 56: 80-3.
- [30] Degnan AJ, Von Elbe JH, Hartel RW. Extraction of annatto seed pigment by supercritical CO₂. J Food Sci 1991; 56: 1656-9.
- [31] Silva GF, Gamarra FMC, Oliveira AL, Cabral FA. Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide. Braz J Chem Eng 2008; 25: 419-26.
- [32] Nobre BP, Mendes RL, Queiroz EM, Pessoa FLP, Coelho JP, Palavra AF. Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from Bixa orellana seeds (experiments and modeling). Braz J Chem Eng 2006; 23: 251-8.
- [33] Meireles MAA, Leal PF, Rosa PTV. Extraction process and purification process in series of active compounds and colorants from solid matrices using supercritical CO2: bixin from annatto. PI0605425, 2008.
- [34] Perrut M. Supercritical fluid application: Industrial development and economic issues. Ind Eng Chem Res 2000; 39: 4531-5.
- [35] Isager PP, Winning M. Water dispersible compositions containing natural hydrophilic water-insoluble pigments, methods of preparing same and their use. US7229490, 2007.
- [36] Souza CE. The rustic and profitable annatto. Available at: http://diariodaregiao.com.br/noticias/corpo_noticia.asp?IdCategoria =177&IdNoticia=113129. (Accessed on: January 29, 2011).
- [37] Sabliov CM, Astete CE. Water-soluble nanoparticles containing water-insoluble compounds. US20100112073, 2010.
- [38] Tan, B., Foley, J. Tocotrienols and geranylgeraniol from *Bixa orel*lana byproducts. US6350453, 2002.
- [39] Tan B. Annatto extract compositions, including geranyl geraniols and methods of use. US20080031985, 2008.
- [40] Cardarelli CR, Benassi MT, Mercadante AZ. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. LWT - Food Sci Technol 2008; 41: 1689-93.
- [41] Mercadante AZ, Capitani CD, Decker EA, Castro IA. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. Meat Sci 2010; 84: 718-26.
- [42] Tibodeau JD, Isham CR, Bible KC. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase antioxid redox sign 2010; 13: 987-97.
- [43] The measurement of scientific and technological activities. Using patent data as science and technology indicators - Patent Manual 1994. Available at: http://www.oecd.org/dataoecd/33/62/ 2095942. pdf. (Accessed on: January 29, 2011).

CAPÍTULO 3 – ESTIMATE OF THE COST OF MANUFACTURING (COM) OF NATURAL COLORANTS OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION

Carolina L. C. Albuquerque and M. Angela A. Meireles

Artigo publicado em II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids -PROSCIBA 2010, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.



ESTIMATE OF THE COST OF MANUFACTURING (COM) OF NATURAL COLORANTS OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION

Carolina L. C. Albuquerque and M. Angela A. Meireles* LASEFI/DEA/FEA (School of Food Eng.)/UNICAMP (University of Campinas) R. Monteiro Lobato, 80; 13083-862, Campinas, SP, Brazil; e-mail: meireles@fea.unicamp.br

Abstract. The antioxidant activity of certain colorants, that can be used as a coadjutant in the treatment of degenerative disease such as cancer, the reported harmful effects of synthetic dyes, that has lead the World Health Organization to imposed restrictions to their use and the population awareness of ecological issues has stimulated the research on food, cosmetic and pharmaceutical industries for processes that generate economic, social and environmental benefits and, at the same time, to obtain a high quality final product. Supercritical fluid extraction (SFE) is a clean technology that is used successfully to produce biological extracts, free of toxic solvents that keep the original functional properties of the biological matrix. Nonetheless, it is known as a high investment technology, which discouraged its consideration as a process option at the preliminary stages of project development. One way to avoid this is to make available estimates of the cost of manufacturing (COM) of the SFE extracts and relate it to their benefits such as chemical composition and functional properties, and to compare these COM estimates with the COM for extracts obtained by conventional processes. In this work, the COMs of SFE extracts from Annatto (Bixa orellana L.) and Turmeric (Curcuma longa L.) were estimated using data from literature. The COMs of the extracts will be used as a tool in economic analysis for scale-up and feasibility of SFE process implementation in Brazil.

Keywords: Annatto, *Bixa orellana* L., Cost of Manufacturing, *Curcuma longa* L., Supercritical Fluid Extraction, Turmeric

1. Introduction

The attention that natural dyes are getting is due not only to a global consumption of natural products, but also to the functional properties attributed to some of these pigments. Although synthetic dyes having lower production costs and greater stability, the number of synthetic additives permitted in developed countries is decreasing every year, in benefits to natural pigments. Commercially, the most widely used dyes in food industries are Annatto and Turmeric, both with areas of production in Brazil in the form of family farming (Constant, 2002).



The Annatto (*Bixa orellana* L.) is the fruit from urucuzeiro, native plant from the tropical America, also cultivated in Asia and Africa (Oliveira, 2005). Although it is produced in many tropical countries, Peru and Brazil are the largest producers of this seed (Franco, 2008). The major pigment bixin, present only in this plant (Noble et al, 2006), is a red carotenoid with high socio-economic potential and used extensively in textile, pharmaceutical, cosmetic and food industries. Carotenoids of Annatto have proven antioxidant activity against free radicals and also, capable of blocking the sunlight (Kiokias, 2003).

Turmeric (Curcuma longa L.) is used as a dye and flavoring agent. Curcumin is the main dye present in turmeric rhizomes. It is used as a dye and spice and has antioxidant substances and antimicrobial properties that can be applied in the cosmetic, textile, medical and food areas (Constant, 2002).

The marketing appeal increasingly encourages the development of new studies in order to overcome the current technology limitations (Constant, 2002). Furthermore, in recent years, government and non-governmental organizations have been showing increasing interest on sustained development. Therefore, they are stimulating sustained harvesting of native plants by local communities and the use of Green Technologies, ideal to increase income without degrading the environment (Prado et al, 2009).

The decision of the more appropriated extraction method to be used, should take parameters as cost, productivity, yield and environmental and public health restrictions (Careri et al, 2001). Choice to reach all these needs is found in supercritical fluid extraction (SFE), which has been used as an alternative method in substitution to the conventional extraction processes (Perrut, 2000; Vagi et al, 2002).

The productivity improvement of supercritical extraction units in industrial scale promotes the decrease the investment. Data on scale-up and cost of manufacturing (COM) of supercritical extracts still are scarce in the literature, such information have great importance to stimulate the transfer of SFE technology from laboratory to industrial scale (Pereira et al, 2006). COM studies of SFE extracts show that the process parameters optimization increased the extraction rates, making supercritical technology viable and advantageous (Leal et al, 2007).

Computational simulation of processes reduces the time necessary for development and scale-up of a process, modeling and predicting the production costs for industrial scale (Rouf et al, 2001; Kwiatkowski et al, 2006; Takeuchi et al, 2008). The process simulator SuperPro Design® is a group of software tools capable of predicting process and economical parameters, quantifying the process parameters whose information forms the base for COM estimation.

The objective of this work was to estimate COM of Annatto and Turmeric extracts with the aid of the SuperPro Design® software.

2. Materials and Methods

2.1. Selection of the Raw Material Data:

The parameters required for the simulation of the SFE process of Annatto and Turmeric, based on Braga (2005) and Chao et al (1991) studies, are showed in table 1, where T is temperature, P is pressure, ρ is bed density, Q is mass flow rate of solvent, X_{SOLV} is solvent fraction, $X_{CO-SOLV}$ is co-solvent fraction, t is time, Y_{TOTAL} is total yield and Ref. is the reference source.



Table 1. SFE process parameters

Т	Р	ρ	Q	X _{SOLV} /	t	Y _{TOTAL}	Ref.
[K]	[MPa]	$[kg/m^3]$	[×10 ⁻⁵ kg/s]	X _{CO-SOLV}	[min]	[%]	
333	31	608	53,0	-	250	1,89	Chao, 1991
303	30	530	5,80	90:10	176	7,70	Braga, 2005

2.2. Simulation of the SFE Process:

The simulation of the SFE process for Turmeric and Annatto used the methodology of Prado et al (2009): The simulations were conducted using the software SuperPro Designer 6.0® which has a databank with several equipments, unit operations and chemical compounds that usually are used in chemical industry; it is also possible for the user to create a large number of process using the available equipments and unitary operations. The supercritical extractor built in the SuperPro Designer 6.0® contains two supercritical extractor designed to support a maximum pressure of 80 MPa, working in a semi continuous system, i.e., when an extraction is carried out in an extractor, the other is depressurized, unloaded, cleaned, loaded and pressurized again.

2.3. Scale up:

The scale up procedure used assumes that bed density, extraction time and yield in the laboratorial and industrial SFE process are similar if the ratio between raw material and solvent flow rate (S/F) are kept constant (Rosa and Meireles, 2005). The scale up was based in the equipments capacity adopting three industrials SFE units, each one with two extractors of $0.1, 0.5 \text{ e } 1 \text{ m}^3$.

2.4. Economical Evaluation:

The operational cost of the process was calculated considering 330 days per year and 24-h per day. The method utilized by the software to estimate the COM is based on Turton et al. (1998). This methodology defines COM as a sum of the fixed cost of investment (FCI), the cost of utilities (CUT), the cost of labor (COL), the cost of raw material (CRM) and the cost of waste treatment (CWT) involved in the studied chemical process to compose the COM.

Cost of investment (FCI). The FCI of the SFE process is composed basically by the cost of the extraction unit; the annual depreciation was 10%. The estimated prices for each SFE unit studied were US\$ 750,000.00 ($0.1m^3$); 2,000,000.00 ($0.5m^3$); 3,000,000.00 ($1.0m^3$) (Prado, 2009).

Cost of operational labor (COL). The COL was based in the quantity of operators needed to operate the SFE units studied: $2 (0.1 \text{m}^3)$, $3 (0.5 \text{m}^3)$; $e 4 (1.0 \text{m}^3)$ operators (Prado, 2009), and the cost was US\$5.00 h⁻¹.

Cost of raw material (CRM). The commercialization costs of raw material were US\$ 8.00 kg^{-1} for Turmeric and US\$ 2.00 kg^{-1} for Annatto. The costs of solvents used in the SFE process were US\$ 0.1 kg^{-1} for CO₂, US\$ 0.65 kg^{-1} for Ethanol and US\$ 2.43 kg^{-1} for Isopropanol. The solvent lost was considered to be 2% of the total CO₂ involved in the



process. The flash tank operated at 4 MPa and at temperature of 303 K (Takeuchi et al, 2008).

Cost of waste treatment (CWT). The CWT was considered null because the only accumulated waste is the exhausted solid which may be sold in food industries (Braga, 2005).

Cost of utility (CUT). The CUT was estimated considering the energy involved in the solvent cycle: steam used in the flash tank and the heat exchanger, cold water used in the condenser and electricity used in the pump.

3. Results e Discussions

3.1. Turmeric (*Curcuma longa* L.)

The overall extraction curves (OEC) and the COM of Turmeric extract at each point of the OEC, obtained by SFE process simulation in $0.005m^3$ unit, are presented in Fig. 1. The COM varied from US\$ 251.21 kg⁻¹ to US\$ 435.81 kg⁻¹. The lower COM was obtained at 37 min of extraction and the yield was 5.3%, which means that about 69% of the total extract was recovered.

Fig. 2 presents the COM composition at each point of OEC. It is possible to view that in short extraction times the CRM and the FCI have more participation in the COM composition. For larger extraction times the FCI and COL have more participation in the COM composition. This behavior is typical for units in a laboratory scale (0.005 m^3) , where the amount of raw material is greater for short cycles of extraction and equipment cost is high for a lower production of extract. However, this changes behavior when scale increase.



Fig. 1 - OEC and COM from Turmeric SFE extract $(0.005m^3)$.

Fig. 2 - COM composition from Turmeric SFE extract $(0.005m^3)$.

The scale up was calculated for SFE industrials units of 0.1, 0.5 e 1 m³, for 37 min SFE duration; a comparison of COM using prices of equipments from USA and Chinese markets was done. It is possible to view that the COM decreased when the scale of SFE unit increased and the CRM had more participation in the COM composition. The greater amount of raw material demanded when an industrial unit is used, then, the CRM fraction represents a larger participation in the final COM, being responsible for 75% in the 0.1 m³ equipment and 84% in the 1.0 m³ equipment. The COM of Turmeric extract varied of US\$ 167.99 kg⁻¹ (0.1 m³) to US\$ 159.48 kg⁻¹ (1 m³) (Fig.2), and for different market prices



II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids PROSCIBA 2010

(USA and Chinese) of the equipments, the difference was of US 2.47 kg⁻¹ (0.1 m³) and US 0.82 kg⁻¹ (1 m³), proved that in industrials scale the FCI do not strongly influence the COM.



Fig. 3 – COM composition of Turmeric Fig. 4 - COM of Turmeric SFE extract. SFE extract.

3.2. Annatto (Bixa Orellana L.)

Although the number of researches performed in Annatto SFE, the necessary data for use in the simulator was only found in Chao et al (1991). The data for the kinetics were not available and therefore it was not possible to estimate the COM for different extraction times. The COMs of Annatto extract in laboratory scale (0.005 m^3) was of US\$ 1,781.62 kg⁻¹, and in industrial scale was of US\$ 382.00 kg⁻¹ (0.1 m^3), US\$ 258,54 kg⁻¹ (0.5 m^3) and US\$ 232.88 kg⁻¹ (1.0 m^3) (Fig. 5). The COM composition is presented in Fig. 6. It is possible to view that the FCI and the COL have more participation in the COM in laboratorial scale due high cost of equipment. When the scale increase, and the productivity therefore, it was possible to view that CRM and CUT increased, and FCI and COL decreased. The FCI continued with more participation in the COM composition despite the increase in scale due to the low cost of raw materials, that doesn't affect the COM even in large quantities needed demanded by the industrial units studied. The CRM should be even lower because the Annatto do not need pre-treatment, such as grinding, to be used in SFE.



Fig. 5 - COM of Annatto SFE extract.

Fig. 6 - COM composition of Annatto SFE extract.

Studies with Annatto SFE are found in the literature (Chao et al, 1991; Nobre et al, 2006; Silva, 1999, Silva et al, 2008; Degnan et al, 1991; Anderson et al, 1997). It was possible to view in these studies that ground seeds did not increased the concentration of



pigments in the extract (Degnan et al, 1991; Nobre et al, 2006, Silva et al, 2008;), possibly because of the location of the pigments on the surface of the seed (Nobre et al, 2006); the use of co-solvent increased the extraction efficiency. Some authors (Degnan et al, 1991, Silva et al, 2008) observed that the solubility of the bixin was significantly improved by the action of the oil present in the seeds, functioning as a co-solvent. Therefore, it is necessary to determine the parameters of Annatto SFE using co-solvent to be able to estimate the COM in optimal conditions.

4. Conclusions

The optimized parameters of SFE process are important to evaluate the economic feasibility of a SFE process. The cycle time of the process should consider the quality of the final product and the chemical composition of interest.

The FCI was not the dominant cost in COM SFE extract of Turmeric. The CRM was the cost that has more participation in the COM composition because when a larger extractor is used, the CRM fraction represents a larger participation in the final cost due to the greater amount of raw material demanded. In larger capacity equipment, the COM had little variation when scale increased.

Through computer simulation it was possible to estimate the COM proving to be an important tool for studies of technical and economic feasibility of industrial processes SFE

5. Acknowledgment

The author thanks the financial support from CNPq (562766/2008-1).

6. References

- Anderson, S. G., Nair, M. G., Chandra, A., Morrison, E. (1997). Supercritical Fluid Carbon Dioxide Extraction of Annatto Seeds and Quantification of *trans*-Bixin by High Pressure Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 8, 247.
- Braga, M.E.M. (2005). Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. Campinas, Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Careri, M., Furlattini, L., Mangia, A., Musci, M., Anklam, E., Theobald, A., Von Holst, C. (2001). Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in Spirulina pacifica algae: a chemometric approach. *Journal of Chromatography A*. 912, 61.
- Chao, R. R., Mulvaney, S. J., Sanson, D. R., Hsieh, F, Tempesta, M. S. (1991). Supercritical CO₂ Extraction of Annatto (Bixa orellana) Pigments and Some Characteristics of the Color Extracts *Journal of Food Science*, 56(1), 80.
- Constant, P.B.L., Stringheta, P.C., Sandi, D. (2002). Corantes Alimentícios. *Boletim do CEPPA*, *Curitiba*. 20(2), 203.
- Degnan, A. J., Von Elbe, J. H., Hartel, R. W. (1991). Extraction of annatto seed pigment by supercritical CO₂. *Journal of Food Science*, 56, 1656.
- Franco, C. F. O. EMEPA extrai do urucum o mais elevado teor de corante do Brasil. 13 de julho de 2007. Available in: < http://www.paraiba.pb.gov.br/ >, Access in 09/05/2008.
- Kiokias, S., Gordon, M. H. (2003). Antioxidant properties of annatto carotenoids. Antioxidant properties of annatto carotenoids *Food Chemistry*, 83 523.
- Kwiatkowski, J. R., Mcaloon, J. A., Taylor, F., Johnston, J. B. (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, 23, 288.



- Leal, P.F., Takeuchi, T.M., Meireles, M.A.A. (2007). Comparison of two anethole sources (Foeniculum vulgare And Croton zethntneri Pax Et Hoffm) in terms of supercritical extraction economical evaluation. In I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids – PROSCIBA.
- Nobre, B.P., Mendes, R.L., Queiroz, E.M., Pessoa, F.L.P., Coelho, J.P., Palavra, A.F. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from bixa orellana seeds (experiments and modeling). *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23 (2), 251.
- Oliveira, J. S. (2005). Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (*Bixa orellana* L.). Florianópolis, Tese (Doutor em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e de Alimentos/CT, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Pereira, C.G., Rosa, P.T.V., MEIRELES, M.A.A. (2006). Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana cathariensis* A.DC.: Technical and economical analysis. *Journal of Supercritical Fluids*, 30, 51.
- Perrut, M. (2000) Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues. Industrial and Engineering Chemistry Research. 39(12), 4531.
- Prado, I.M., Albuquerque, C.L.C, Cavalcanti, R.N., Meireles, M.A.A. (2009). Use of a Commercial Process Simulator to Estimate the Cost of Manufacturing (COM) of Carotenoids Obtained Via Supercritical Technology from Palm and Buriti Trees. In Proceedings of the 9th International Symposium of Supercritical Fluid. Arcachon, França.
- Prado, I.M. (2009). Utilização do simulador SuperPro Design 6.0® para estimativa do custo de manufatura (COM): processo de extração com fluido supercrítico. Manual.
- Prado, J.M., Assis, A.R.; Maróstica-Júnior, M.R., Meireles, M.A.A. (2009) Manufacturing cost of supercritical-extracted oils and carotenoids from Amazonian plants. *Journal of Food Process Engineering*, DOI: 10.1111/j.1745-4530.2008.00279.x
- Rosa, P.T.V., MEIRELES, M.A.A. (2005). Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering*, 67, 235.
- Rouf, S.A., Douglas, S.A., Moo-Young, M., Scharer, J. M. (2001). Computer simulation for large scale bioprocess design. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 229.
- Silva, G.F. (1999). Extração de pigmentos do Urucum com CO2 Supercrítico. Campinas Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Silva, G.F., Gamarra, F.M.C., Oliveira, A.L., Cabral, F.A. (2008). Extraction of Bixin from Annatto seeds using supercritical carbon dioxide. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 419.
- Takeuchi, T.M., Leal, P.F., Favareto, R., Cardozo-Filho, L., Corazza, M.L., Rosa, P.T.V., Meireles, M.A.A. (2008). Study of the phase equilibrium formed inside the flash tank used at the separation step of a supercritical fluid extraction unit. *Journal of Supercritical Fluids*, 43, 447.
- Turton, R.C., Bailie, W.B., Whiting, J.A., (1998). Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Process, *Prentice Hall*, PTR, Upper Saddle River.
- Vági, E., Simándi, B., Daood, H.G., Deák, A., Sawinsky, J.J. (2002). Recovery of pigments from Origanum majorana L. by extraction with supercritical carbon dioxide. Agriculture and Food Chemistry, 50, 2297.

CAPÍTULO 4 - DEFATTING OF ANNATTO SEEDS USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AS A PRETREATMENT FOR THE PRODUCTION OF BIXIN: EXPERIMENTAL, MODELING AND ECONOMIC EVALUATION OF THE PROCESS

Carolina L.C. Albuquerque and M. Angela A. Meireles

Artigo publicado em Journal of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95

ISSN: 0896-8446. DOI:10.1016/j.supflu.2012.01.004

AVISO DE DIREITO DE AUTOR

Este artigo é de propriedade da Elsevier. Você pode baixar cópia do mesmo em um único computador, para fins pessoais ou não comerciais de uso temporário, levando em conta os direitos de autor e outros avisos da marca. No entanto, nenhum conteúdo do artigo baixado pode ser copiado, reproduzido, distribuído, republicado ou postado. Também é proibida a modificação do conteúdo do artigo para qualquer propósito, o que constitui uma violação dos direitos autorais da Elsevier e / ou seus fornecedores. J. of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95



Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process

Carolina L.C. Albuquerque, M. Angela A. Meireles*

LASEFI/DEA/FEA (School of Food Engineering)/UNICAMP (University of Campinas), R. Monteiro Lobato, 80, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 3 August 2011 Received in revised form 24 November 2011 Accepted 9 January 2012

Keywords: Bixaorellana L. Bixin Industrial scale simulation Cost of manufacturing Supercritical fluid extraction Tocotrienol

1. Introduction

Due to consumer demand for natural products, there is a growing need for food colorants that incorporate natural pigments, as the food industry is increasingly seeking to associate the benefits of natural colorants with current products [1]. However, compared with synthetic colorants, the high cost of formulations based on natural colorants remains a major barrier to their acceptance in the market [2].

Several industrial processes are currently available for the extraction of bixin, such as extraction with an alkaline solution or an organic solvent; these processes have shortcomings in terms of selectivity and the level of purity of the substance of interest [3]. Furthermore, conventional processes generate solvent wastes and thus require several subsequent

* Corresponding author. Tel.: +551935214033; fax: +5519 3521 4027.

ABSTRACT

In this work, supercritical CO₂ extraction for defatting of annatto seeds was studied; the objective was to obtain an extract rich in tocotrienols and the defatted rich-bixin seeds. The process conditions were selected from global yield isotherms assays performed at 313 and 333 K, and 20, 31, and 40 MPa; the ratio of solvent mass (S) to feed mass (F) was 35. For this S/F the highest extraction yield was 22 mg of extract/g dried seeds obtained at 333 K and 40 MPa. At these conditions a kinetic experiment was done to estimate the required parameters needed to estimate the cost of manufacturing (COM). COM was estimated using a commercial simulator; the model SFE plant had two extractor vessels in order to simulate continuous operation. A pilot plant size unit and two industrial size units were considered. The COM decreased from 124.58 to 109.27 US\$/kg of extract as the extraction vessels capacities increased from 0.1 and 0.5 m³; for the pilot plant with 2 vessels of 0.005 m³ the COM was 300.00 US\$/kg of extract.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

unit operations to remove the solvent, resulting in elevated energy costs [4] to ensure that this residue is completely removed.

Annatto (*Bixa orellana* L.) has the natural colorant bixin which is the mostly used colorant in food processing [5]. The industrial process used to obtain bixin from annatto seeds is the extraction with an alkaline solution, usually potassium or sodium hydroxide [6]. The process consists of the mechanical abrasion and maceration or shaking of the seeds with aqueous alkali [5,7]. This process is known to transform bixin (present in the seeds as an ester) into a diacid salt 'norbixate' that is soluble in water [7,8]. The alkaline solution removal from the bixin-rich extract as well as from the seeds requires several subsequent unit operations, thus, elevating the energy costs of the process [4]. Other industries extract the colorant using a step in which the pigment is saponified; in this situation, the process is more efficient when the fat content of the seeds is lower [6].

The fat fraction of annatto contains to cotrienols and geranylgeraniol [9]. Recent studies have shown that the peculiarity of annatto is that its lipid fraction contains a large amount of δ -tocotrienol [9,10]. Tocotrienols have been associated with hypocholesterolemic effects and are believed to be useful in the treatment of cardiovascular diseases and cancer [10,11]. The lipid-rich fraction of annatto can also be effective in the prevention of lipid peroxidation [12]; probably, the tocotrienols combined with bixin act synergistically to protect the unsaturated lipids from oxidation [13]. A

Abbreviations: b_i , linear coefficients of the spline fitted straight lines; C_i , interception of the *i* line and the (*i*+1) lines; d_p , mean particle diameter; M_{CER} , mass-transfer rate during CER period; R_{CER} , yield achieved during CER period; R_{CIR} , total yield; t_{CER} , constant extraction rate period; t_{FER} , falling extraction rate period; t_{CER} , period at the interception between CER and DC straight lines; Y_{CER} , mass ratio of solute in the supercritical phase at the bed outlet during CER period; CER, constant extraction rate; C_{OL} , operating labor cost; COM, cost of manufacturing; C_{RM} , cost of the raw material; C_{UT} , utility cost; C_{WT} , cost of waste treatment; DC, diffusion controlled; FER, falling extraction rate; F_{CL} , fixed cost of investment; GYI, global yield isotherms; OEC, overall extraction curves; SFE, supercritical fluid extraction.

E-mail address: meireles@fea.unicamp.br (M.A.A. Meireles).

^{0896-8446/\$ -} see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.supflu.2012.01.004

recent review showed an increase in studies on annatto and new discoveries with respect to the composition of the seed extract [1].

Supercritical fluid extraction (SFE) of annatto has been studied with a focus on obtaining bixin from the seeds, and the process proved to be technically feasible [14-18]. These studies showed that the efficiency of the extraction improved with increasing temperature and pressure [16,17]; the seed oil acted as a cosolvent in the extraction of bixin from the seeds [14,18], and the yield of bixin was significantly increased with the use of organic solvents as cosolvents [14-17]. Although the efficiency of the process can be improved by adjusting the operating conditions [14,16,17], studies have shown that the yield of bixin was low, and that while the ratio of bixin mass to CO₂ mass ranged from 0.0003 to 0.05 mg bixin/g CO₂, the ratio of extract mass to CO₂ mass ranged from 0.07 to 2.5 mg extract/g CO₂ [14–18]. On the other hand, SFE of annatto proved to be advantageous in the extraction of several terpenoids, providing greater selectively than the corresponding process with organic solvents [15] and in avoiding the problems encountered with conventional extraction methods with organic solvents such as high energy cost, environmental concerns, toxicity, and the generation and recovery of large amounts of solvent waste [14,18]. Milling the seeds did not increase the concentration of pigments in the extract [14,15,17,18].

After selecting the appropriate technology to obtain the desired product, the process should be studied and optimized. Despite the available information related to obtaining annatto extract by SFE, kinetic data required for process design and development are still lacking. The optimization process considers, in addition to the characteristics of the solid matrix and the optimal conditions of temperature and pressure, the process time that results in higher efficiency and low manufacturing costs of extract [19]. SFE is up-to-now associated to high fixed cost of investment [19,20]. However, analyses of the cost of manufacturing (COM) of various extracts have shown that SFE is indeed a competitive alternative to the production of bioactive extracts, proving to be technically and economically feasible and showing several advantages compared with traditional extraction methods [21–32].

For COM estimation two types of experimental data must be available [19,20]: the global yield isotherms (GYI) and the overall extraction curves (OEC). The GYI can be used to select the process temperature and pressure based on the yield of extract and/or target compound. Once temperature and pressure are selected, OEC is performed to obtain kinetic parameters, including the minimum time an extraction batch should last. A typical OEC is characterized by three periods [19,20,33,34]: (i) constant extraction rate period (CER) where the easily accessible solute contained at the surface of the particles is removed by convection; (ii) falling extraction rate period (FER) where convection as well as diffusion mechanisms are present; (iii) diffusion-controlled extraction rate period (DC), controlled solely by diffusion. Because 50-90% of the total extraction yield is obtained during the CER period, the mass transfer rate, the yield and the length of the CER period can be used in preliminary estimates of the cost of manufacturing of SFE extracts [19,20,33]. Process simulation is an interesting alternative for studying a process. The simulation decreases the time of the development of process projects and costs of experimentation (equipments, inputs and energy) [25]. A method using a commercial simulator was developed to simulate the scale-up of SFE processes [25,26]. Several studies based on this one have verified SFE viability in Brazil [23,24,26,28,31].

Considering the context of low-yield of bixin by using the SFE process; the relatively high lipid content (up to 4.8% have been reported in literature) of annatto seeds, which has substances with functional properties; and the interest of the bixin manufacturing industries in acquiring annatto seeds with the lowest possible oil content; removing the fat from annatto seeds prior

to the extraction of bixin can help in manufacturing high quality bixin; and if carbon dioxide is used as the extracting solvent the defatting step will be classified as a green process. Therefore, the objective of this work was to study the defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide extraction envisioning a two-step process for the production of bixin: (1) defatting of annatto seeds by SFE and (2) extraction of bixin using a green solvent that might be water or even mechanical abrasion. The process temperature and pressure were optimized with respect to the total yield in extract with the highest content of bixin. The purpose was to obtain the process conditions that would be extremely conservative with respect to the COM; if the process is shown to be economic viable under these conditions, then, it would be viable at optimum condition. It is important to say that at the best of our knowledge this is the first time SFE of tocols and tocotrienols from annatto seeds is reported in literature

2. Materials and methods

2.1. Materials

Annatto variety Piave was obtained from the Instituto Agronômico de Campinas – IAC (Agronomic Institute of Campinas), Department of Agriculture and Supply of the State of São Paulo. Immediately after acquisition, the sample was identified and stored at 255 K, protected from light, until further analysis. All reagents used were of analytical grade. A commercial sample of annatto extract was provided by Kraki & Kratschmer Ltda. (Santo Andre, Brazil).

2.2. Raw material characterization

The true density (ρ_t) of the annatto seeds was determined by picnometry with helium gas (Micromeritics Multivolume Pycnometermodel 1305, Norcross, GA) at the Central Analytical Laboratory of the Institute of Chemistry/UNICAMP (Campinas, Brazil). The bed apparent density (ρ_a) was calculated by dividing the feed mass by the extraction vessel volume. The total porosity of the bed and particles (ε) was calculated as $(1 - (\rho_a/\rho_t))$. The mean particle diameter (d_p) was calculated according to Silva et al. [18]; the length, width and thickness of 20 randomly selected seeds were measured, and the geometric mean of these three measurements was calculated.

For the analysis of its percentage composition, the raw material was comminuted in a knife mill (Tecnal, TE-631, Piracicaba, Brazil). The moisture, protein and ash contents were determined according to the official methods published by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [35], and the total lipids, according to Less [36] and Gurr [37]. The carbohydrate content was determined as the balance.

2.3. Chemical analysis

The bixin contents of the seeds and of the extracts were determined according to Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Monographs [38]. Bixin was exhaustively extracted from the seeds with acetone (Merck, Darmstadt, Germany), i.e. until the seeds were colorless [39], by maceration at room temperature (293 K). The SFE extracts were diluted in acetone to yield suitable concentrations of bixin for analysis. Sample absorbance was measured at 487 nm with a UV-vis spectrophotometer (U-3010, HITACHI, Tokyo, Japan), and the bixin content was calculated according to the Lambert–Beer law. using $E^{1\%} = 3090$ [38].

according to the Lambert–Beer law, using $E_{1 \text{ cm}}^{12} = 3090$ [38]. The contents of tocols, tocopherol, and tocotrienols were determined according to American Oil Chemists' Society – AOCS 88

C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles / J. of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95

method Ce 8–89 [40]. The isomers (alpha, beta, gamma, and delta tocotrienols and tocopherols) were quantified using a standard curve prepared under the same conditions as that of the analyses. HPLC equipped with a Hibar RT column (250 mm × 4 mm × 5 μ m, Li Chrosorb Si 60, Merck, Darmstadt, Germany) and fluorescence detector (Perkin Elmer, series 200, Norwalk, USA) was used with excitation at 290 nm. The mobile phase was hexane/isopropyl alcohol (99:1, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min.

The quantifications of both bixin and total tocols were performed in duplicate.

2.4. Supercritical fluid extraction procedure

The extraction assays were done in a commercial SFE system equipped with an electric oven and a pneumatic pump (Spe-ed SFE Laboratory System, 7071, Applied Separations, Allentown, USA), and 6.57 mL and 290 mL extraction vessels (Thar Designs, CL 1373, Pittsburg, USA). The solvent used was carbon dioxide (99.9% CO₂, Gama Gases Especiais Ltd., São Bernardo do Campo, Brazil). The CO2 was cooled at 263 K by a thermostatic bath (Marconi, MA-184, Piracicaba, Brazil) before reaching the pump. The vessel was assembled into the oven which was maintained at the preselected temperature. The extract was collected in a 100 mL amber glass vial immersed in ice bath at ambient pressure. The total CO₂ was measured with a flow totalizer (LAO, model G0,6, Osasco, Brazil); the CO₂ was not recirculated. After the extraction, the glass vial remained in a desiccator for ten minutes to allow for the complete elimination of CO2. The total extract mass was determined as the sum of the extract obtained during the extraction and the extract recovered in the cleaning process. The cleaning process consisted of recovering extract on the tubing line leading out of the extraction vessel with acetone. The glass vials (used in both the extraction and cleaning processes) were flushed with N2 and stored at 255 K until analysis.

2.4.1. Global yield isotherms (GYIs)

The GYIs were determined at 313 and 333K and 20, 31 and 40 MPa in a 290 mL extraction vessel. The extraction bed consisted of whole annatto seeds, and its apparent density was held constant. The SFE process was performed with cycles of CO₂ pressurization, static extraction and a rapid depressurization step before beginning the dynamic extraction step (Fig. 1): the system was pressurized to the operating pressure, and after the static extraction period, the closed valve was quickly and completely opened to allow rapid depressurization to occur. Three cycles of pressurization, static extraction and depressurization were used. The pressurization and depressurization phases took 2 and 4 min, respectively, for all the studied conditions. The static extraction time was 20 min. In the dynamic extraction step, the system was again pressurized to the operating pressure, and after a static period of 10 min to allow the system to equilibrate the pressure, the extraction was performed until the ratio of solvent mass to feed mass (S/F) was 35, with a constant flow rate. According to Meireles [19], since the exhaustive extraction can spend hours of experimental of work, values of S/F greater than 15 are sufficiently good for the selection of the operating temperature and pressure. And when the GYI are determined at a selected ratio of S/F it should be denoted as $X_{0.S/F}$ [19]. We determined the total amount of extractable solute from a known amount of annatto seed, at each predetermined pressure, temperature, and S/F = 35, calculated as the ratio between the total solute mass and the mass of feed on a dry basis (d.b.), and it was denoted as $X_{0,S/F=35}$.

To compare the yields of SFE with conventional process, a Soxhlet extraction was done using $(5.11 \pm 0.01) \times 10^{-3}$ kg of whole annatto seeds and $180 \, \text{cm}^3$ of petroleum ether. The extraction length was 360 min and the assay was duplicated.

2.4.2. Overall extraction curves (OEC) and modeling

The OEC was determined at the temperature and pressure optimized with respect to higher extract content, using a 290 mL extraction vessel. The resulting curves were fitted to a spline containing three straight lines, namely, the CER (constant extraction rate), the FER (falling extraction rate) and the DC (diffusion controlled) periods, using the procedures PROC REG and PROC NLIN of SAS software package (SAS Institute Inc., version 9.2, Cary, USA), following Rodrigues et al. [41].

The parameters obtained from the spline model were used in the equation described by Meireles [19] to calculate the mass of extract (m_{Ext}) , or yield, in a given extraction time (t), as $m_{EXT} = (b_0 - C_1b_1 - C_2b_2) + (b_1 + b_2 + b_2)t$, where b_1, b_2 and b_3 are the linear coefficients of the fitted lines, and C_1 is the intercept of the first (CER) and second (FER) lines, and C_2 is the intercept of the second (FER) and third (DC) lines. C_1 and C_2 represent the length of CER (t_{CER}) and FER (t_{FER}) periods, respectively.

In t_{CER} , the m_{EXT} was calculated to obtain the kinetic parameters relative to the CER period: R_{CER} (extract yield, %), M_{CER} (extract mass-transfer rate, kg/s), Y_{CER} (the mass ratio of extract in the supercritical phase at the bed outlet, kg extract/kg CO₂), obtained by dividing M_{CER} by the mean solvent flow rate for the CER period [19]. S/F_{CER} (solvent mass to feed mass, kg CO₂/kg raw material) was obtained by multiplication t_{CER} by the average solvent flow rate for the CER period and dividing by the feed mass. These data were used for estimate of COM.

2.5. Economic evaluation

According to the Association for the Advancement of Cost Engineering International, the COM estimation can be divided into five classes (1-5). The class 5 is based on the lowest level of project definition, while the estimate class 1 is more next to the final definition of the project, that is, closer to the real value of COM [22]. The SuperPro Designer® software (version 6.0, Intelligent, Inc.) estimate COM that can be classified as cost class 2–3 [42]. Thus, the small amount of experimental data and the relatively low level of project definition make it possible to obtain initial estimates of COM. For accurate cost estimation, the performance of an industrial-scale extractor should be estimated. The Super-Pro Designer[®] was used to estimate the COM of the SFE extract according to a process developed by Prado et al. [26]; the model consisted of an industrial-scale unit with one CO₂ reservoir, a heat exchanger, one CO₂ pump, two extraction columns, one flash tank, and one CO₂ compressor for recycling CO₂ (Fig. 2). The process was designed to run 7920 h per year, which corresponds to 330 days per year of continuous 24h shifts. We have chosen these working conditions to make the results comparable to literature results [26,34,43,44].

The selected scale-up criterion consisted of maintaining a constant S/F ratio. This criterion assumes that the process will have identical performance with respect to yield at the laboratory and industrial scales if the same process conditions are used (temperature, pressure, extraction time, and bed density) [32,43,44]. The mass of feed in the extractor in each batch was determined by taking into account the apparent bed density. The mass of solvent was determined by the S/F ratio. A CO2 loss of 2% was assumed; this corresponds to the CO₂ that can be trapped into the particles that are removed from the extractor or dissolved in the extract after the flash separation [30,44]. The flash tank conditions were 4 MPa and 303 K, selected considering the impact of manufacturing costs of a non-ideal separation step and the possibility of thermal degradation of the extract [33]. Furthermore, an operating pressure close to the pressure in the CO₂ reservoir would diminish the expenses related to the recompression for further reutilization [33,45].

C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles / J. of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95



Fig. 1. Scheme of pressure profile extraction method and dynamic extraction step used to determine the GYI: three cycles of CO₂ pressurization, static extraction and a rapid depressurization step before beginning the dynamic extraction step.

2.5.1. Cost of manufacturing

The COM provides analysis of data that can be compared with the costs of conventional extraction processes, creating new attractions for the development of annatto industries. In addition to may indirectly benefit farmers from the producing region, generating jobs and income. Thus, in order to transfer this technology to the industry an analysis of the economic feasibility must be done [30].

The COM is influenced by direct costs, that are directly dependent on the production rate as raw materials, lost solvent during the process, demand for steam and cooling water required for the evaporator and condenser, electricity, and operational labor; fixed costs, that involves expenses with equipment, installation, depreciation, taxes and insurance, etc.; and general expenses, that consists of the administrative cost, sales expenses, research and development, among others [30,42]. The software algorithm estimated the COM as the sum of five costs, similar to those described by Turton et al. [42] a fixed cost of investment (F_{CI}), an operating labor cost (C_{OL}), a utility cost (C_{TT}), the cost of waste treatment (C_{WT}) and the cost of the raw material (C_{RM}).

The F_{CI} involves expenses for equipment. The studied process capacities were 0.1 and 0.5 m³, costing approximately US\$ 450,000 and US\$ 1,150,000 (Chinese market prices) [26], considering an annual depreciation rate of 10%. The C_{OL} is related to the operators of the extraction units. In these units, two and three operators

per shift are needed, respectively, with a C_{OL} of US\$ 6.00/h. The C_{UT} considers the energy use involved in the solvent cycle for steam, cold water, and electricity. The cost of electricity used was 0.092 US\$/kWh (the price charged by the electric power company for industries in 2008, CPFL, Sao Paulo, Brazil) [26]. The C_{RM} consists of the raw material cost and the cost of CO₂ lost during the process. At the time of this writing, the price of annatto was US\$ 2.00/kg and CO₂ was US\$ 0.15/kg. Here, C_{WT} was considered to be zero because the SFE leaves no solvent residue, and the waste generated by the process is the extracted raw material, which is harmless and clean and may be reused in other applications or simply disposed of as ordinary vegetable waste.

2.6. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test were used to verify whether there was an effect of the studied variables on the results obtained and which results showed statistically significant differences (*p*-value = 0.05). The SAS software package (9.2, SAS Institute, Inc.) was used for the statistical analyses. The results of the ANOVA *F*-test were reported as the *F* statistic, the *p*-value calculated for the *F*-distribution with (v1, v2) where v1 is the degrees of freedom of the model and v2 is the degrees of freedom of the residues (=*p*-value[v1, v2]), and the correlation coefficient (R^2).



Fig. 2. Flowsheet of the SFE process designed in the SuperPro Designer simulator used for economic analysis.

90

3. Results and discussion

3.1. Characterization of annatto seeds

The chemical profile of the Piave variety was (4.9 ± 0.2) % bixin, $(12.3 \pm 0.1)\%$ moisture, $(6.2 \pm 0.1)\%$ ash, $(3.7 \pm 0.0)\%$ lipids, (12.1 ± 0.2) % protein, and 65.7% carbohydrate. The values obtained in this study are similar to those found in the literature for annatto seeds: 1.0-6.3% bixin, 9.6-13.3% moisture, 5.4-6.9% ash, 2.0-4.8% lipids, 12.1-17.0% protein, and 70.0% total carbohydrate [6,18,46-48]. Variations may be due to the environmental conditions of the production region [6], such as the harvest season [49]. Furthermore, bixin levels, moisture, and protein decrease during storage [49-51].

A previous study of different annatto varieties showed significant differences in levels of bixin, moisture and lipids, but no correlations were observed among them [6]. However, low seed moisture can increase handling losses due to friction [49]. For industries that use the bixin extraction method involving saponification of the pigment, the process is more efficient when the fat content is lower. For those industries that employ the extraction method using vegetable oil, a higher lipid content results in a more efficient process [6]. Lower bixin content (bixin < 1.8%), is out of specification for commercial extraction purposes [49] because it decreases the industrial yield and quality of the final product [6].

Studies of annatto SFE showed an improvement in bixin yield when compared to the SFE of pure bixin [14,18]. The conclusion was that the oil contained in the seeds significantly increased the efficiency of the process. The Piave variety had both higher bixin and oil contents.

The physical characteristics, i.e. seed diameter (d_p) and true density (ρ_t), were determined; the results, listed in Table 1, are in line with other values found in the literature: $3.5-3.9 \times 10^{-3}$ m [15,17,18] and 1145-1220 kg/m³ [17,18], respectively.

3.2. Technical analysis

3.2.1. Global yield isotherms (GYIs) at S/F = 35

Preliminary kinetic experiments were performed to select the most suitable process parameters for a determination of the GYIs. Two kinetic curves, KC1 and KC2, were determined in a 6.57 mL extractor vessel; the results are presented in Table 1. In both experiments, the beginning of the decreasing the easily accessible solute in surface of the particles, FER period, was observed at S/F < 30. The extract yield $(g/100\,g\,raw\,material, d.b.)$ was similar when the same S/F ratio was reached (Fig. 3b). Increasing the flow rate resulted in similar yields, but it reduced the process time (Fig. 3a). It was observed that at the last stage of kinetic curve, the DC period, the raw material was not exhausted (Fig. 3). In order to obtain the true value of X_0 , excess solvent must be used for the determination of GYI [19]. Therefore, the highest flow rate was adopted to reduce process time and S/F = 35 ratio was used.

The operational data for the GYIs and the extract and bixin yields (mg/g raw material, d.b.) obtained at 313 and 333 K when the solvent ratio reached S/F = 35 are presented in Table 1.

The average extract yield ranged from (18 ± 2) to (22 ± 4) mg/g d.b. Although the temperature and pressure did not influence the yield significantly (F = 0.92; p-value_{F[5,6]} = 0.55; $R^2 = 0.52$) (Table 1),</sub> an increasing trend of extract yield was observed with increasing temperature at constant pressure. Comparing the extract content obtained by the SFE process with the extract content obtained by the Soxhlet method, the SFE process efficiency ranged from 43 to 52% based on the recovery of the extract.

The bixin yields ranged from (0.16 ± 0.01) to (0.40 ± 0.04) mg/g d.b. The bixin content increased with increasing temperature at both 31 and 40 MPa and tended to decrease when the temperature

able 1 hysical characteristics of th	ie raw materials, op	erating parameters of	f the process, and expe	rimental results.					
Raw material									
$d_{\rm p}~(10^{-3}~{ m m})$ $ ho_{ m t}~({ m kg/m^3})^{ m a}$		3.7 ± 0.2 1111 ± 16							
Experimental data	KC1	KC ₂	GYIc						OEC
T(K)	333	333	313			333			333
P (MPa)	31	31	20	31	40	20	31	40	40
$Q_{CO2} (\times 10^{-5} \text{ kg/s})^{\text{b}}$	17.3 ± 0.3	5.5 ± 0.0	19.6 ± 0.1	19.9 ± 0.1	19.8 ± 0.1	19.71 ± 0.04	19.8 ± 0.2	19.73 ± 0.01	18.8 ± 0.3
S/F ^b	482 ± 7	50 ± 0	35	35	35	35	35	35	24.95 ± 0.01
Time (min)	240	60	60	60	60	60	60	60	420
Extract (mg/g d.b.) ^b	37 ± 3	25 ± 2	$18 \pm 2^{\rm A}$	$20 \pm 3^{\rm A}$	$20 \pm 2^{\rm A}$	$20.66\pm0.01^{\mathrm{A}}$	$20.3\pm0.3^{ m A}$	$22 \pm 4^{\rm A}$	35.8 ± 0.4
Bixin (mg/g d.b.) ^b	0.7 ± 0.1	nd	$0.17\pm0.01^{\mathrm{B}}$	$0.2\pm0.1^{ m AB}$	$0.3\pm0.1^{ m AB}$	$0.16\pm0.01^{\rm B}$	$0.33\pm0.04^{\rm AB}$	$0.40\pm0.04^{\rm A}$	0.7 ± 0.01
$M(g)^{b}$	4.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7	20.1 ± 0.1	20.4 ± 0.1	20.3 ± 0.1	20.27 ± 0.04	20.2 ± 0.1	20.30 ± 0.01	190.3 ± 0.7
$\rho_{\rm a} (\rm kg/m^3)^b$	686 ± 0	686 ± 0	691 ± 4	701 ± 2	697 ± 2	695 ± 1	693 ± 3	0 ± 696	656 ± 2
Eb	0.38 ± 0.1	0.38 ± 0.1	0.38 ± 0.1	0.37 ± 0.1	0.37 ± 0.1	0.37 ± 0.1	0.38 ± 0.1	0.37 ± 0.1	0.41 ± 0.1
l _p , mean particle diameter;	$\rho_{\rm t}$, true particle den	nsity; T, temperature;	P, pressure; Q _{C02} , CO ₂ 1	flow rate; S/F, solvent-	to-feed ratio; M, raw	material mass; $ ho_{ m a}$, bed a	pparent density; ε , por	osity; nd, not determine	ų

Values are reported as the mean \pm standard deviation of 10 repetitions.

Values are reported as the mean \pm amplitude of two determinations.

Means in the same row with the same letter are not significantly different

71





Fig. 3. Kinetic curves obtained at 333 K and 31 MPa using a 6.57 mL extraction vessel with 4.5 g of annatto seeds; (\triangle) KC₁: 17.3 × 10⁻⁵ kg/s, 240 min, S/F = 482; (\bigcirc) KC₂: 5.5 × 10⁻⁵ kg/s, 60 min, S/F = 50.

was increased at 20 MPa. The yield was significantly influenced (Table 1) when the pressure increased from 20 MPa to 40 MPa at 333 K, and a significant difference in yield was observed between extractions at 313 K/20 MPa and at 333 K/40 MPa (F=9.25; p-value_{F[5,6]} = 0.01; R^2 = 0.92). The SFE process efficiency ranged from 0.3 to 0.8% with respect to the total mass of bixin in the seeds.

Chao et al. [15] analyzed the feasibility of extract and bixin extraction with supercritical CO2 using the dynamic method at 20.7 MPa/323 K, 31 MPa/333 K, and 34.5 MPa/323 K. They observed that when the pressure was increased from 20.7 to 34.5 MPa at 323 K, the extract yield decreased and the bixin content increased. When the temperature was increased to 333K and the pressure decreased to 31 MPa, the process efficiency related to extract and bixin also increased [15]. Silva et al. [18] determined the yields of pure bixin and bixin extracted from annatto seeds using supercritical CO₂ for 24 h with the static method at 10-35 MPa and 303-323 K. These authors observed that at pressures above 28 MPa, the bixin content increased with increasing temperature at constant pressure. Below 28 MPa, the bixin content decreased with increasing temperature at constant pressure. Nobre et al. [52] also observed a strong influence of temperature in the level of pure bixin extracted at pressures above 20 MPa.The same behavior was observed in this study (Table 1).

The pressures where the solubility will not be a function of temperature is known as the crossover point and it depends on the solute composition [34]. For bixin, Silva et al. [18] found the crossover pressure at 28 MPa. In this work, the crossover pressures for both extract and bixin can be indicated at 31 and 20 MPa, respectively. For high pressures, the solvent density changes only slightly with temperature, and as a result the main effect will be the solute vapor pressure. In this work, the vapor pressure of the bixin had the stronger effect than the solvent density for pressures above 20 MPa. For low pressures, the solute solubility decreases with temperature

because the effect of temperature on the solvent density is stronger than on the solute vapor pressure [34].

The extent of interactions between the extract and CO_2 can be measured experimentally by determining the GYI, as the effects of temperature and pressure in the solvent density and solute vapor pressure can alter the solvent solubilization power [53]. Therefore, in the annatto + bixin + extract + CO_2 system, the effect of the solute vapor pressure prevailed when the temperature was increased at pressures above 20 MPa.

3.2.2. Study of static extraction time

Prior studies of SFE with CO_2 decompression steps reported improved yields [54–57]. The SFE of cashew (*Anacardium occidentale*) nutshell liquid with intermediate steps of CO_2 depressurization during the dynamic extraction step increased yields and decreased the amount of CO_2 needed for extraction [54]. The SFE with CO_2 plus ethanol as a solvent to obtain indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* increased yield when rapid CO_2 depressurization steps were applied during dynamic extraction [55]. The optimization of extraction process by applying rapid CO_2 depressurization is attributed to the effects of pressure release in modifying the cell membrane due to rapid gas expansion, increasing the availability of extractable substances in the solvent [54,56].

The static extraction time and the number of cycles (pressurization/static extraction/depressurization) performed before the dynamic extraction step were studied to determine whether both time and the number of cycles caused effects in the bixin yield. The bixin content was analyzed for the steps of static and dynamic extraction, and the residual fraction obtained in the cleaning of the tubing line attached to the extraction cell. The experimental conditions were 333 K/31 MPa, a 10 min static period, a mean flow rate of $(17 \pm 1) \times 10^{-5}$ kg/s and S/F=35 in the dynamic extraction step.

SFEs with 1, 2 and 3 cycles produced bixin yields of 0.24, 0.28 and 0.30 mg/g d.b., respectively. It was observed that larger number of cycles led to greater CO₂ use, and consequently, a higher yield was obtained. SFEs with 0, 10 and 20 min of static extraction time resulted in bixin yields of 0.17, 0.26 and 0.24 mg/g d.b., respectively. Because these cycles were not performed before the dynamic extraction (0 min static extraction), no additional CO₂ was used, hence lower bixin yields were obtained. We also observed that a greater number of cycles resulted in more bixin being retained in the process line. Thus, it was verified that the application of the cycles with rapid CO2depressurization did not increase the bixin yield (F = 7.47; p-value_{F[2,3]} = 0.12; $R^2 = 0.91$), which was higher</sub> only when a higher amount of CO₂ was used. Likewise, the static extraction time did not influence the bixin yield ($F_{[2,3]} = 1.20$; pvalue_{*F*[2,3]} = 0.49; R^2 = 0.64). Therefore, the effects attributed to the rapid O_2 depressurization in modifying the cell membrane did not improve the efficiency of the process for annatto seeds.

Table 2 shows the content of alpha, beta, gamma, and delta tocotrienols and tocopherols in the SFE, Soxhlet extracts, and the commercial sample. As can be observed α -tocopherol and β tocotrienol were not observed in any of the samples. Trace amounts of β -tocopherol and δ -tocopherol were detected at 333 K and pressures of 31 and 40 MPa. The largest amount of δ -tocotrienol was obtained at 333 K and 20 MPa (Table 2). The amounts obtained were significantly different (*F* = 7.94; *p*-value_{*F*[5,6]} = 0.02; R^2 = 0.91) from the amounts detected in the other operating conditions. At this optimum condition the amount of δ -tocotrienol was larger than the total tocols presented in palm-pressed fiber oil obtained at 30 MPa and temperatures of 323 and 353 K [58]. Literature reports that the optimum conditions to obtain total tocols are 313 K and 22 MPa [59]. Only γ - and δ -tocopherols and tocotrienols were detected in the commercial sample, nonetheless, in small amounts. The commercial sample was obtained by extraction with alkaline solution, this may explain the poor content of tocols and tocotrienols. Only

n	2
9	z

Table 2

C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles / J. of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95

Tocols isomers	Commercial sample	Soxhlet extract	SFE extracts (K/MPa)						
			313/20	313/31	313/40	333/20	333/31	333/40	
α-Τ3	-	2.14 ± 0.07	-	-	-	-	-	-	
γ-T3	0.553 ± 0.004	-	1.97 ± 0.04	1.57 ± 0.05	1.63 ± 0.07	1.6 ± 0.2	1.79 ± 0.06	1.68 ± 0.04	
δ-T3 ^b	2.82 ± 0.03	13.10 ± 0.05	$14.6\pm0.4^{\text{A}}$	11.7 ± 0.2^{B}	12.3 ± 0.6^{B}	12 ± 1^{B}	12.9 ± 0.1^{B}	$12.2\pm0.2^{\text{B}}$	
β-T1	-	-	-	-	-	-	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.01	
γ-T1	0.08 ± 0.01	-	-	-	-	-	-	-	
δ-T1	0.31 ± 0.01	-	-	-	-	-	0.36 ± 0.04	0.36 ± 0.06	

la Caublat d CEE auto

Values are reported as the mean ± amplitude of two determinations.

Means in the same row with the same letter are not significantly different.

 $\alpha\text{-}$ and $\delta\text{-}tocotrienols$ were present in the Soxhlet extract obtained from whole seeds: the amount of δ -tocotrienols was smaller than that of the SFE extracts obtained at 313 K and 20 MPa.

3.2.3. OEC and modeling

The OEC was determined at temperature and pressure optimized with respect to higher extract yield (Table 1). Fig. 4 shows the extract yield and bixin concentrations obtained at 333 K/40 MPa. The three regions of a typical OEC can be observed for the extract content. While for the bixin content, the behavior of OEC can indicate that the mass-transfer mechanism is located in the fluid phase (solvent+solute). The yield of the Soxhlet process for the whole seeds was (3.5 ± 0.1) % for an S/F = 22.5 while the yield for the SFE process was $(3.58 \pm 0.04)\%$ for an S/F = 25; comparing these yields the efficiency of the SFE process is approximately 100%. To confirm this data, a Soxhlet extraction was done in the whole seeds after the SFE process and the yield obtained was (0.9 ± 0.1) %. It is interesting to observe that the total lipid content of the milled seeds was 3.7% a value close to that obtained for the SFE process. The surface of the annatto seeds is irregular; therefore, there are spots of difficult access to the solvent. According to prior studies on the solubility of pure bixin, the yield of annatto bixin was significantly improved by the presence of the seed oil [14,17,18] and as the concentration of the extract decreased, the solubility of bixin in the seeds



Fig. 4. Overall extraction curve (OEC) of extract (()) and bixin content (() in CO₂ at 333 K and 40 MPa using a 290 mL extraction vessel with 190.3 ± 0.7 g of annatto seeds; $18.8 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ kg/s, 420 min, S/F = 24.95 ± 0.01 .

became similar to that of pure bixin [14,17]. They concluded that the decrease of the bixin concentration in the solvent was probably due to the decrease of the extract available on the surfaces of the seeds; after this bixin is depleted; further extraction becomes controlled by diffusion and the solubility of bixin in supercritical CO₂. It can be observed (Fig. 4) that the bixin content was not influenced by the amount of extract for studied conditions in this work, once the bixin content did not vary along extraction time.

The concentration of bixin in the solvent obtained in the OEC (0.03 mg/g CO_2) with S/F = 25 is in agreement with those found in the literature (0.001–0.05 mg/g CO₂) [14–18]. Under these conditions, high-purity bixin in a relatively high yield was obtained after one hour of extraction. Fig. 5 shows the recovery of extract and bixin content with respect to total extract obtained by Soxhlet method and total bixin content of the seeds, respectively. The low yield of bixin and almost total recovery of the extract of annatto seeds show that the SFE process can be used to obtain annatto extract with very low content of bixin.

At the end of the extraction, in unpacking the bed, it was observed that the bixin powder was easily detached from annatto seeds at the slightest friction. Therefore, the SFE apparently almost completely removed the annatto lipid fraction that bound the bixin to the seeds. Despite the low solubility of the pigment in supercritical CO₂, this additional bixin recovery can add value to the extract, affecting the specific COM [21]. Furthermore, a recent review showed an increase in studies on annatto and new discoveries with respect to the composition of the seed extract [1]. Besides bixin, nutraceutical substances [11,60] and valuable terpenes are present [15], adding high value to the extract.

To analyze the economic feasibility of the SFE process for annatto extraction, the process time (batch) that results in the highest yield with the lowest COM must be determined. For this purpose, the OEC were fitted to a spline and the following kinetic



Fig. 5. Recovery of extract () with respect to total extract obtained by Soxlet method, and recovery of bixin content (\Diamond) in relation to total bixin content in the seeds

C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles / J. of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95



Fig. 6. Specific COM (US\$/kg) by process time at 333 K/40 MPa, 0.005 m^3 .

parameters were obtained: t_{CER} and t_{FER} were 25 and 108 min, respectively. The average solvent flow rate was 19.5×10^{-5} kg/s and at the corresponding S/F = $1.5 M_{CER}$ was 1.98×10^{-6} kg/s, Y_{CER} was 0.01 kg/kg_{CO2}, and R_{CER} was 1.5%, d.b.

3.3. Economic evaluation: COM of annatto extract

Initially, the COM was estimated at 333 K and 40 MPa considering pilot plant containing two vessels of 0.005 m³ with bed density of 656 kg/m³. In these conditions of temperature and pressure the highest extraction yield was obtained. This way, the maximum values of COM would be calculated since the energy requirements are larger as compared to the others conditions studied. Thus, we can evaluate what would be the uppermost value that the COM may have. Consequently, in the other process conditions, the COM will be smaller.

According to Meireles [19] the most favorable process time from the economic point of view is located between t_{CER} and t_{FER} . The estimation of the COM of the extract at each point of the extraction curve (Fig. 6) showed that the lowest COM values of 270.73–296.78 US\$/kg were obtained for process time between 10 and 40 min. According to Leal [22], the intersection of the lines CER and DC, at t_{CER2} , can also be used as a good estimate of the process time for calculating the COM. However, these COMs are less than at t_{CER2} .

Considering that even small amounts of bixin would add value to the extract, the specific cost was estimated for bixin. In this study, the bixin contents in the extract obtained at t_{CER} , t_{CER2} and t_{FER} were 0.6, 0.7 and 1.03%, respectively. If the process time was increased from $t_{CER} - t_{CER2}$ (to 15 min), the extract mass would increase by 25%, with a corresponding increase in the COM of 8% (going from 270.73 to 296.78 US\$/kg). The specific cost of the bixin fraction would decrease from 45.62 to 42.40 US\$/g, due to its mass increase to 80% in the extract. If this time were further increased by 32%, whereas the COM would increase by 57% (going from 296.78 US\$/kg). The specific cost of the bixin fraction would increase from 45.615 US\$/kg). The specific cost of the bixin fraction would increase from 42.40 to 45.16 US\$/g. Based on this analysis of the COM, the process time for the most viable process is $t_{CER2} = 40$ min.

A preliminary study of annatto extraction was performed by Albuquerque and Meireles [61] using data found in the literature [15]. The process was simulated at 333 K and 31 MPa with a process time of 250 min. The extract yield was 1.89% for the ratio S/F = 40. The COM of the extract was simulated at both laboratory and industrial scales with capacity (m^3) of 0.005, 0.1, and 0.5 and cost of US\$ 200,000; 750,000; and 2,000,000, respectively (American market prices). The estimated COMs were 1781.62 US\$/kg, 382.00 US\$/kg



Fig. 7. COM (US\$/kg) of annatto extract for various process times for 300 K/20 MPa and the contribution of each component for vessel capacity of 0.005 m^3 .

and 258.54 US\$/kg, respectively. The study showed that F_{CI} (76%) and C_{OL} (20%) comprised the majority of the COM for the laboratoryscale unit, whereas the C_{RM} was only 3%. When the scale-up (from 0.1 to 0.5 m³) was simulated, the C_{RM} increased (from 14 to 22%), and the F_{CI} decreased (from 70 to 62%) but remained the major share in the COM, probably due to the high process time. The C_{UT} and C_{OL} together comprised less than 10% of COM at both industrial scales.

The optimized conditions of temperature and pressure, with respect to higher extract content, used to simulate the SFE process for annatto influenced the composition of the COM (Fig. 7). For the laboratory scale (0.005 m³/US\$ 100,000), with the optimal process time (40 min) the ratio S/F was 2.4 and the yield 2.12%; the bed apparent density was 656 kg/m³ and the estimated COM was 292.5 US\$/kg. The C_{RM} decreased from 80 to 33% when the process time increased from 5 to 40 min because the number of batches also decreased. The F_{CI} increased (from 4 to 14%) but did not constitute the major contribution to COM. Comparing the estimated COM values with literature data [61], as the process time was decreased, the number of batches increased, consequently increasing the demand for raw material; this increased the C_{RM} from 3 to 33%.

The production rate of the extract also increased with the optimized time and scale-up; hence, the COM of extract decreased (Fig. 8). The C_{RM} increased from 78 to 89% when the capacity was increased from 0.1 to 0.5 m³. The major contribution of the C_{RM} to the COM was also observed in prior studies [22,31]. The COMs estimated for the units with capacities of 0.1 and 0.5 m³ were 124.58 and 109.27 US\$/kg of extract, respectively, corresponding to 17.8 and 15.6 US\$/g for bixin. Compared to the COMs of the extracts estimated from literature data [61], the optimization of the SFE process resulted in decreases, by 33% and 42%, respectively, for both industrial units. The estimated COMs for the extract are within



Fig. 8. COM (US\$/kg) of annatto extract for various process times for 300 K/20 MPa and the contribution of each component for vessels capacities of 0.1 and 0.5 m³.

94

the expected range for SFE extracts, ranging from 25–7000 US\$/kg depending on the raw material cost [31]. Because industrial annatto seeds are ready for extraction on delivery and require no pretreatment for the SFE process, this cost should not be included in the C_{RM} .

4. Conclusions

In this study, the SFE process parameters were optimized to estimate the COM of annatto extract. The highest yield of extract and bixin were obtained at 333 K and 40 MPa. In these conditions, the COM was estimated in order to obtain the highest value that the cost may have. The optimization of the process decreased the COM of the extract, and the bixin yield was reduced by only 0.7%. The efficiency of SFE for obtaining the extract was 85%, and the seeds were almost completely degreased. Process conditions for low yields of bixin can be selected so as to obtain the maximum amount of extract with the lowest level of pigment possible, enabling subsequent reextraction of bixin from the seeds with a generally recognized as safe (GRAS) solvent. This fractionation can be performed by SFE and pressurized solvent extraction (PLE), applying the supercritical antisolvent (SAS) process to recover the solvent and purify the extract. We observed that the time of the extraction process impacted both the COM and the quality of the extract. The specific COMs of the extract and bixin, for industrial units with capacities of 0.1 and 0.5 m³ were estimated as 124.58 and 109.27 US\$/kg for the extract and 17.8 and 15.6 US\$/g for bixin, respectively. Finally, due to the characteristics of the defatted seeds (see the Graphical Abstract) perhaps it would be possible to obtain pure bixin by a very simple process such as mechanical abrasion.

Acknowledgments

C.L.C. Albuquerque would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: 143092-2008-1) for the Ph.D. fellowship. The authors acknowledge the financial support of CNPq and the São Paulo Research Foundation (FAPESP: 2009/17234-9). The authors are grateful to Dr. Eliane G. Fabri from IAC and Mr. Alejandro Espinola from Kraki & Kratschmer Ltda. for donating the annatto seeds and the commercial annatto extract, respectively.

References

- C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles, Trends in annato agroindustry: bixin processing technologies and market, Recents Patents on Engineering 5 (2011) 94–102.
- [2] M. Furtado, Colorants food industry adheres to the natural colorants. <http://www.quimicaederivados.com.br/index.php?sessao=reportagem&id= 534&codigo_revis=421>.
- [3] C.F.O. Franco, EMEPA extracts the highest colorant content from annatto in Brazil. http://www.paraiba.pb.gov.br/index.php?option=com_content&task =view&id=24004&Itemid=2>.
- [4] M.A.A. Meireles, P.F. Leal, P.T.V. Rosa, Extraction process and purification process in series of active compounds and colorants from solid matrices using supercritical CO2: bixin from annatto, Patent BRPI0605425, 2008 (in Portuguese).
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Annatto extracts: chemical and technical assessment, in: 67th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, Italy, 2006 ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/cta.annatto.pdf.
 [6] P.R.N. Carvalho, M.G. Silva, E.G. Fabri, P.E.R. Tavares, A.L.M. Martins, L.R. Spatti,
- [6] P.R.N. Carvalho, M.G. Silva, E.G. Fabri, P.E.R. Tavares, A.L.M. Martins, L.R. Spatti, Bixin and lipids content in annatto seeds from collection of the Instituto Agronômico (IAC), Bragantia 69 (2010) 519–524.
- [7] P.R.N. Carvalho, The colorants from annatto, in: Proceedings of the 2nd National Meeting of the Annatto Production Chain, Campinas, Brazil, 2010 (Full paper available in 9th ISSF CD-ROM (JSBN 978-85-7029-105-9)).
- [8] M. Scotter, The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review, Food Additives Contaminants 26 (2009) 1123–1145.
- [9] N. Frega, M. Mozzon, F. Bocci, Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography–mass spectrometry, J. American Oil Chemists' Society 75 (1998) 1723–1727.

- [10] B. Tan, Appropriate spectrum vitamin E and new perspectives on desmethyl tocopherols and tocotrienols, J. American Nutraceutical Association 8 (2005) 35–42.
- [11] B. Tan, J. Foley, Tocotrienols and geranylgeraniol from Bixaorellana byproducts, Patent US6350453, 2002.
- [12] R.C. Chisté, A.Z. Mercadante, A. Gomes, E. Fernandes, J.L.F.C. Lima, N. Bragagnolo, In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species, Food Chemistry 127 (2011) 419–426.
- [13] W.F. Castro, L.R.B. Mariutti, N. Bragagnolo, The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage, Food Chemistry 124 (2011) 126–131.
- [14] A.J. Degnan, J.H. Von Elbe, R.W. Hartel, Extraction of annatto seed pigment by supercritical CO₂, J. Food Science 56 (1991) 1656–1659.
- [15] R.R. Chao, S.J. Mulvaney, D.R. Sanson, F. Hsieh, M.S. Tempesta, Supercritical CO₂ extraction of annatto (Bixaorellana) pigments and some characteristics of the color extracts, J. Food Science 56 (1991) 80–83.
- [16] S.G. Anderson, M.G. Nair, A. Chandra, E. Morrison, Supercritical fluid carbon dioxide extraction of annatto seeds and quantification of trans-Bixin by high pressure liquid chromatography, Phytochemical Analysis 8 (1997) 247–249.
- [17] B.P. Nobre, R.L. Mendes, E.M. Queiroz, F.L.P. Pessoa, J.P. Coelho, A.F. Palavra, Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from Bixaorellana seeds (experiments and modeling), Brazilian J. Chemical Engineering 23 (2006) 251–258.
- [18] G.F. Silva, F.M.C. Gamarra, A.L. Oliveira, F.A. Cabral, Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide, Brazilian J. Chemical Engineering 25 (2008) 419–426.
- [19] M.A.A. Meireles, Extraction of bioactive compounds from Latin American plants, in: J. Martinez (Ed.), Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds, CRC Press – Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008, pp. 243–274.
- [20] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives, Food Bioprocess Technology 3 (2010) 340–372.
- [21] C.G. Pereira, M.A.A. Meireles, Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction, Flavour and Fragrance J. 22 (2007) 407–413.
- [22] P.F. Leal, Comparative study of cost of manufacturing and functional properties of volatile oils obtained by supercritical fluid extraction and steam distillation, Ph.D. Thesis, University of Campinas. http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver.documento.php?did=537, 2008 (in Portuguese).
 [23] H.J. Navarro-Diaz, G.C. Carvalho, P.F. Leal, J.M. Prado, M.A.A. Meireles, Obtain-
- [23] H.J. Navarro-Diaz, G.C. Carvalho, P.F. Leal, J.M. Prado, M.A.A. Meireles, Obtaining of extracts from Origanum vulgare and Cordiaverbenacea via supercritical technology and steam distillation: process and economical study, in: 9th International Symposium on Supercritical Fluids, Arcachon, France, 2009 (Full paper available in 9th ISSF pen-drive (P157)).[24] J.M. Prado, P.F. Leal, M.A.A. Meireles, Comparison of manufacturing cost of
- [24] J.M. Prado, P.F. Leal, M.A.A. Meireles, Comparison of manufacturing cost of thyme extract obtained by supercritical fluid extraction and steam distillation, in: 9th International Symposium on Supercritical Fluids, 18–20 May 2009, Arcachon, France, 2009 (Full paper available in 9th ISSF pen-drive (P135)).
- [25] I.M. Prado, Use of simulator in scale up and economic viability study of supercritical fluid extraction from natural sources, Master Thesis, University of Campinas. <htp://www.fea.unicamp.br/ alimentarium/ver.documento.php?did=727>, 2009 (in Portuguese).
- [26] I.M. Prado, C.L.C. Albuquerque, R.N. Cavalcanti, M.A.A. Meireles, Use of commercial process simulator to estimate the cost of manufacturing (COM) of carotenoids obtained via supercritical technology from palm and buriti trees, in: 9th International Symposium on Supercritical Fluids, Arcachon, France, 2009 (Full paper available in 9th ISSF pen-drive (P136)).
- [27] P.C. Veggi, Obtaining vegetable extracts by different extraction methods: experimental study and process simulation, Master Thesis, University of Campinas. <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=737>, 2009 (in Portuguese).
- [28] P.C. Veggi, I.M. Prado, N. Vaz, J.M. Prado, M.A.A. Meireles, Manufacturing cost of extracts from jackfruit (Astocarpusheterophyllus) leaves obtained via supercritical technology and solvent extraction, in: 9th International Symposium on Supercritical Fluids, Arcachon, France, 2009 (Full paper available in 9th ISSF pen-drive (P137)).
- [29] P.F. Leal, N.B. Maia, Q.A.C. Carmello, R.R. Catharino, M.N. Eberlin, M.A.A. Meireles, Sweet basil (Ocimum basilicum) extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE): global yields, chemical compositions, antioxidant activity, and estimation of the cost of manufacturing, Food and Bioprocess Technology 1 (2008) 326–338.
- [30] C.G. Pereira, P.V.T. Rosa, M.A.A. Meireles, Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: technical and economical analysis, J. Supercritical Fluids 40 (2007) 232–238.
- [31] P.F. Leal, M.B. Kfouri, F.C. Alexandre, F.H.R. Fagundes, J.M. Prado, M.H. Toyama, M.A.A. Meireles, Brazilian ginseng extraction via LPSE and SFE: global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity, J. Supercritical Fluid 54 (2010) 38–45.
- [32] J.M. Prado, Scale up study of supercritical fluid extraction process in fixed bed, Ph.D. Thesis, University of Campinas. <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver.documento.php?did=1246>, 2010 (in Portuguese).
- [33] T.M. Takeuchi, P.F. Leal, R. Favareto, L. Cardozo-Filho, M.L. Corazza, P.T.V. Rosa, M.A.A. Meireles, Study of the phase equilibrium formed inside the flash tank

C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles / J. of Supercritical Fluids 66 (2012) 86-95

used at the separation step of a supercritical fluid extraction unit, J. Supercritical Fluids 43 (2008) 447–459.

- [34] P.T.V. Rosa, M.A.A. Meireles, Fundamentals of supercritical extraction from solid matrices, in: M.A.A. Meireles (Ed.), Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Application, CRC Press – Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2009, pp. 272–288.
- [35] Association of Official Analytical Chemists-AOAC, Official of Analysis. 16th ed., Washington, 1997.
 [36] R. Less, Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis, Acribia, Zaragosa,
- [56] K. Less, Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis, Actibia, Zaragosa, 1979, pp. 18-20, 103–185.
 [32] M. Levre Bele of Fate in Faced and Nutrition Backing, Flagning, Amsterdam, 1084.
- [37] M.I. Gurr, Role of Fats in Food and Nutrition Barking, Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 46.
 [38] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Combined com-
- [38] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Combined compendium of food additive specifications, in: 67th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, vol. 3, Rome, Italy, 2006, p. 11.
 [39] R.C. Chisté, F. Yamashita, F.C. Gozzo, A.Z. Mercadante, Simultaneous extrac-
- [39] R.C. Chrste, F. Yamashita, F.C. Gozzo, A.Z. Mercadante, Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds, J. Chromatography 1218 (2011) 57–63.
- [40] American Oil Chemists' Society (AOCS), Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th ed., AOCS Press, Champaign, USA, 2004.
- [41] V.M. Rodrigues, E.M.B.D. Sousa, A.R. Monteiro, O. Chiavone-Filho, M.O.M. Marques, M.A.A. Meireles, Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO2: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure plus solvent, J. Supercritical Fluids 22 (2002) 21–36.
- [42] R. Turton, R.C. Bailie, W.B. Whiting, J.A. Shaeiwitz, Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes, 2th ed., Prentice Hall, NJ, 2003.
- [43] P.T.V. Rosa, M.A.M. Meireles, Cost of manufacturing of supercritical fluid extracts from condimentary plants, in: M.A.A. Meireles (Ed.), Extracting Bioactive Compounds for Food Products, CRC Press, Boca Raton, 2009, pp. 388–401.
- [44] P.T.V. Rosa, M.A.M. Meireles, Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction, J. Food Engineering 67 (2005) 235–240.
- [45] M. Perrut, Supercritical fluid application: industrial development and economic issues, Industrial and Engineering Chemistry 39 (2000) 4531–4535.
 [46] M.G. Silva, P.R. Carvalho, P.E.R. Tavares, P.R.N. Carvalho, K.M.V.A.B. Cipolli,
- [46] M.G. Silva, P.R. Carvalho, P.E.R. Tavares, P.R.N. Carvalho, K.M.V.A.B. Cipolli, R.C.S.C. Ormenese, Potential of annatto in agroindustries and animal feed: fragrance, flavor, taste and color of *Bixaorellana* L. derivative, J. Applied Sciences Research 5 (2009) 2482–2488.
- [47] J.S. Oliveira, Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixaorellana* L.), Ph.D. Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina. <a http://www2.enq.ufsc.br/teses/d021.pdf>, 2005 (in Portuguese).
- [48] L.C.G. Nakano, Considerations on planting, extraction and usage the annatto (*Bixaorellana* L.) since dyes, Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar 2 (1998) 33–39.

- [49] C.F.O. Franco, E.G. Fabri, M. Barreiro Neto, M.H. Manfiolli, M.N.C. Harder, N.C.A. Rucker, Annatto Production Systems for Brazil, 1st ed., EMEPA, João Pessoa, 2008, pp. 15–18 (in Portuguese).
- [50] J.P. Pedrosa, L.E.M.R. Cirne, J.M.M. Neto, Bixin and protein contents of annatto seeds as affected by the type and period of storage, Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 3 (1999) 121–123 (in Portuguese).
- [51] K. Balaswamy, P.G. PrabhakaraRao, A. Satyanarayana, D.G. Rao, Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage, LWT – Food Science and Technology 39 (2006) 952–956.
- [52] B.P. Nobre, R.L. Mendes, E.M. Queiroz, F.P. Pessoa, J.P. Coelho, A.F. Palavra, Calculation of solubilities for systems containing multiple non-volatile solutes and supercritical carbon dioxide, Industrial and Engineering Chemistry 48 (2009) 1551–1555.
- [53] R.N. Carvalho Jr., L.S. Moura, P.T.V. Rosa, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, J. Supercritical Fluids 35 (2005) 197–204.
- [54] R.L. Smith Jr., R.M. Malaluan, W.B. Setianto, H. Inomata, K. Arai, Separation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid with supercritical carbon dioxide, Bioresource Technology 88 (2003) 1–7.
- [55] C.G. Pereira, Extraction of indole alkaloids from Tabernaemontana catharinensis (A,DC.) with supercritical carbon dioxide+ethanol, Master Thesis, University of Campinas. http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento. php?did=1080">http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento. php?did=1080">http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento. php?did=1080">http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.
- [56] W.B. Setianto, S. Yoshikawa, R.L. Smith Jr., H. Inomata, L.J. Florussed, C.J. Peters, Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria, J. Supercritical Fluids 48 (2009) 203–210.
 [57] D.T. Santos, M.A.A. Meireles, Optimization of bioactive compounds extraction
- [57] D.T. Santos, M.A.A. Meireles, Optimization of bioactive compounds extraction from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO₂, Innovative Food Science and Emerging Technologies 12 (2011) 398–406.
- [58] C.W. Puah, Y.M. Choo, A.N. Ma, C.H. Chuah, Solubility of tocopherol and tocotrienols from palm oil in supercritical carbon dioxide, J. Food Lipids 14 (2007) 377–385.
- [59] H.L.N. Lau, Y.M. Choo, A.N. Ma, C.H. Chuah, Quality of residual oil from palmpressed mesocarp fiber (*Elaeisguineensis*) using supercritical CO2 with and without ethanol, Journal of the American Oil Chemists Society 83 (2006) 893–898.
- [60] B. Tan, Annatto extract compositions, including geranylgeraniols and methods of use, Patent US20080031985, 2008.
- [61] C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles, Estimate of the cost of manufacturing (COM) of natural colorants obtained by supercritical fluid extraction, in: II lberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Natal, Brazil, 2010 (Full paper available in PROSCIBA 2010 pen-drive (SC113)).

CAPÍTULO 5 – ANÁLISE POR CROMATOGAFIA EM CAMADA DELGADA DE EXTRATOS SFE DE URUCUM.
Resumo

Neste trabalho, compostos com atividade antioxidante, fenólicos e aqueles com características de óleo volátil foram detectados nos extratos de urucum, obtidos por extração com fluido supercrítico (SFE), através da análise por cromatografia em camada delgada (CCD). Para isso, foi realizado um estudo da fase móvel que melhor separou os compostos nas cromatofolhas. Posteriormente, soluções de extratos SFE obtidos das isotermas de rendimento global (IRG) e da curva global de extração (OEC) foram aplicadas nas respectivas cromatofolhas preparadas para detecção dos compostos antioxidante, fenólicos, e de óleo volátil. Os extratos SFE apresentaram perfil químico similar para todas as condições de temperatura e pressão estudadas na determinação das IRG. Em função do tempo de extração, a concentração dos compostos antioxidantes, fenólicos e os com características de óleo volátil tiveram suas concentrações diminuídas, enquanto que a concentração de bixina aumentou. Os compostos antioxidantes γ-Tocotrienol e δ - Tocotrienol, assim como o esqualeno e o β -sitosterol, foram identificados através da comparação de seus índices de retenção (Rf) com os dos mesmos compostos presentes na amostra comercial Tocomin 30%. A análise por CCD auxiliou nas tomadas de decisões durante o desenvolvimento do projeto com respeito à seleção dos compostos de interesse que foram estudados.

PALAVRAS-CHAVES: bixina, extração com fluido supercrítico, tocotrienóis, urucum.

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método de separação de componentes de uma mistura de acordo com suas afinidades entre a fase estacionária e a fase móvel, que se move através da fase estacionária, e deve ser selecionado dependendo do objetivo: recuperação, separação etc. A separação é baseada no mecanismo de adsorção por diferença de polaridade, ou seja, a ordem de eluição é por polaridade. Este método não é usado, nem para a identificação, nem para a quantificação de compostos, no entanto, quando se sabe qual composto está presente na mistura, a eluição do padrão deste composto pode auxiliar na identificação através do cálculo do índice de retenção (Rf), que é a razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pela fase móvel na cromatofolha.

A análise por CCD pode auxiliar nas tomadas de decisões com respeito à seleção dos compostos de interesse que devem ser estudados e também ao tempo de duração de processo ou tempos predeterminados para a recuperação de extratos durante a extração, fracionando-os de acordo com a composição de interesse. No entanto, para quantificar estes compostos, análises por espectrofotometria ou cromatografia com detectores devem ser empregadas.

Neste trabalho, a CCD foi usada para realizações de triagem e para acompanhar as mudanças no perfil químico dos extratos obtidos nas IRGs e OEC estudadas no Capítulo 4. Adicionalmente, padrões de compostos foram utilizados com o objetivo de auxiliar na identificação dos compostos presentes nestes extratos. Durante o desenvolvimento do projeto, a análise por CCD auxiliou nas tomadas de decisões com respeito à seleção dos compostos de interesse que deveriam ser estudados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A Tabela 5.1 apresenta os reagentes e padrões utilizados nas análises por CCD.

A análise por CCD foi executada aplicando alíquotas das soluções dos extratos nas cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica gel (CCF-C/25, sílica gel 60, Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha), sensível (F254) ou não à luz ultravioleta (UV), com o auxílio de um tubo capilar de vidro. Posteriormente, as cromatofolhas foram inseridas em cubas de vidro e submetidas à eluição em fase móvel. A visualização das bandas geradas pelos compostos que não estavam na região do visível foi realizada através de luz ultravioleta (Multiband UV – 254-366nm, modelo UVGL-58, Mineralight® Lamp, Upland, CA, EUA) equipada com gabinete (UVP-Chromato-VUE, modelo CC-10, Upland, CA, EUA) de curto comprimento de onda, 254 nm, e longo comprimento de onda, 366 nm. Para compostos que não emitiram fluorescências em luz ultravioleta, a visualização das bandas foi realizada borrifando as cromatofolhas com soluções de reagentes que conferem cores aos compostos (revelador). Depois da revelação das cromatofolhas, as bandas dos compostos foram novamente visualizadas em luz ultravioleta.

	Pureza	Lote	Empresa	Validade	Origem
Padrões					- 3-
β-sistosterol synthetic	95%	107k3793	SIGMA	30/10/2010	Darmstadt/Alemanha
β-caroteno	97%	1345610	FLUKA	-	Darmstadt/Alemanha
α-tocoferol	97%	S41501287	SIGMA	01/04/2013	Darmstadt/Alemanha
Squalene	97%	3406356	FLUKA	30/01/2013	Darmstadt/Alemanha
Stigmasterol	95%	044k5320	SIGMA	-	Darmstadt/Alemanha
Bixina	96%	-	-	-	
Reagentes					
Acetato de Etila	PA	K41554223	MERCK	30/09/2013	Darmstadt/Alemanha
Acetona	PA	120795	SYNTH	26/02/2012	Diadema/SP
Acetona		-	MERCK	-	Darmstadt/Alemanha
Ác. acético glacial		-	SYNTH	-	Diadema/SP
Ác. Fórmico	≅99%	0902017	VETEC	4/2011	Rio de Janeiro/RJ
Ác. Fórmico	≅99%	-	ECIBRA	-	Santo Amaro/SP
Ác. sulfúrico concentrado		-	SYNTH	-	Diadema/SP
Éter de Petróleo	PA	-	ECIBRA	-	Santo Amaro/SP
Metanol	PA	-	ECIBRA	-	Santo Amaro/SP
n-Hexano	PA	K37362225	MERCK	-	Darmstadt/Alemanha
n-Hexano	PA	63264	SYNTH	06/2006	Diadema/SP
p-anisaldeído		116K3531	SIGMA	-	Darmstadt/Alemanha
2-aminoetil-difenilborinato		096K2612	SIGMA	-	Darmstadt/Alemanha
2,2-Difenil-1-picril-hidrazila		-	ALDRICH	-	Darmstadt/Alemanha
Tocomin [®]	30%	-	Carotech	-	Perak/Malaysia

Tabela 5.1– Especificações dos padrões de compostos e reagentes utilizados na análise por CCD.

a. SELEÇÃO DA FASE MÓVEL

Inicialmente foi realizado um estudo de fase móvel a fim de se obter uma boa separação das bandas dos compostos. Para a seleção da fase móvel foram utilizados os solventes n-hexano, acetato de etila, éter de petróleo e ácido fórmico (Tabela 5.1). As seguintes composições foram produzidas para a eluição das cromatofolhas (Figura 5.1): a) n-hexano:acetato de etila:ácido fórmico (78:18:3) (COSTA, 2007); b) acetato de etila:éter de petróleo (60:40) (TOCHINI, 2001); e c) n-hexano:acetato de etila (80:20) (Manual de procedimentos e métodos – LASEFI). Os extratos e o padrão de bixina foram diluídos em acetona com concentração final adequada para uma boa resolução nas cromatofolhas de 2 mg/mL e 4 mg/mL, respectivamente. Aproximadamente 8 μL de solução de extrato foram aplicados nas cromatofolhas e a fase móvel que resultou em melhor separação dos compostos foi selecionada para a análise por CCD.

b. ÓLEOS VOLÁTEIS

A metodologia de Wagner e Bladt (1996) foi adotada para visualização de óleos voláteis. A solução do revelador anisaldeído sulfúrico (AS) foi preparada adicionando em erlenmayer de 250 mL, 0,5 mL de p-anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem, pois a reação é intensa e exotérmica. Para as cromatofolhas borrifadas com p-anisaldeído, as bandas dos compostos foram visualizadas na região do visível após aquecimento em estufa à vácuo (Tecnal, modelo TE-385-1, Piracicaba, São Paulo) em 373 K por 10 minutos.

c. Compostos Fenólicos e Flavonóides

Para visualização de compostos fenólicos e flavonóides a metodologia de Wagner e Bladt (1996) foi adotada, sem a aplicação de revelador polietilenoglicol (PEG). A solução do revelador 2-aminoetil-difenilborinato (NP) foi preparada em erlenmayer de 250 mL, quando se adicionou 1 g de 2-aminoetil-difenilborinato em 100 mL de metanol. Depois da revelação das cromatofolhas com NP, as bandas dos compostos foram novamente visualizadas em luz ultravioleta em longo comprimento de onda, UV-366 nm.

d. Compostos Antioxidantes

Para visualização de compostos antioxidantes a metodologia de Costa (2007) foi adotada. A revelação foi feita com uma solução de DPPH a 0,2% em metanol. A visualização das bandas foi feita assim que a cromatofolhas foram borrifadas, tempo zero (t0), após 15 minutos, (t15), e após 30 minutos, (t30). A visualização foi sob luz natural, a fim de verificar a presença de manchas amarelas contra o fundo de cor púrpura, indicando a presença de compostos antioxidantes na amostra. Como padrão, optou-se pela aplicação de Bixina e da amostra comercial Tocomin 30%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 5.1 mostra as cromatofolhas eluídas nas fases móveis estudadas. Foi observado que a fase móvel hexano:acetato de etila:ácido fórmico (79:18:3) (Figura 5.1a) foi a que melhor separou as bandas dos compostos e foi selecionada para eluir os extratos SFE neste estudo.

Os extratos obtidos das IRGs determinadas com o primeiro lote das sementes de urucum (UP1) estão identificados na Tabela 5.2.



Figura 5.1- CCD dos extratos obtidos das IRG e bixina (Bix): seleção de fase móvel.

Tabela 5.2 - Identificação dos extratos SFE das IRG de UP1 aplicados nas cromatofolhas.																	
Nº		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Extrato SFE	Т	313	313	313	313	313	313	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333
	Ρ	20	20	31	31	40	40	20	20	40	40	31	31	31	31	31	31

Os extratos de nº 12, 13 e 14 correspondem aos obtidos em cada ciclo de perfil de pressão: pressurizaçãoextração estática-despressurização; coletados separadamente a fim de se verificar a composição dos mesmos. O extrato nº 15 corresponde ao extrato obtido na extração dinâmica (S/F=35), e o nº 16, obtido quando S/F=66.

A Figura 5.2 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos na região do visível. Com a bixina (Bix) como padrão de referência foi possível identificar o composto nos extratos (Rf = 0,27). Observou-se que o perfil químico dos extratos foi semelhante para todas as condições de temperatura e pressão estudadas, sendo que bandas mais intensas foram visualizadas nas condições de maior temperatura (Tabela 5.2, extratos 9-10 e 11-16). Corroborando com os resultados das análises de carotenóides totais

Capítulo 5 – Análise por cromatografia em camada delgada de extratos SFE de urucum

expressos como bixina, apresentados no Capítulo 4, quando os extratos obtidos em 333/31 e 333/40, em K/MPa, também apresentaram teores maiores de bixina.

A Figura 5.3 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos na região UV-254 nm, sem revelador. Segundo Wagner e Bladt (1996), nestas condições, substâncias com no mínimo dois cromóforos extinguem a fluorescência e se apresentam como zonas escuras contra uma luz verde fluorescente da cromatofolha. O padrão de referência da bixina se apresenta com esta característica e apenas os extratos 15-16 (extração dinâmica obtida separadamente após etapa de perfil de pressão) apresentaram bandas visualizadas com esta característica. Provavelmente, a concentração de bixina nos outros extratos não foi suficiente para extinguir a fluorescência emitida pela cromatofolha.

A Figura 5.4 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos na região UV-366 nm, sem revelador. Segundo Wagner e Bladt (1996), nestas condições, terpenóides e polifenóis não apresentam características fluorescentes, mas bandas fluorescentes (Rf = 0,45 e 0,91) se apresentaram em todos os extratos, sendo mais intensas nos extratos: 5-6, 9-10 e 12-16. A Figura 5.5 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos na região UV-366 nm, sem revelador, em cromatofolha UV-sensível. Foi observado que as bandas fluorescentes apresentadas na Figura 5.4 são melhor visualizadas, destacando aquelas com maior intensidade nos extratos 5-6 e 15-16 (extração dinâmica obtida separadamente após etapa de perfil de pressão).

A Figura 5.6 mostra as bandas dos compostos antioxidantes presentes nos extratos após a revelação com DPPH. O DPPH é um radical estável que, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio pode ser reduzido, ocorrendo uma mudança na coloração violeta (característica do radical) para amarela enquanto a reação se processa. A intensidade da coloração amarela é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (HIRATA, 2004).

As bandas amarelas visualizadas em Rf = 0,45 (Figura 5.6) apresentaram comportamento de compostos antioxidantes e estavam presentes em todos os extratos de todas as condições de temperatura e pressão estudadas. A banda correspondente ao padrão de bixina (Bix, Rf = 0,27) se apresentou bem menos intensa, indicando ação antioxidante de menor atividade, ou mais lenta, comparada a dos compostos Rf = 0,45, e foi visualizada apenas nos extratos 15-16 (extração dinâmica obtida separadamente após etapa de perfil de pressão).



Figura 5.2 – Extratos das IRG de UP1: região do visível sem revelador.



Figura 5.4 – Extratos das IRG de UP1: região UV 366 nm sem revelador.



Figura 5.3 - Extratos das IRG de UP1: região UV 254 nm sem revelador em cromatofolha UV-sensível.



Figura 5.5 – Extratos das IRG de UP1: região UV 366 nm sem revelador em cromatofolha UV-sensível.





Figura 5.6 – Extratos das IRG de UP1: região do visível com revelador DPPH.

Figura 5.7 - Extratos das IRG de UP1: região UV 366 nm com revelador NP em cromatofolha UV-sensível.



Figura 5.8 - Extratos das IRG de UP1: óleos voláteis na região do visível com revelador AS.

Capítulo 5 – Análise por cromatografia em camada delgada de extratos SFE de urucum

Costa (2007) realizou uma análise por CCD, utilizando a mesma fase móvel, de extrato clorofórmico de urucum obtido pelo método Soxhlet e empregou o revelador DPPH. Um composto apresentou o mesmo comportamento antioxidante observado na Figura 5.6 e em Rf = 0,47. Como essa técnica não permite fornecer resultado confirmatório, a autora ratificou a presença de tocóis por cromatografia líquida de alta eficiência, com maior quantidade de tocotrienol em relação ao tocoferol no óleo em estudo.

A Figura 5.7 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos após a revelação com a solução 1% metanólica de 2-aminoetil-difenilborinato (NP). A NP foi utilizada como reagente revelador de flavonóides, os quais se caracterizam por fluorescências observadas em luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm: predominantemente laranjas e amarelo-esverdeado para as flavonas e alguns tipos de flavonóis; e verde-escuro para alguns tipos de flavononas. Ácidos carboxílicos fenólicos aparecem como azul fluorescente (WAGNER & BLADT, 1996). Bandas com essas características foram observadas (em destaque), indicando a presença de flavonóides e ácidos carboxílicos fenólicos em todos os extratos obtidos em todas as condições de temperatura e pressão estudadas.

A Figura 5.8 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos após a revelação com a solução de p-anisaldeído sulfúrico (AS). A AS foi utilizada como reagente revelador de óleos voláteis, mas também detecta terpenóides, princípios pungentes e amargos e saponinas. Compostos de óleo essencial apresentam coloração azul escuro, verde, vermelho e marrom (WAGNER & BLADT, 1996). Bandas azul escuro e marrom foram observadas nos extratos obtidos em todas as condições de temperatura e pressão estudadas, mas apenas os extratos 15-16 (extração dinâmica obtida separadamente após etapa de perfil de pressão) apresentaram bandas azul escuro com Rf abaixo de 0,5 (em destaque).

Foi observado que o perfil químico dos extratos das IRGs foi similar para todas as condições de temperatura e pressão estudadas, uma vez que se trata de uma análise qualitativa e, por isso, não se pode afirmar em que condição de temperatura e pressão os extratos apresentaram maior ou menor concentração dos compostos analisados. Para quantificar os compostos de interesse, análises por espectrofotometria, ou cromatografia com detectores, devem ser empregadas. No entanto, a análise por CCD auxiliou nas

tomadas de decisões durante o desenvolvimento do projeto com respeito à seleção dos compostos de interesse que deveriam ser estudados.

Segundo Frega (1998), os compostos majoritários encontrados na fração insaponificável do extrato de urucum, obtido por Soxhlet com n-hexano, foram δ -tocotrienol, β -sitosterol e ácido oleanólico. Além desses, também foram encontrados metil-éster de ácidos graxos, esqualeno, citrostadienol, esteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol) e alcoóis (cycloartenol, 24-metilenecycloartanol, ácido oleanólico, ácido maslínico), sendo o urucum a espécie vegetal com maior concentração de δ -tocotrienol, superando as fontes até então conhecidas, óleo de palma e farelo de arroz (FREGA, 1998).

Devido à dificuldade em encontrar fornecedores e ao alto custo das formas comerciais de tocotrienóis, a amostra comercial Tocomin[®] 30% foi usada para auxiliar na identificação de isômeros de tocotrienóis nas cromatofolhas. A amostra comercial é uma suspensão em óleo 30% de tocotrienóis, predominantemente α -, β -, γ - e δ -tocotrienol, e α tocoferol. esqualeno е outros compostos minoritários como os esteróis. predominantemente o β -sitosterol, e carotenóides, predominantemente o β -caroteno. Os compostos foram extraídos e concentrados pelo processo de destilação molecular a partir de óleo bruto virgem de palma e frutos de palma (Elaeis guineensis). Essa amostra foi cedida pela Carotech Berhad Inc. (Malaysia).

A Tabela 5.3 apresenta os padrões e amostras utilizados na identificação de compostos nos extratos SFE.

Identificação	Padrão/Amostra	Altura, cm	Rf, cm/cm	
1	β-sistosterol (β-sist)	2,8	0,35	
2	β-caroteno (β-car)	7,5	0,94	
3	α-tocoferol (α-T1)	3,4 - 3,6	0,43 - 0,45	
4	Esqualeno (Esq)	7,3 – 7,5	0,91 - 0,94	
5	Estigmasterol (Est)	2,8	0,35	
6	Tocomin 30% (δ-T3)	2,6 - 2,7	0,33 - 0,34	
7	Extrato SFE			

Tabela 5.3 - Identificação dos padrões e extratos nas cromatofolhas de CCD com altura de eluição e Rf, sendo 8 cm a eluição até a fronteira do solvente.

A amostra comercial Tocomin[®] 30% foi eluída juntamente com outros padrões com o objetivo de identificar estes compostos, tanto nesta amostra, quanto no extrato SFE usado para teste. As cromatofolhas utilizadas na CCD foram de alumínio (CCF-C/25 Sílica

gel 60, Lote: OB347654, validade: 30/11/2013, MERCK, Darmstadt, Alemanha) e para flavonóides, cromatofolhas de alumínio UV-Sensível (CCF-C/25 Sílica gel 60 F254, Lote: HX743787, validade: 30/04/2012, MERCK, Darmstadt, Alemanha). A concentração dos padrões em acetona foi 50 mg/mL, aproximadamente.

A Figura 5.9 mostra as bandas dos padrões, do Tocomin 30% e do extrato SFE, que estão identificados como mostra a Tabela 5.3. Na região do visível (Figura 5.9a) são visualizadas as bandas dos carotenóides, β-caroteno e bixina/norbixina, das amostras 6 e 7, respectivamente. O β-caroteno foi identificado por comparação de seu Rf com o do padrão de nº 2. Na luz UV-254 nm (Figura 5.9b), os compostos que extinguem a fluorescência foram visualizados no padrão 3 e amostras 6 e 7. De acordo com a estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis (Figura 1.6, p. 17), ligações duplas conjugadas são encontradas na cadeia cíclica de ambos os compostos. Provavelmente por isso, estes compostos extinguiram a fluorescência da cromatofolha.

Segundo Abidi (2000), os compostos γ -T3 e δ -T3 estão entre os tocóis com maior tempo de retenção, quando a fase normal (fase estacionária polar: sílica gel) é usada nas análises de separação/detecção. As duas bandas de cor amarela da amostra 6 (Figura 5.9 c e d) que ficaram mais retidas (com Rf menores) também foram observadas na amostra 7, com mesmo Rf, indicando a presença de γ -T3 e δ -T3 nestes extratos, sendo Rf de δ -T3 menor que o Rf de γ -T3 (Tabela 5.3).

A Figura 5.10 mostra as cromatofolhas usadas na identificação de óleos voláteis (Figura 5.10a) e compostos antioxidantes (Figura 5.10b) nas amostras 6 e 7. Na amostra 6, foram identificados os compostos esqualeno e β -sitosterol (óleos voláteis), e α -tocoferol e β -caroteno (antioxidantes, melhor visualizados na Figura 5.9d), por comparação com os Rfs dos respectivos padrões. Os óleos voláteis identificados na amostra 6 foram também encontrados na amostra 7.

No entanto, como essa técnica não permite fornecer resultado confirmatório, análises por HPLC foram realizadas para a identificação e a quantificação dos compostos antioxidantes, γ -T3 e δ -T3, nos extratos SFE obtidos das IRGs e os resultados estão apresentados no Capítulo 4 e Apêndice (item 2.1 Resultados experimentais: Capítulo 4).

A amostra 6, Tocomin 30%, foi utilizada nas análises por CCD a fim de identificar os compostos comuns aos dos extratos SFE obtidos na determinação da OEC em 333 K/40 MPa, estudada no Capítulo 4. Da Figura 5.11 a Figura 5.19, os extratos de números

1-27 correspondem aos tempos de 5-390 minutos de extração, e o de número 28, corresponde ao extrato obtido na limpeza da linha de saída de CO_2 +extrato do equipamento Spe-ed SFE. A amostra 6 foi identificada como *T*. O objetivo foi analisar o perfil químico dos extratos em função do tempo.

Da Figura 5.11 a Figura 5.15 os δ -T3 se apresentaram com ação antioxidante em todos os extratos SFE da OEC, em zero minuto (t0), 15 minutos (t15) e 30 minutos (t30) após a aplicação nas cromatofolhas com revelador DPPH. Considerando as cromatofolhas (a) da Figura 5.11 a Figura 5.15, foi observado que a concentração de δ -T3 nos extratos (1-24) foi diminuindo em função do tempo de extração (5-330 minutos). O extrato 25 apresentou banda intensa devido à coleta do extrato 24 ter sido em 320 minutos, ao invés de ter sido em 330 minutos. Os extratos 25-27 apresentaram bandas mais intensas, provavelmente também devido à alta concentração de δ -T3 no extrato nos tempos finais da extração, quando se obtém menores massas de extrato. Considerando as cromatofolhas (a, b e c) da Figura 5.11 a Figura 5.15, observou-se que houve atividade antioxidante em função do tempo (após aplicação) não apenas para o δ -T3, mas também para outros compostos com ação antioxidante, mas que não foram identificados, através do aparecimento de bandas amarelas cada vez mais intensas nas cromatofolhas.

A Figura 5.15 e a Figura 5.16 mostram as bandas visualizadas no visível e em luz UV- 254 nm, respectivamente. As bandas que extinguem a luz fluorescente tem Rf = 0,27, o mesmo Rf do padrão de bixina, e por isso foram identificadas como sendo indicativo de bixina, e/ou norbixina, em todos os extratos da OEC (Figura 5.18). A concentração de bixina foi menor nos primeiros 50 minutos da extração. Isto pode ser explicado observando o comportamento cinético da bixina (Capítulo 4: Fig. 4.): à medida que a massa de extrato diminuiu com o tempo, a concentração de bixina aumentou porque a extração de sua massa em função do tempo se manteve aproximadamente constante.

A Figura 5.17 mostra as bandas dos fenólicos e flavonóides presentes nos extratos da OEC após a revelação com NP e visualizadas em luz UV-366 nm. Observou-se a presença de bandas azul fluorescentes, com diferentes Rfs, em todos os extratos da OEC e composto fluorescente em comum com a amostra comercial Tocomin 30%, próximo à fronteira do solvente. Porém, como este composto não foi identificado com os padrões, não se pode concluir a respeito do mesmo.



Figura 5.9 – Padrões, extratos SFE e Tocomin 30%: a: região do visível; b: região UV 254 nm sem revelador em cromatofolha UV-sensível; c: região do visível com revelador DPPH em t0; e d: região do visível com revelador DPPH em t30.



Figura 5.10 – Padrões, extratos SFE e Tocomin 30%: óleos voláteis na região do visível com revelador AS e compostos antioxidantes na região do visível com revelador DPPH em t30.



Figura 5.11 - Extratos (5-50 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH em a: t0; b: t15; c: t30.



Figura 5.12 - Extratos (50-135 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH em a: t0; b: t15; c: t30.



Figura 5.13 - Extratos (135-260 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH em a: 0 min.; b: 15 min.; c: 30 min.



Figura 5.14 – Extratos (260-420 min.) da OEC7 na região do visível com revelador DPPH em a: 0 min.; b: 15 min.; c: 30 min.

* O extrato 24 estava em menor concentração devido sua coleta ter sido em 320 min, e não 330, como nos extratos 25 e 27, na determinação da OEC7.







Figura 5.19 - Extratos (5-420 min.) da OEC7: óleos voláteis na região do visível com revelador AS.

* O extrato 24 estava em menor concentração devido sua coleta ter sido em 320 min, e não 330, como nos extratos 25 e 27, na determinação da OEC7.

A intensidade da fluorescência das bandas (Figura 5.17) variou em função do tempo de extração se apresentando mais intensa nos primeiros 50 minutos. Nos tempos finais da extração, as concentrações de compostos são geralmente mais altas por causa da pouca massa de extrato.

A Figura 5.19 mostra as bandas dos compostos presentes nos extratos da OEC após a revelação com AS e visualizadas na região do visível. A itens idade das bandas variou em função do tempo de extração se apresentando mais intensa nos primeiros 50 minutos. Nos tempos finais da extração, as concentrações de compostos são geralmente mais altas por causa da pouca massa de extrato obtida. Os compostos identificados na amostra Tocomin 30%, que também foram encontrados nos extratos SFE, foram o esqualeno e o β -sitosterol com Rf = 0,91-0,94 e Rf = 0,35, respectivamente. Os demais compostos não foram identificados.

Diante destes resultados, foi observado que o perfil químico dos extratos variou com o tempo de extração. Os compostos antioxidantes, fenólicos e os detectados na cromatofolha de óleos voláteis tiveram suas concentrações diminuídas com o tempo, o que não aconteceu com a bixina, que aumentou com o tempo de extração. Apesar de a CCD não ser uma análise quantitativa, é possível selecionar tempo de duração de processo SFE ou tempos predeterminados para a recuperação de extratos durante a extração, fracionando-os de acordo com a composição de interesse. A amostra comercial Tocomin 30% foi usada para isolamento dos isômeros dos tocotrienóis e servir de padrão de γ -T3 e δ -T3 nas análises de identificação e quantificação por HPLC, e que estão apresentadas no Capítulo 6 e no Apêndice (item 2.2 Resultados experimentais: Capítulo 6).

4. CONCLUSÃO

O perfil químico dos extratos SFE foi similar para todas as condições de temperatura e pressão estudadas na determinação das IRG. Em função do tempo de extração (OEC), a concentração dos compostos antioxidantes, fenólicos e os com características de óleo volátil tiveram suas concentrações diminuídas, enquanto que a concentração de bixina aumentou.

Uma vez que se trata de uma análise qualitativa, não se pode afirmar em que condição de temperatura e pressão os extratos apresentaram maior ou menor

concentração dos compostos analisados. No entanto, a análise por CCD auxiliou nas tomadas de decisões durante o desenvolvimento do projeto com respeito à seleção dos compostos de interesse que deveriam ser estudados.

Apesar de a CCD não ser uma análise quantitativa, é possível selecionar tempo de duração de processo SFE ou tempos predeterminados para a recuperação de extratos durante a extração, fracionando-os de acordo com a composição de interesse. No entanto, para quantificar estes compostos, análises por espectrofotometria ou cromatografia com detectores devem ser empregadas.

Diante destes resultados, a amostra comercial Tocomin 30% foi usada para isolamento dos isômeros dos tocotrienóis e servir de padrão de γ -T3 e δ -T3 nas análises de identificação e quantificação por HPLC dos compostos antioxidantes, e que estão apresentadas no Capítulo 5.

AGRADECIMENTOS

C.L.C. Albuquerque gostaria de agradecer ao CNPq: 143092-2008-1 pela bolsa de doutorado. Os autores agradecem ao apoio financeiro do CNPq e da FAPESP Processo: 2009/17234-9 à pesquisa. Os autores também são gratos a Dr.^a Eliane G. Fabri, do Instituto Agronômico de Campinas – IAC, e Mr. W.H. Leong, da empresa Carotech Inc., Malaysia, pela doação das sementes de urucum e da amostra comercial Tocomin[®] 30%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. **Journal of Chromatography A**, 881, 197–216, 2000.
- COSTA, C.K. Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L. Bixaceae e Aplicação de seu Óleo em Formulação Cosmética. 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.
- FREGA, N.; MOZZON, M., BOCCI, F. Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography–mass spectrometry, Journal American Oil Chemists' Society, 75, 1723–1727, 1998.
- HIRATA, L. L. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum., 2004. 95 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- TOCCHINI, L.S.;MERCADANTE, A.Z. Extração e deteminação, por CLAE, de bixina e norbixina em colouríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 21, 310–313, 2001.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2 ed. Berlim, Alemanha: Springer, 2001. 384 p.

CAPÍTULO 6 - EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE TOCOTRIENÓIS DE URUCUM: EXPERIMENTOS CINÉTICOS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, VALIDAÇÃO DO AUMENTO DE ESCALA E VIABILIDADE ECONÔMICA.

Carolina L.C. Albuquerque, Marta G. Silva, Paulo, R.N. Carvalho, M. Angela A. Meireles

Artigo em elaboração para ser submetido ao Journal of Supercritical Fluid

Resumo

Neste trabalho, curvas globais de extração (OECs) foram determinadas em equipamentos de escalas de laboratório (290 mL) e piloto (5,15 L) em 313 K/20 MPa. As OECs obtiveram mesma eficiência na obtenção de extrato e tocotrienóis (T3), quando a razão entre a massa de solvente e a massa de matéria-prima (S/F) e o tempo de residência do solvente no leito SFE foram mantidos constantes. Este critério de aumento de escala foi adotado na simulação do processo em escalas industriais para o cálculo do custo de manufatura (COM) dos extratos. O tempo de processo SFE favorável do ponto de vista da qualidade do extrato foi 105 minutos, com uma produção anual de δ -T3 de $(8.2 \pm 0.3)\%$ no extrato produzido; e com base no preco médio de venda do δ -T3 de urucum em suplementos comerciais (US\$ 32,00/g), o preço de venda do extrato SFE de urucum, rico em T3 e livre de solvente orgânico, pode ser estimado em até US\$ 2.624,00/kg, uma vez que ainda precisa ser purificado. Este valor está acima dos COMs dos extratos para as capacidades estudadas, 5, 50, 300 e 500 L, levando em consideração os cenários de investidor, produtor e indústria de colorantes. A SFE pode controlar o teor de óleo nas sementes e obter extratos com δ -T3 em diferentes concentrações.

PALAVRAS-CHAVES: aumento de escala, custo de manufatura, escala industrial, extração com fluido supercrítico, tocotrienol, urucum.

1. INTRODUÇÃO

Os tocotrienóis pertencem ao grupo das vitaminas lipossolúveis como por exemplo, vitamina E, que apesar de ser popularmente conhecida como α -tocoferol, também é composta pelos isômeros: α -, β -, γ - e δ - tocoferol (T1) e tocotrienol (T3). Enquanto muito se sabe sobre os T1, pesquisas vêm evidenciando que os T3 são superiores aos T1 em sua atividade antioxidante [1] e de redução do colesterol [2]. O α -T1 atenua e/ou interfere na absorção de T3 [1] e na ação dos tocotrienóis de redução do colesterol [3].

A extração com fluido supercrítico (SFE) de T3 se mostrou tecnicamente viável para várias matérias-primas como urucum [4], farelo de arroz [5-7], palma [8-12], Semente

de uva [13], linhaça [14], Semente de papoula [15], semente de amaranto [16], cevada [17], óleo de soja destilado e desodorizado [17], gérmen de trigo [18-20], Sacha inchi [21]. Nestes estudos, foi verificado que o processo SFE é uma alternativa às técnicas convencionais de extração por prensagem [9], e por solvente [4, 7, 17], porque alcança rendimentos similares [4, 17] com qualidade superior [4, 19]. Além disso, é possível obter produtos livres de solventes tóxicos sob condições térmicas moderadas [4, 8], agregando valor na recuperação de nutracêuticos [4, 5]. As etapas de refinamento são consideravelmente simplificadas, e a etapa de recuperação dos solventes orgânicos por destilação é completamente eliminada; estas são as etapas de processamento mais onerosas em termos de consumo de energia [18]. Por isso, a possibilidade de implementar o processo de obtenção de tocóis em escala industrial deve ser considerada [19].

Um método simples de aumento de escala, de 290 mL até 5 L, foi desenvolvido por Prado et al. (2011). O critério adotado consistiu em manter constantes, a razão entre a massa de CO₂ (S) e a massa de matéria-prima (F) (S/F), e o tempo de residência do solvente no leito de extração [22]. Este critério foi usado com sucesso uma vez que as OECs apresentaram comportamento similar, sendo que o rendimento em escalar piloto (5 L) foi ligeiramente maior que o de escala de laboratório. Os autores concluíram que os dados obtidos em escala de laboratório podem predizer o comportamento do processo SFE e auxiliar no desenvolvimento desta tecnologia em escalas industriais.

O urucum (*Bixa orellana* L.) é conhecido por conter o colorante natural mais usado na indústria de alimentos, a bixina [23] e, recentemente, foi descoberto ter o maior teor de T3, superando as duas principais fontes até então conhecidas, o óleo de palma e o farelo de arroz [4, 24]. Além disso, tem a vantagem de conter apenas traços de α -T1 em sua composição [4], enquanto que ambas as fontes conhecidas contêm quantidades significantes de α -T1 [1, 25]. As informações sobre os tocóis de urucum são ainda escassas [1, 4, 24-30]. Estudos recentes mostram que o extrato de urucum também pode ser eficaz na prevenção da peroxidação lipídica [26] e o mecanismo antioxidante sugere que provavelmente os tocotrienóis estejam atuando junto com a bixina para proteger as gorduras insaturadas da oxidação [27].

O urucum é uma planta economicamente importante para as regiões produtoras e é cultivada exclusivamente para a comercialização do colorante. Segundo Franco et al. [31], o beneficiamento da semente de urucum tem início no momento seguinte à colheita

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

e consiste nas seguintes etapas: recolhimento dos frutos no campo, pré-secagem dos frutos, "descachopamento", peneiramento, secagem das sementes, ensacamento, armazenamento e classificação. Após a classificação, as sementes de urucum são comercializadas, das quais 60% são destinadas à produção de colorífico e, as restantes, à produção de colorantes naturais. Os processos industriais atualmente empregados para extração do colorante são: processo mecânico de abrasão, utilizando óleo vegetal, ou solução aquosa de hidróxido de sódio ou potássio, como agentes de suspensão; e processo de extração com um ou mais solventes orgânicos [23, 31].

Até recentemente, estudos de SFE de sementes de urucum apenas com foco na obtenção de bixina eram encontrados na literatura [32-36]. Um estudo de SFE de óleo de sementes inteiras de urucum, usando CO₂ como solvente, apresentou as condições de temperatura e pressão otimizadas de extração em 333 K/40 MPa. Nesta condição, o processo obteve sementes desengorduradas como um pré-tratamento para a produção de bixina em resposta à demanda da indústria de colorante por sementes com menor teor de óleo possível [4]. Em 313 K/20 MPa, a concentração de tocotrienóis no extrato foi (14,6 \pm 0,4)%, maior que em 333 K/40 MPa, com menor teor de bixina.

Este trabalho é uma continuação do estudo do processo SFE para desengordurar as sementes de urucum e obter óleo rico em T3 [4]. Nesta etapa, o objetivo foi otimizar o tempo de processo, na condição otimizada em relação ao maior teor de δ -T3 e o menor teor de bixina no extrato, e analisar a viabilidade econômica do processo SFE em escalas industriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

As sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), variedade Piave (safra 2011), foram cedidas do Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, instituto de pesquisa da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Imediatamente após o recebimento, as sementes foram identificadas e armazenadas protegidas da luz em 255 K até realização dos experimentos.

Devido à dificuldade em encontrar fornecedores e ao alto custo das formas comerciais de T3, a amostra comercial Tocomin[®] 30% (Carotech Inc., Perak, Malaysia) foi

usada para isolamento de seus isômeros, α-, β-, γ-, e δ- T3 com o objetivo de serem usados como padrões analíticos na identificação e quantificação dos mesmos isômeros encontrados nos extratos SFE. Segundo o fornecedor [37], a amostra comercial é uma suspensão em óleo de palma (*Elaeis guineensis*) de 30% de T3 e α-T1, que foram extraídos e concentrados pelo processo de destilação molecular a partir de óleo bruto virgem de palma. As concentrações declaradas foram adequadas para o isolamento: 7,0 – 9,0 % de α-T3, 1,0 % β-T3, 11,0 – 14,0 de γ-T3 e 4,0 – 7,0 % de δ-T3. [37].

Os isômeros de T1 utilizados no estudo foram obtidos da Calbiochem (Merck, 613424, Darmstadt, Alemanha), composto de α -, β -, γ - e δ -T1.

Todos os reagentes utilizados foram de grau cromatográfico.

2.2. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O urucum não precisou passar por nenhum pré-tratamento para ser usado no processo SFE porque aproximadamente 85 % do óleo podem ser recuperados quando as sementes inteiras são utilizadas [4].

O urucum foi caracterizado fisicamente em relação à densidade real e ao diâmetro das sementes. A densidade real foi determinada utilizando picnômetro gasoso (Multivolume Picnometer, Micromeritics, modelo AccuPyc II 1340, Norcross, EUA) com gás hélio (Air Products Brasil Ltda., Mogi Mirim, São Paulo, Brasil). O resultado foi expresso como média e estimativa de desvio padrão de dez medidas. O diâmetro médio das sementes foi determinado calculando a média geométrica da altura, largura e espessura, de vinte sementes selecionadas aleatoriamente, que foram medidas com paquímetro universal [36]. Os resultados foram expressos como média ± amplitude das determinações.

O urucum foi caracterizado quimicamente em relação ao teor de bixina e de umidade nas sementes. A bixina foi exaustivamente extraída das sementes com acetona (Merck, Darmstadt, Alemanha) por maceração em temperatura ambiente (293 K) e protegidas da luz direta, até que elas fossem descoloridas [4]. O teor de bixina foi determinado de acordo com metodologia descrita no item 2.4. Para a análise de umidade, as sementes foram moídas em moinho de facas (Tecnal, TE-631, Piracicaba, Brasil) e a umidade foi determinada em triplicata, de acordo com a metodologia oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) [38].

Uma extração dos lipídios das sementes inteiras de urucum por Soxhlet com éter de petróleo (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) como solvente foi realizada a fim de comparar o extrato obtido em alta pressão (SFE) com o obtido em baixa pressão (LPSE – *Low pressure solvente extraction*). A extração durou 360 minutos usando a razão solvente/massa de matéria-prima (mL/g) de 35 ± 2. O solvente foi removido utilizando evaporador rotativo (Heidolph, modelo Laborota WB, Virtrieb, Alemanha) em 323 K e 0,01 MPa. O experimento foi realizado em duplicata.

Os resultados de bixina, umidade e lipídios foram expressos como média ± amplitude das determinações.

2.3. CURVAS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO (OECS)

As OECs foram determinadas na condição otimizada em relação ao maior teor de δ -T3, e o menor teor de bixina, no extrato de urucum: 313 K/20 MPa [4], e os parâmetros operacionais do processo SFE estão apresentados na Tabela 6.1.

Para todas as OECs, o solvente de extração foi o dióxido de carbono (99,9% de pureza, Gama Gases Industriais, Campinas, Brasil). Os valores de densidade aparente do leito de extração e de porosidade total do leito e das partículas foram mantidos constantes, sem diferenças significativas (F=5,84; *p*-value_{F[3;2]}=0,15; R²=0,90; Tabela 6.1). A densidade aparente foi calculada como a razão da massa de matéria-prima e do volume ocupado por ela na célula de extração. A porosidade foi calculada como (1 – (densidade aparente/densidade real)).

A massa total de extrato foi calculada como a soma do extrato obtido durante a extração e do extrato recuperado no processo de limpeza. O processo de limpeza consistiu da recuperação com acetona (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) do extrato retido na linha de saída de CO₂+extrato. A acetona foi removida utilizando evaporador rotativo (Heidolph, modelo Laborota WB, Virtrieb, Alemanha) em 323 K e 0,01 MPa. Os extratos foram pesados, submetidos ao fluxo de N₂ comercial e armazenados em 255 K até a realização das análises.

Os experimentos foram executados em duplicata.

2.3.1. - OECS EM ESCALA DE LABORATÓRIO E MODELAGEM MATEMÁTICA

A unidade comercial Spe-ed SFE (modelo 7071, Applied Separations, Allentown, USA), equipada com célula de extração de 290 mL, com altura de 12,54 cm e diâmetro de 5,43 cm (Thar Designs, CL 1373, Pittsburg, EUA), foi usada para a determinação das OECs em escala de laboratório, LS1 e LS2 (LS - *Laboratory Scale*). O procedimento experimental do processo SFE na unidade Spe-ed foi o mesmo descrito por Albuquerque e Meireles [4]. A massa de sementes inteiras de urucum foi suficiente para preencher 100% do volume da célula de extração. A vazão de CO₂ foi mantida constante durante o processo e a extração foi finalizada quando não se observou mais a saída de extrato no frasco coletor. Os parâmetros operacionais do processo SFE estão apresentados na Tabela 6.1.

Para identificar os períodos da curva de extração e calcular os parâmetros cinéticos, as OECs foram ajustadas a um *spline* com três linhas retas, usando as funções PROC REG e PROC NLIN do *software* SAS (SAS Institute Inc., 9.2, Cary, Carolina do Norte, EUA) de acordo com a metodologia descrita por Rodrigues et al. [39] e Meireles [40]. As três linhas retas correspondem aos períodos de extração nomeados CER (*constant extraction rate*), FER (*falling extraction rate*), e DC (*diffusion controlled*), respectivamente. E a intersecção das retas CER com FER, e das retas FER com DC indicam a duração dos períodos CER (t_{CER}) e FER (t_{FER}), respectivamente.

2.3.2. - OECS EM ESCALA PILOTO E CRITÉRIO DE AUMENTO DE ESCALA

A unidade comercial de SFE (Thar Technologies, SFE-2 x 5LF-2-FMC, Pittsburgh, EUA) foi utilizada para a determinação das OECs em escala piloto (PS1). O sistema está equipado com dois extratores de 5,15 L, com altura de 61,4 cm e diâmetro de 10,34 cm, bomba de CO₂ com capacidade de bombeamento de 200 g/min e bomba de cossolvente com capacidade de 50 g/min, banho de etileno glicol e água (Thermo Electron Corporation, modelo NESLAB RTE10, Newington, EUA), medidor de vazão (Siemens, modelo Sitrans FC Mass 6000, Munique, Alemanha) e três separadores de 1 L, tipo ciclone, dispostos em série. Os três separadores foram configurados para operar em 313 K/14 MPa (separador 1: S1), 303 K/7 MPa (separador 2: S2) e 303 K/4 MPa (separador 3: S3), respectivamente. Apenas uma das células de extração foi utilizada. Durante os ensaios, os extratos foram coletados para S/F de 3, 5, 7, 9 e 11, aproximadamente,

correspondendo a tempos de extração de (28 ± 5) , (54 ± 8) , (80 ± 10) , (105 ± 10) e (134 ± 7) minutos. Em cada tempo, a extração era interrompida a fim de despressurizar totalmente os separadores e assim realizar a coleta dos extratos, devido à impossibilidade de recuperação destes com o sistema em operação. Os parâmetros operacionais do processo SFE estão apresentados na Tabela 6.1.

A OEC LS1 foi usada como referência para o estudo do aumento de escala na determinação da OEC em escala piloto (PS - *Pilot Scale*), como recomendado por Prado et al. [22], mantendo constantes as condições de extração, em 313 K/20 MPa, com exceção da vazão de CO₂.

O critério usado para o aumento de escala de 290 mL para 5,15 L foi manter constantes a razão S/F e o tempo de residência do solvente no leito (Equação 6.1) [22].

O mesmo lote de urucum (safra 2011) foi usado em ambas as escalas. A densidade aparente do leito foi mantida constante e, consequentemente, a porosidade também foi constante (Tabela 6.1). Logo, para tempos iguais de residência do solvente, a Equação 6.1 pode ser reescrita como a Equação 6.2.

$$t_{RES} = \frac{\pi d_B^2 H_B \epsilon \rho_{CO2}}{4 Q_{CO2}}$$

$$6.1$$

$$\frac{Q_{CO2}2}{Q_{CO2}1} = \frac{F_2}{F_1}$$
 6.2

onde t_{RES} é o tempo de residência do solvente no leito; d_B é o diâmetro do leito; H_B é a altura do leito; ϵ é a porosidade do leito e das partículas, ρ é a densidade do solvente; Q_{CO2} é a vazão do solvent; e F é a massa de matéria-prima.

A massa de matéria-prima necessária para preencher o volume do extrator da unidade piloto (*F2*) foi calculada levando em consideração a densidade aparente do leito em LS1. A vazão da unidade piloto foi calculada usando a Equação 6.2. No entanto, o valor obtido foi o máximo permitido pelo equipamento. Por isso, decidiu-se adotar a vazão como sendo 75% desse valor, obtendo uma vazão de aproximadamente 12 (doze) vezes da adotada em LS1. Com isso, usando a Equação 6.2 foi possível calcular *F2* necessária para os experimentos em escala piloto, mantendo constante o critério para o aumento de escala: S/F e o t_{RES}. A *F2* preencheu aproximadamente 70% da célula de extração e os 30% restantes foram preenchidos com esferas de vidro.

O final da extração foi alcançado quando o valor da razão S/F em PS1 se aproximou do valor da razão S/F obtida em LS1, quando se iniciou o período DC da

extração, S/F=10 (b.s.) aproximadamente. O critério adotado para o aumento de escala assume que o processo SFE tem a mesma eficiência na extração, nas escalas laboratorial e industrial, para as mesmas condições de processo [22, 41, 42].

2.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Os teores de bixina dos extratos foram determinados de acordo com o Joint FAO/WHO Expert Committee on Foods Additives Monographs [43].

Pesou-se aproximadamente 0,0040 g de extrato de urucum em balança analítica (Sartorius analytic A200S, ± 0,0001, Sartorius GMBH Gottingen, Alemanha), diluiu-se com acetona (Merk, Darmstadt, Alemanha) em balão volumétrico de 2 mL (V1) e a solução foi homogeneizada em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP56, Araraquara, São Paulo). Alíquota de 0,20 mL (v1) foi pipetada e inserida em cubeta e a este volume foi adicionado 1,8 mL de acetona totalizando 2 mL de solução (V2). A absorbância da solução foi lida em triplicata no comprimento de onda de 487 nm, em espectrofotômetro (FEMTO, modelo 800XI, São Paulo, Brasil). Ensaios preliminares de determinação de teor de bixina total foram realizados a fim de se testar a concentração do extrato que resultasse em absorbância entre 0,2 e 1,0. O teor de bixina total foi obtido aplicando a lei de Lambert-Beer através da Equação 6.3 [43].

$$\% = \frac{A \times 10^4}{E_{1cm}^{1\%}} \times \frac{V_1 \times V_2}{m_{EXT[\mu g]} \times v_1}$$
6.3

onde *A* é a absorbância em 487 nm; $E^{1\%}_{1cm}$ é a absorbância específica e igual a 3.090 [43]; *V*1 e *V*2 são os volumes das diluições; *v*1 é o volume da alíquota; e m_{EXT} é a massa de extrato.

O isolamento dos isômeros de T3 foi realizado seguindo a metodologia de Panfili et al. [44] com adaptações, em cromatógrafo líquido de alta eficiência, composto por bomba em sistema isocrático (Varian, modelo 9002, Kollerstrasse, Switzerland) e detector UV-VIS (Varian, modelo 9050, Kollerstrasse, Switzerland). A coluna usada foi de fase normal Sílica 60 (Merck, 250 x 4,6 mm d.i., partículas de 5µm, Darmstadt, Alemanha) e alça amostradora de 250 µL (Rheodyne, modelo 7161). A fase móvel foi composta de nhexano (Tedia, 95%, Ohio, EUA), acetato de etila (Tedia, Ohio, USA), e ácido acético (Synth, Diadema, Brasil), em proporção de 97,3:1,8:0,9, v/v/v, com vazão de 1,5 mL/min. O monitoramento dos isômeros foi no comprimento de onda de 292 nm. Foram realizadas

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

injeções até alcançar uma concentração adequada para análise e cada fração recolhida foi seca sob fluxo de N₂ comercial e dissolvida em n-hexano (Tedia, 95%, Ohio, EUA). A coleta foi realizada manualmente no início do pico de detecção, esperando o início da subida do pico para começar a coleta.

A concentração dos isômeros de T1 e T3 nas amostras comerciais Calbiochem e Tocomin[®] 30%, respectivamente, foi confirmada em espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50, Victoria, Austrália) com uso dos respectivos coeficientes de absorção [45, 46].

A análise quantitativa dos T1 e T3 foi realizada em HPLC com uso de bomba isocrática (LabAlliance, modelo RadPump série III, State College, EUA) e detector de fluorescência (Waters, modelo 2475, Milford, EUA) com padronização externa. A coluna foi a mesma utilizada para o isolamento dos isômeros de T3. A fase móvel foi composta dos mesmos reagentes utilizados para o isolamento dos isômeros de T3 em proporção de 97,6:1,8:0,6, v/v/v, com vazão de 1,5 mL/min. O comprimento de onda de excitação foi 292 nm e de emissão foi 326 nm. A quantificação foi determinada com a injeção da mistura dos oitos isômeros de T1 e T3.

A identificação dos T1 e T3 presente nos extratos foi realizada pela comparação com os tempos de retenção dos isômeros isolados da amostra comercial Tocomin 30%.

As quantificações de bixina e tocóis totais foram realizadas em duplicata.

2.5. ESTIMATIVA DO CUSTO DE MANUFATURA DOS EXTRATOS (COM)

O *software* SuperPro Designer[®] (Intelligen Inc., versão 6.0, Scotch Plains, Nova Jérsei, EUA) foi usado para simular o processo SFE e estimar os COMs dos extratos.

O fluxograma do processo SFE usado na simulação foi desenvolvido por Prado et al. [47] e consiste das etapas de extração e separação do solvente do soluto, quando o soluto é recuperado e o solvente é recirculado. A etapa de extração consiste de dois extratores capazes de suportar uma pressão máxima de 80 MPa, operando em modo semicontínuo, isto é, quando uma extração é executada em um extrator, o outro é despressurizado, descarregado, limpo, carregado e pressurizado novamente; a etapa de separação é realizada com um separador para a recuperação do extrato e o solvente é então recirculado no sistema. No final da extração, há perda de CO₂ devido à despressurização do extrator [48] e foi considerada como sendo de 2% do total de CO₂

utilizado no processo. O processo foi projetado para operar 7.920 h por ano, o que corresponde a 330 dias de operação, com três turnos de 8 horas [47].

Este estudo considerou unidades SFE de laboratório e industriais com capacidades 5, 50, 300 e 500 L, com custo de aquisição de US\$ 100.000,00, 300.000,00, 850.000,00 e 1.150.000,00, respectivamente. Estes valores foram cotados por Prado [49] de fabricantes chineses e foram adotados neste trabalho por serem mais baratos do que os dos fabricantes americanos. O número de operadores necessários para operar as unidades, por turno, foi de 1 (5 L), 2 (50 L), e 3 (300 e 500 L) [49]. O valor da hora de trabalho operacional foi US\$ 6,00. O custo da energia requerida para os equipamentos foi de US\$ 0,092/kWh. O custo de reposição do CO₂ perdido foi US\$ 0,15/kg [4].

Neste trabalho, o fluxograma do processo SFE foi adaptado para operar com três separadores baseado nas características da unidade piloto, uma vez que os resultados experimentais da OEC PS1 foram usados como dados de entrada para a simulação. Para o aumento de escala, assumiu-se que o rendimento da SFE tem o mesmo desempenho nas escalas laboratorial e industrial para mesmas condições de processo: temperatura, pressão, tempo, densidade aparente do leito e razão S/F [22, 41,42]. Logo, em 313 K/20 MPa, a massa de matéria-prima foi calculada multiplicando a densidade aparente pela capacidade de cada unidade industrial estudada; a quantidade de solvente foi calculada multiplicando a massa de matéria-prima pela razão S/F; e os rendimentos nos separadores, em cada tempo de extração, foram calculados com base nos rendimentos obtidos na OEC PS1 com respeito às massas de matéria-prima calculadas para cada capacidade industrial estudada.

Os cenários de mercado estudados consideraram o custo de aquisição da matériaprima variando de 0,00-2,20 US\$/kg. Os cenários cujo valor foi 0,00 US\$/kg são observados, tanto para os produtores de urucum, quanto para as indústrias de colorante. Para os produtores, o custo é zero porque não precisam adquirir a matéria-prima, já que a produção é própria. Para a indústria, o custo é zero porque já é um custo do processo de extração do colorante. Para servir de comparação, o processo foi simulado para cenário de um investidor, cujo valor de matéria-prima foi US\$ 2,20/kg.

O simulador forneceu os principais resultados de custeio e avaliação econômica por ano: investimento do projeto, custo operacional, taxa de produção de extrato, custo de manufatura, receita total e tempo de retorno.

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

O investimento incluiu os custos com aquisição do equipamento, capital de giro, validação e inicialização do processo. O custo operacional abrangeu todos os itens diretamente dependentes da produção, como custo da matéria-prima (CRM: que inclui as sementes de urucum e o CO₂ perdido na despressurização), custo da mão de obra (COL: que inclui encargos trabalhistas e mão de obra não ligada diretamente à produção), custos dependentes do equipamento (FCI: manutenção, depreciação, seguro etc.) e custos de utilidades (CUT: trocadores de calor e energia associada a cada equipamento). O custo com tratamento de resíduo foi considerado zero, uma vez que as sementes desengorduradas têm valor agregado, estão livres de solventes, e por isso podem ser vendidas. O custo com transporte não foi considerado na estimativa dos custos. A receita total foi calculada com base na venda do óleo SFE de urucum pelo produtor e pela indústria por US\$ 12,67/kg [50]; e a venda das sementes desengorduradas pelo produtor o por US\$ 1,25/kg (preço médio pago por kg de semente com teor médio de 3% de bixina no mercado brasileiro). O tempo de retorno foi calculado pelo simulador e consistiu na razão entre o investimento total e o lucro líquido operacional.

2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram usados para comparar as médias estudadas e verificar quais médias mostraram diferenças estatisticamente significativas (*p*-valor $\leq 0,05$). O *software* SAS (SAS Institute Inc., 9.2, Cary, Carolina do Norte, EUA) foi usado para as análises estatísticas. Os resultados da ANOVA F-test foram reportados como estatística F, o *p*-valor calculado para a distribuição F com (v₁, v₂), onde v₁ é o grau de liberdade do modelo e v₂ é o grau de liberdade do resíduo (*p*-valor_{F[v1,v2]}), e R² é o coeficiente de correlação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES DE URUCUM

As sementes de urucum foram caracterizadas em relação às suas propriedades físicas e químicas para obter informações necessárias para o desenvolvimento, modelagem e simulação do processo SFE. Os valores de densidade real e tamanho médio das sementes obtidos foram (1.330 \pm 10) kg/m³ e (3,65 \pm 0,03) mm,

respectivamente. Nas sementes, os teores de umidade e de bixina, em relação à matériaprima em base seca (b.s.), foram $(8,9 \pm 0,2)$ %, $(5,1 \pm 0,1)$ %, respectivamente.

A extração das sementes inteiras de urucum por Soxhlet rendeu $(3,1 \pm 0,2)$ % de extrato (b.s.). Os tocóis totais detectados no extrato Soxhlet tiveram rendimentos iguais a $(0,0126 \pm 0,0005)$ % de α -T1, $(0,013 \pm 0,005)$ % de α -T3, $(2,18 \pm 0,07)$ % de γ -T3 e $(13,0 \pm 0,2)$ % de δ -T3. Albuquerque e Meireles [4] usaram a mesma variedade de urucum, a Piave, e obtiveram rendimento de $(3,7 \pm 0,0)$ % de extrato Soxhlet e $(14,6 \pm 0,4)$ % de δ -T3 no extrato. Este trabalho foi realizado com lote diferente de urucum Piave e o efeito da variabilidade da matéria-prima pode ser o motivo da diferença encontrada para os rendimentos de extrato e bixina.

A amostra comercial de tocotrienóis, Tocomin[®] 30%, apresentou teores iguais a $(6,7 \pm 0,2)\%$ de α -T1, $(11,4 \pm 0,7)\%$ de α -T3, $(1,13 \pm 0,03)\%$ de β -T3, $(7,8 \pm 0,6)\%$ de γ -T3 e $(3,3 \pm 0,1)\%$ de δ -T3.

Apesar de o extrato Soxhlet apresentar menor teor de T3 totais (15,2%) quando comparado ao teor total encontrado na amostra comercial (23,6%), o teor de δ -T3 é superior, de acordo com as condições de análises adotadas. Isso faz do urucum uma fonte de δ -T3 com a vantagem de conter apenas quantidades traços de α -T1 e α -T3 o que facilita o processo de purificação do δ -T3, considerando este como sendo o composto de interesse.

3.2. VALIDAÇÃO DO CRITÉRIO DE AUMENTO DE ESCALA

3.2.1. RENDIMENTO EM EXTRATO

As OECs foram determinadas em escala de laboratório (LS1) para servir de referência para o estudo de aumento de escala do processo SFE em escala piloto, mantendo constantes as condições de extração, com exceção da vazão de CO₂. Os parâmetros operacionais e os resultados experimentais estão apresentados na Tabela 6.1.

A Figura 6.1 mostra o comportamento cinético dos extratos obtidos em LS1, o que indicou a possibilidade do ajuste dos dados experimentais a um spline de três linhas retas, por apresentar os três períodos da curva extração. Com os dados obtidos do modelo, os períodos foram identificados: CER, FER e DC (Figura 6.1). As barras de erro mostram a diferença entre os dados experimentais e os obtidos pelo modelo, indicando boa qualidade nos ajustes dos dados.



Figura 6.1 - Dados experimentais de rendimento em extrato, em relação à matéria-prima seca (b.s.), em função do tempo, obtidos de LS1, e a duração dos três períodos da curva de extração: CER, FER e DC.

As OECs foram determinadas em escala piloto (PS1) para verificar a validade do critério de aumento de escala através da comparação com as OECs LS1 e PS1. Os dados operacionais e os resultados experimentais estão apresentados na Tabela 6.1. A razão S/F = 10 (b.s.), aproximadamente, foi suficiente para obter a curva de extração PS1 e comparar com as OECs LS1 e LS2 (Figura 6.2).

A Figura 6.2 mostra que o comportamento cinético das OECs LS1, LS2 e PS1 foi similar durante os três períodos da curva de extração: CER, FER e DC. Todos os rendimentos se encontraram dentro das amplitudes dos erros. No entanto, foi observado que o rendimento de extrato recuperado no processo de limpeza no final da extração em PS1 representou aproximadamente 10% do extrato total. O que fez elevar significativamente o rendimento de PS1 para o total de $(3,25 \pm 0,02)$ % em relação aos rendimentos de LS1 e LS2, $(2,9 \pm 0,1)$ %, quando a razão S/F foi aproximadamente 10. O extrato SFE de urucum se apresentou bastante viscoso e pode ter dificultado a coleta do extrato residual do separador, sendo totalmente recuperado apenas no processo de limpeza.

Dados experimentais	OEC	DCO				
Densidade CO ₂ : 840,61 kg/m ³	LS1	LS2	PS1	₽52 _{S/F≅10}		
Vazão CO ₂ (×10 ⁻⁵ kg/s)	19,4 ± 0,1 ^A	16,6 ± 0,1 ^B	287 ± 19	250		
Velocidade superficial CO ₂ (m/s)	0,0840 ± 0,0003	0,0718 ± 0,0004	$0,34 \pm 0,02$	0,30		
S/F (kg CO ₂ /kg matéria-prima)	$20,8 \pm 0,4$	17,5 ± 0,1	9,7 ± 0,1	9,8		
Tempo (min.)	335	335	134 ± 7	143		
Matéria-prima (g)	188 ± 4	190,1 ± 0,5	$2.359,8 \pm 0,3$	2.192,51		
Densidade aparente (kg/m ³)	648 ± 15 ^A	$655,4 \pm 0,2^{A}$	681 ± 8 ^A	669		
Porosidade do leito e partículas	0,51 ± 0,01 ^A	$0,507 \pm 0,004^{A}$	$0,49 \pm 0,01^{A}$	0,50		
Tempo de residência CO ₂ (min.)	$10,7 \pm 0,3^{A}$	$12,4 \pm 0,1^{B}$	$8,2\pm0,4^{AB}$	9,1		
Extrato (%, b.s.)	3,31 ± 0,02 ^A	$3,3 \pm 0,1^{A}$	$3,25 \pm 0,02^{A}$	2,97		
Bixina (%, b.s.)	n.d.	0,021 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,011		
δ-T3 (%, b.s.)	0,48 ± 0,01	n.d.	0,38 ± 0, 01	n.d.		

Tabela 6.1 - Dados operacionais do processo SFE e resultados experimentais em 313 K/20 MPa.

b.s. – base seca; n.d. – não determinado; Médias com a mesma letra, na mesma linha, não são significativamente diferentes.


Figura 6.2 - Dados experimentais de rendimento em extrato, em relação à matéria-prima seca (b.s.), obtidos de LS1 (O), LS2 (Δ), PS1 (\Box): rendimentos em função do tempo (a) e em função de S/F (b).

Prado et al. [22] também obtiveram aumento nos rendimentos em escala piloto, sendo de 15% para o resíduo de cana-de-açúcar e 20% para o cravo, durante a curva de

extração. Os autores abordaram como possíveis fatores que influenciaram o aumento do rendimento em escala piloto: a coextração de água; a maior velocidade intersticial do solvente com arraste mecânico tanto de água quanto de extrato; os períodos estáticos intermediários, ao determinar uma OEC, que aumentam o tempo de contato do solvente com a matéria-prima; e a eficiência de separação dos três separadores dispostos em série.

Prado et al. [22] observaram que a coextração de água pode ocorrer tanto em escala de laboratório quanto em escala piloto, sendo mais relevante quanto maior for a escala do processo, e que o rendimento em escala piloto continuou maior mesmo com a retirada da água, que pode ser feita por diferença de densidade; a influência da velocidade intersticial do solvente foi inconclusiva a partir dos estudos realizados pelos autores; os períodos estáticos intermediários não afetaram o rendimento de extração; e que os separadores em série poderiam estar recuperando os extratos eficientemente, porque a perda de extrato por arraste é maior em escala de laboratório uma vez que a despressurização ocorre até a pressão ambiente.

Um experimento no equipamento piloto (PS2) foi realizado para verificar a influência dos períodos estáticos intermediários no rendimento assim como calcular este rendimento após a retirada de água juntamente extraída com o óleo, uma vez que também foi observada a presença de água nos extratos da OEC PS1. Os parâmetros operacionais e os resultados experimentais estão apresentados na Tabela 6.1. O rendimento total foi 2,97% após a retirada de água do extrato, indicando que os períodos estáticos intermediários não influenciaram no rendimento da extração e que, mesmo após a retirada de água do extrato, o rendimento foi similar aos obtidos nas OECs LS1, LS2 e PS1. Estes resultados corroboraram com os dados da literatura [22] de que as OECs determinadas em escala piloto podem ser utilizadas para comparação com as OECs obtidas em escala de laboratório.

O processo SFE de sementes de urucum apresentou eficiência similar de rendimento em escalas de laboratório e piloto para as mesmas condições de processo e aumento de escala de 12 vezes, considerando a massa de matéria-prima utilizada. O comportamento cinético de LS1 foi reproduzido com sucesso em escala piloto, validando, assim, o critério usado para o aumento de escala. Não houve diferenças significativas entre os tempos de residência do solvente das OECs LS1 e PS1 (F=33,02; *p*-value_{F[2,1]}=0,12; R²=0,98) e entre os das OECs LS2 e PS2 (F=0,40; *p*-value_{F[2,1]}=0,74;

R²=0,45). Estes resultados corroboram com a literatura sobre o uso da razão S/F e o tempo de residência como critério para o aumento de escala [22, 41].

Uma análise estatística mostrou que os rendimentos totais de extrato obtidos por Soxhlet e SFE (LS1) não apresentaram diferença significativa (F=1,14; *p*-value_{F[4,3]}=0,47; R^2 =0,60) entre eles. Além disso, em 160 minutos de processo, o extrato SFE alcançou rendimento similar ao rendimento obtido por Soxhlet em 360 minutos de extração. Desta forma, do ponto de vista de tempo de processo, a SFE é vantajosa quando comparada ao processo Soxhlet para extração de óleo de urucum.

Albuquerque e Meireles [4] mostraram que a eficiência do processo SFE, em 333 K/40 MPa e S/F=25, para desengordurar as sementes inteiras de urucum também foi de 100% quando comparado ao método Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente com S/F=22,5. E uma extração por Soxhlet das sementes esgotadas pelo processo SFE mostrou que apenas $(0,9 \pm 0,1)$ % de óleo residual se encontrava nas sementes.

Neste trabalho, o extrato residual contido nas sementes após LS1 foi $(1,38 \pm 0,04)$ %. Este resultado corrobora com os resultados da literatura, que mostraram que o rendimento de extrato SFE de urucum em 313 K/20 MPa foi menor do que o obtido em 333 K/40 MPa [4].

Na condição estudada, em 313 K/20 MPa, o rendimento em extrato pelo processo SFE foi menor e, consequentemente, o extrato residual nas sementes foi maior. Condições de temperatura e pressão mais amenas de SFE evitaram a coextração de compostos mais pesados, que são muitas vezes indesejados.

Uma vez que um rendimento alto em extrato não indica alta concentração de compostos alvo, é importante analisar a composição química dos extratos e determinar as condições de processo para obter o produto final desejado.

3.2.2. RENDIMENTO EM COMPOSTOS DE INTERESSE

Os extratos obtidos por Soxhlet e SFE (LS1 e PS1) foram analisados com relação ao teor de tocóis totais. Os T3, γ -T3 e δ -T3, foram majoritários em todos os extratos. Os rendimentos totais de γ -T3 e δ -T3, em relação à matéria-prima seca (b.s.), foram (0,069 ± 0,002)% e (0,41 ± 0,01)%, respectivamente, no extrato Soxhlet, e (0,069 ± 0,003)% e (0,48 ± 0,01)%, respectivamente, no extrato obtido em LS1. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa (F=8,56; p-value_{F[3,2]}=0,11; R²=0,93) entre os rendimentos totais de δ -T3 obtidos por Soxhlet e LS1. Da mesma maneira como aconteceu com o rendimento em extrato, em 160 minutos de extração, o extrato SFE alcançou rendimento similar ao rendimento obtido por Soxhlet.

A Figura 6.3 mostra os rendimentos em T3 (em relação à matéria-prima seca) obtidos em LS1 e PS1, comparando os comportamentos cinéticos. Apesar de os rendimentos de γ -T3 e δ -T3 apresentarem teores mais baixos ao longo do processo de extração, em PS1, o formato das curvas em ambas as escalas foi similar, em função do tempo (Figura 6.3a) e em função de S/F (Figura 6.3b). A análise estatística mostrou que os rendimentos de δ -T3 apresentaram diferença significativa (F=3,83; *p*-value_{F[4;3]}=0,15; R²=0,84) quando a razão S/F foi aproximadamente igual a 10. No entanto, o rendimento total, rendimento da extração somado ao extrato recuperado no processo de limpeza, se encontrou dentro da amplitude do erro da LS1.

Como foi visto, a massa de extrato recuperada no processo de limpeza em PS1 foi aproximadamente 10% em relação ao extrato total devido possivelmente à retenção de extrato nas válvulas e tubulações entre os separadores. As frações de γ -T3 e δ -T3 recuperadas no processo de limpeza em PS1 foram 20% e 22%, respectivamente, em relação ao total.

A Figura 6.4 mostra os rendimentos em bixina obtidos em LS2 e PS1. A OEC LS2 foi determinada sob as mesmas condições operacionais de LS1 e os extratos obtidos foram analisados em relação ao teor de bixina (Tabela 6.1). O comportamento cinético da bixina (b.s) em LS2 e PS1 foi comparado (Figura 6.4).

Os rendimentos não apresentaram diferença significativa (F=7,39; *p*-value_{F[4;3]}=0,07; R²=0,91) para a razão S/F aproximadamente igual a 10. O formato das curvas em ambas as escalas foi similar, em função do tempo (Figura 6.4a) e em função de S/F (Figura 6.4b). Como aconteceu com os rendimentos de γ -T3 e δ -T3, apesar dos rendimentos de bixina terem sido mais baixos em PS1 durante a extração, o rendimento total se encontrou dentro da amplitude do erro de LS2.



Figura 6.3 - Dados experimentais de rendimento em Tocotrienóis (b.s), de γ -T3 (O) e δ -T3 (Δ), obtidos nos extratos das OECs: LS1 (símbolos vazios) e PS1 (símbolos cheios).



Figura 6.4 - Dados experimentais de rendimento em bixina (b.s.) obtidos das OECs: LS2 (Δ) e PS1(O).

3.3. ETAPA DE SEPARAÇÃO: RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A Figura 6.5 apresenta os rendimentos em extrato nos separadores da unidade piloto, obtidos durante a PS1, e o rendimento total em PS2, sem períodos estáticos intermediários e após a retirada de água do extrato.





A redução da pressão de operação de 20 para 14 MPa no S1 rendeu apenas (11 \pm 2)% do extrato total. Uma redução de 14 para 7 MPa no S2, rendeu (29 \pm 6)%. Porém, foi no S3 que foi obtido a maior fração do extrato total, (60 \pm 3)%, com uma redução de pressão de 7 para 4 MPa.

Não foram encontrados dados de solubilidade do extrato de urucum em CO₂ supercrítico na literatura. Nestes casos, os dados de rendimento global podem ser utilizados como um indicativo de solubilidade [39, 52], predizendo qualitativamente o comportamento da solubilidade do extrato no CO₂ supercrítico.

Albuquerque e Meireles [4] observaram que os rendimentos em extrato obtidos das IRGs não foram significativamente influenciados pela temperatura e pressão de operação, embora tenha sido observada uma tendência de diminuição quando a pressão foi reduzida em temperatura constante. O mesmo foi observado neste trabalho em S1, S2 e S3 (Figura 6.5).

Puah et al. [11] realizaram extração de tocóis de óleo de palma com CO₂ supercrítico e concluíram que o processo SFE foi mais eficiente na solubilização dos tocóis quando a densidade do solvente foi acima de 800 kg/m³. Sarmento et al. [6] estudaram as etapas de extração de tocóis totais do óleo de farelo de arroz e a separação em dois separadores em série. Os autores concluíram que a melhor condição de extração foi em 313 K/20 MPa e que os tocóis são mais solúveis em CO₂ no estado supercrítico do que em CO₂ no estado líquido. Na etapa de separação, os autores observaram a precipitação total dos tocóis no primeiro separador em 298 K/15 MPa, com densidade do CO₂ de aproximadamente de 877 kg/m³.

No estudo realizado por Albuquerque e Meireles [4], as massas de δ -T3 obtidas não apresentaram diferenças significativas entre elas (F=0,70; *p*-value_{F[6;5]}=0,66; R²=0,46), provavelmente porque a densidade do CO₂ variou de 724-956 kg/m³. No entanto, a concentração de δ -T3 no extrato obtido em 313 K/20 MPa foi maior e significativamente diferente devido provavelmente a não coextração de compostos pesados do óleo de urucum.

Neste trabalho, os três separadores da unidade piloto operaram em 313 K/14 MPa (S1), 303 K/7 MPa (S2) e 303 K/4 MPa (S3) com densidades de 764, 269 e 90 kg CO_2/m^3 , respectivamente. Estas condições foram selecionadas levando em consideração a observação feita por Puah [11] que, em densidades menores que 800 kg/m³, o poder de solvatação do solvente diminuiu em relação aos tocotrienóis. Foi observado que as concentrações de bixina, γ -T3 e δ -T3 nos extratos foram maiores no S2 do que no S1 e no S3 (Tabela 6.2). Em relação ao rendimento total, no S2 foram recuperados (52 ± 20)% de bixina, (47 ± 10)% de γ -T3, e (47 ± 9)% de δ -T3.

A densidade do CO₂ no S1 foi próxima a adotada por Puah et al. [11] para a extração de tocóis e, possivelmente, favoreceu o aumento da concentração dos T3 no S2, uma vez que os compostos mais pesados precipitaram no S1. Além disso, o CO₂ se encontrava na fase vapor no S2, o que provavelmente também favoreceu a precipitação da maior parte dos T3.

Portanto, a etapa de separação foi bem sucedida porque foi possível obter produtos com concentrações diferentes em compostos de interesse. É difícil avaliar a relação entre os dados de solubilidade dos extratos de palma e de farelo de arroz no CO₂

encontrados na literatura [6, 11] e os extratos SFE de urucum no presente estudo, uma vez que a composição química diferente influencia na solubilidade do extrato no CO₂.

Tempo, min.	Separador	Bixina	a, %	γ-T3	, %	δ-Τ3, %
	S1	0,05 ±	0,01	0,14 ±	0,01	1,0 ± 0,1
28 ± 5	S2	0,07 ±	0,01	0,33 ±	0,06	2,2 ± 0,2
	S3	0,015 ±	0,002	0,07 ±	0,01	0,4 ± 0,1
	Total	0,13 ±	0,02	0,55 ±	0,06	3,6 ± 0,3
	S1	0,07 ±	0,01	0,21 ±	0,04	1,4 ± 0,2
51 + 9	S2	0,09 ±	0,01	0,40 ±	0,04	2,6 ± 0,4
54 <u>1</u> 0	S3	0,03 ±	0,02	0,21 ±	0,03	1,3 ± 0,2
	Total	0,19 ±	0,01	0,82 ±	0,02	5,4 ± 0,8
80 ± 10	S1	0,08 ±	0,01	0,25 ±	0,04	1,6 ± 0,2
	S2	0,12 ±	0,01	0,50 ±	0,06	3,3 ± 0,3
	S3	0,06 ±	0,01	0,31 ±	0,06	1,9 ± 0,3
	Total	0,25 ±	0,01	1,05 ±	0,09	6,8 ± 0,4
	S1	0,08 ±	0,01	0,25 ±	0,05	1,7 ± 0,2
105 + 10	S2	0,148 ±	0,005	0,59 ±	0,05	4,0 ± 0,1
105 ± 10	S3	0,07 ±	0,01	0,39 ±	0,05	2,5 ± 0,2
	Total	0,30 ±	0,01	1,24 ±	0,06	8,2 ± 0,3
	S1	0,09 ±	0,01	0,26 ±	0,05	1,7 ± 0,3
124 + 7	S2	0,165 ±	0,005	0,64 ±	0,06	4,4 ± 0,1
134 1 /	S3	0,09 ±	0,01	0,5 ±	0,1	3,0 ± 0,7
	Total	0,34 ±	0,01	1,4 ±	0,1	9,1 ± 0,6
	S1	0,14 ±	0,05	0,4 ±	0,1	2 ± 1
Processo	S2	0,28 ±	0,20	0,8 ±	0,2	5 ± 1
de limpeza	S3	0,12 ±	0,03	0,58 ±	0,04	$3,8 \pm 0,4$
	Total	0,5 ±	0,1	1,72 ±	0,08	11,6 ± 0,4

Tabela 6.2 - Composição química dos extratos SFE de urucum obtidos da OEC PS1 em cada separador da unidade piloto.

Quanto ao aspecto físico, os extratos obtidos nos três separadores apresentaram mesma coloração, vermelho escuro intenso característico da bixina; e os extratos obtidos em S1 apresentaram consistência mais viscosa, enquanto que em S2 e S3 foi mais líquida.

Devido à quantidade significativa de massa de extrato em S3, nada se pode afirmar sobre a eficiência das condições operacionais adotadas nos separadores, pois parte do extrato pode ter sido arrastada e/ou solubilizada no fluxo de CO₂. Estudos da etapa de separação devem ser aprofundados a fim de se otimizar as condições operacionais separação e/ou concentração dos compostos de interesse.

3.4. OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE PROCESSO

As OECs fornecem informações que influenciam o tempo de processo. O ajuste dos dados experimentais ao *spline* de três retas (Figura 6.1) permitiu calcular os parâmetros cinéticos e os dados estão apresentados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Parâmetros	cinéticos	obtidos	do modelo	do ajuste	dos dados	experimentais
da OEC LS1.				-		-

Parâmetros	Valores	Descrição
t _{CER} [min.]	22 ± 2	Período CER
R _{CER} [%, b.s.]	1,6 ± 0,1	Rendimento em CER.
t _{CER2} [min.]	33 ± 2	Tempo na intersecção entre CER e DC.
R _{CER2} [%, b.s.]	1,8 ± 0,1	Rendimento durante CER2.
t _{FER} [min.]	85 ± 9	Período FER.
R _{FER} [%, b.s.]	$2,64 \pm 0,05$	Rendimento em FER.
M _{CER} [x 10 ⁻⁶ kg/s]	2,1 ± 0,3	Taxa de transferência de massa em CER.
Vazão _{CER} [x 10 ⁻⁵ kg/s]	19,5 ± 0,3	Vazão média de CO ₂ em CER.
$S/F_{CER} [kg_{CO2}/kg_{Matéria-prima}]$	1,60± 0,01	Razão S/F em CER.
Y _{CER} [kg _{extrato} /kg _{CO2}]	0,011 ± 0,001	Massa de soluto no solvente supercrítico na saída do extrator em CER.

Segundo Meireles [40], o t_{CER} e o t_{FER} representam a duração mínima e máxima do ciclo SFE, respectivamente, para manter a viabilidade econômica do processo, e que o tempo de processo economicamente viável geralmente está entre t_{CER} e o t_{FER}. O M_{CER} representa a taxa de transferência de massa na etapa de extração constante, CER. O Y_{CER} representa a concentração de extrato na fase supercrítica na saída do leito e é

calculada como a razão entre o M_{CER} e a vazão do solvente no período CER. O R_{CER} e o R_{FER} são os rendimentos de extração obtidos durante os períodos CER e FER, respectivamente.

Durante o período CER, t_{CER} , apenas 43,1% do extrato total foi recuperado, enquanto que no período FER, t_{FER} , foi 77,5%. O rendimento durante o período CER foi relativamente baixo. Além disso, um tempo curto de processo SFE demanda maior quantidade de matéria-prima para a produção de uma quantidade predeterminada de extrato, elevando o custo operacional [4]. A intersecção das retas CER e DC, t_{CER2} , pode representar uma estimativa inicial apropriada de duração de processo [51]. O t_{CER2} foi em 33 minutos de processo (Tabela 6.3) com 53% do extrato total recuperado.

No entanto, um rendimento maior em extrato não indica um rendimento elevado em composto alvo. Por isso, uma análise da composição química pode indicar o tempo de processo favorável do ponto de vista da qualidade do extrato. Isto, aliado a uma análise do COM dos extratos, pode indicar qual o tempo de processo viável do ponto de vista econômico.

3.4.1. OTIMIZAÇÃO DO PONTO DE VISTA DA QUALIDADE DO EXTRATO

A qualidade do extrato em função do tempo foi avaliada a fim de se determinar a duração do processo SFE, considerando a qualidade desejada no produto final. A Figura 6.6 e a Figura 6.6 mostram as concentrações de γ -T3 e δ -T3 nos extratos ao longo da LS1 e da PS1, respectivamente. O δ -T3 é o composto alvo devido as suas propriedades hipocolesterolêmica e antioxidante [1, 2]. Foi observado que γ -T3 e δ -T3 apresentaram concentrações menores no extrato no início do processo para ambas as escalas.

Em LS1 (Figura 6.6), os picos de concentração de γ -T3 (3,6%) e δ -T3 (24,3%) foram ambos em 120 minutos de extração, com S/F = 8,3, e decresceram gradualmente para maiores tempos de processo. Assim, do ponto de vista da qualidade do extrato, o tempo processo pode se estender até o período DC, 120 minutos.

Da mesma forma para a PS1 (Figura 6.7), os picos de concentração de γ -T3 (3,3%) e δ -T3 (24%) foram ambos em 105 minutos de extração, com S/F = 8,8, e decresceram gradualmente para maiores tempos de processo.





Figura 6.6 - Teor de γ -T3 (azul) e δ -T3 (vermelho) no extrato durante LS1 mais o obtido no processo de limpeza (CP – *Cleaning Process*).



S/F, kg_{CO2}/kg_{matéria-prima}



As cinéticas de extração de γ -T3 e δ -T3, em relação à matéria-prima (b.s.) (Figura 6.3), mostram que, após os 120 minutos (LS1), e 105 minutos (PS1), a taxa de extração decresceu. Este comportamento também foi observado no rendimento em extrato (Figura

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

6.2), quando a taxa de transferência de massa já se encontrava no período difusional da extração, DC, para ambas as escalas. Além disso, mais de 70% do total de extrato, e do total de γ -T3 e δ -T3, foram recuperados até o início do período DC, também para ambas as escalas.

Portanto, do ponto de vista de processo, a duração da SFE não deve se estender além de 120 minutos (LS1), e 105 minutos (PS1), uma vez que as taxas de extração de extrato e de T3, γ -T3 e δ -T3, foram decrescentes. Após estes tempos de extração, foi observada uma tendência de queda na concentração de γ -T3 e δ -T3, indicando que no período DC outros compostos estavam sendo coextraídos.

No entanto, uma análise de custo de manufatura poderia indicar qual o tempo de extração mais viável para o processo.

3.4.2. OTIMIZAÇÃO DO PONTO DE VISTA DO COM ECONOMICAMENTE VIÁVEL

Os dados econômicos obtidos na simulação do processo SFE de sementes de urucum representam os cenários do investidor, que adquire a matéria-prima a um custo de 2,20 US\$/kg (Tabela 6.4), do produtor e da indústria de colorante, que adquire a custo zero (Tabela 6.6).

O custo da matéria-prima apresentou forte influência sobre o COM devido ao seu custo relativamente alto. Por isso, a diferença mínima observada foi de 83 US\$/kg de extrato quando o custo de aquisição da matéria-prima foi de 2,20 US\$/kg (Tabela 6.4) para zero (Tabela 6.6). Os itens de custo que levam em conta a matéria-prima, como o custo operacional e o custo de investimento, que inclui o capital de giro, consequentemente diminuíram. Os COMs para os cenários estudados aumentaram com o tempo devido à diminuição na taxa de produção anual de extrato.

Para o cenário do investidor (Tabela 6.5), o CRM foi o fator majoritário na composição do COM e aumentou quando as capacidades das unidades aumentaram por causa da grande quantidade de matéria-prima demandada por essas unidades. Consequentemente, com o aumento do tempo de processo, o CRM diminuiu devido à diminuição da demanda de matéria-prima por batelada.

Tabela 6. com sem	.4 - Dados eco entes deseng	onômicos obtidos d orduradas e com ól	la simulação do p eo SFE de urucur	rocesso SFE com cu n (cenário do investio	usto de matéria-prima dor).	a de US\$ 2,2	0/kg e receita	
Unidade	Tempo	Matéria-prima	Investimento	Custo operacional	Produção total	COM		
L	min.	ton./ano	×10 ³ US\$/ano	×10 ³ US\$/ano	ton./ano	US\$/kg	Relomo (ano)	
5								
	27,5 ± 5	59 ± 10	186 ± 2	295 ± 23	1,01 ± 0,18	294 ± 31	nv	
	54 ± 8	30 ± 4	181 ± 1	230 ± 9	0,63 ± 0,11	368 ± 50	nv	
	80 ± 10	20 ± 2	179 ± 0	208 ± 5	0,47 ± 0,07	441 ± 49	nv	
	105 ± 10	15 ± 1	178 ± 0	197 ± 3	0,39 ± 0,04	510 ± 47	nv	
	134 ± 7	12 ± 0	177 ± 0	190 ± 1	0,32 ± 0,01	590 ± 21	nv	
50								
	27,5 ± 5	593 ± 101	635 ± 21	1.701 ± 228	10,08 ± 1,73	169 ± 6	nv	
	54 ± 8	301 ± 41	576 ± 9	1.051 ± 94	6,30 ± 1,07	167 ± 13	nv	
	80 ± 10	203 ± 23	556 ± 5	832 ± 54	4,75 ± 0,65	176 ± 13	nv	
	105 ± 10	154 ± 13	546 ± 3	723 ± 30	3,87 ± 0,42	187 ± 13	nv	
	134 ± 7	121 ± 5	539 ± 1	649 ± 12	3,21 ± 0,13	202 ± 5	nv	
300								
	27,5 ± 5	3.539 ± 644	2.155 ± 132	8.697 ± 1.456	60,50 ± 10,34	144 ± 1	nv	
	54 ± 8	1.797 ± 267	1.803 ± 56	4.817 ± 612	37,78 ± 6,39	128 ± 5	nv	
	80 ± 10	1.211 ± 152	1.684 ± 32	3.511 ± 353	28,49 ± 3,90	123 ± 5	nv	
	105 ± 10	921 ± 88	1.625 ± 19	2.862 ± 206	23,20 ± 2,52	124 ± 5	nv	
	134 ± 7	723 ± 38	1.585 ± 8	2.419 ± 91	19,25 ± 0,78	126 ± 0	nv	
500								
	27,5 ± 5	5.932 ± 1.006	3.141 ± 207	14.224 ± 2.280	100,83 ± 17,24	141 ± 2	8 ± 7	
	54 ± 8	3.013 ± 410	2.550 ± 86	7.721 ± 945	62,98 ± 10,66	123 ± 6	2 ± 1	
	80 ± 10	2.031 ± 229	2.351 ± 49	5.532 ± 536	47,49 ± 6,51	117 ± 5	2 ± 1	
	105 ± 10	1.545 ± 128	2.252 ± 28	4.446 ± 304	38,66 ± 4,21	115 ± 5	2 ± 0,6	
	134 ± 7	1.213 ± 48	2.185 ± 11	3.702 ± 120	32,08 ± 1,30	115 ± 1	2 ± 0,2	

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

nv – não viável

Unidade L	CRM (%)		CRM (%) COL (%)			F	FCI (%)			CQC (%)				6)	
5															
	44	±	4	37	±	3	12	±	0,9	5,6	±	0,4	1,0	±	0,1
	29	±	3	47	±	2	15	±	0,6	7,1	±	0,3	1,1	±	0,1
	22	±	2	52	±	1	17	±	0,4	7,9	±	0,2	1,1	±	0,1
	17	±	1	55	±	1	18	±	0,3	8,3	±	0,1	1,1	±	0,1
	14	±	0	58	±	0	18	±	0,1	8,6	±	0,1	1,1	±	0,0
50															
	77	±	3	13	±	2	6	±	1	1,9	±	0,3	1,8	±	0,1
	64	±	3	21	±	2	10	±	1	3,1	±	0,3	2,4	±	0,1
	54	±	3	26	±	2	13	±	1	3,9	±	0,3	2,8	±	0,1
	48	±	2	30	±	1	15	±	1	4,5	±	0,2	3,0	±	0,1
	42	±	1	34	±	1	16	±	0	5,1	±	0,1	3,2	±	0,1
300															
	90	±	1	4	±	1	3	±	1	0,6	±	0,1	2,1	±	0,0
	83	±	2	7	±	1	6	±	1	1,0	±	0,1	3,1	±	0,0
	77	±	2	9	±	1	9	±	1	1,4	±	0,1	4,0	±	0,0
	72	±	2	11	±	1	10	±	1	1,7	±	0,1	4,6	±	0,0
	67	±	1	14	±	1	12	±	0	2,0	±	0,1	5,2	±	0,1
500															
	92	±	1	2	±	0	3	±	0	0,4	±	0,1	2,2	±	0,0
	87	±	1	4	±	1	5	±	1	0,6	±	0,1	3,3	±	0,0
	82	±	1	6	±	1	7	±	1	0,9	±	0,1	4,2	±	0,1
	77	±	1	7	±	1	9	±	1	1,1	±	0,1	5,0	±	0,1
	73	±	1	9	±	0	11	±	0	1,3	±	0,0	5,7	±	0,1

Tabela 6.5 - Fatores que compõem o custo de manufatura dos extratos: matéria-prima de US\$ 2,20/kg e receita com sementes desengorduradas e com óleo SFE de urucum (cenário do investidor).

Unidade	Investimento		Custo oper	Custo operacional		<u>C(</u>	DM		Retorn	Retorno Produtor			Retorno Indústria			
L	×10 ³ US\$/ano			×10 ³ US	×10 ³ US\$/ano			US\$/ka			(ano)			(ano)		
5						-		<u>, c</u>	,							
	174,56	±	0,06	165	±	1	164	±	29	nv			nv			
	174,49	±	0,04	164	±	0	263	±	46	nv			nv			
	174,46	±	0,03	164	±	0	347	±	47	nv			nv			
	174,45	±	0,02	163	±	0	423	±	45	nv			nv			
	174,43	±	0,01	163	±	0	507	±	21	nv			nv			
50																
	516,2	±	0,6	396	±	7	40	±	6	2	±	1	nv			
	515,5	±	0,4	388	±	4	62	±	10	8	±	4	nv			
	515,3	±	0,3	385	±	3	81	±	11	nv			nv			
	515,1	±	0,2	383	±	2	99	±	10	nv			nv			
	515,0	±	0,1	382	±	1	119	±	4	nv			nv			
300																
	1.447	±	4	911	±	40	15	±	2	0,4	±	0,1	1,3	±	0,4	
	1.443	±	2	863	±	26	23	±	3	0,7	±	0,1	1,9	±	0,6	
	1.442	±	2	846	±	19	30	±	3	1,0	±	0,2	2,4	±	0,7	
	1.441	±	1	835	±	13	36	±	3	1,2	±	0,2	3,0	±	0,8	
	1.440	±	1	827	±	8	43	±	1	1,5	±	0,1	3,7	±	0,4	
500																
	1.955	±	6	1.173	±	66	12	±	1	0,2	±	0,1	0,5	±	0,1	
	1.947	±	4	1.093	±	43	17	±	2	0,4	±	0,1	0,7	±	0,2	
	1.945	±	3	1.065	±	32	23	±	2	0,5	±	0,1	0,9	±	0,2	
	1.943	±	2	1.047	±	22	27	±	2	0,6	±	0,1	1,0	±	0,2	
	1.942	±	1	1.034	±	14	32	±	1	0,8	±	0,1	1,2	±	0,1	

Tabela 6.6 - Dados econômicos obtidos da sim	iulação do processo	SFE: matéria-prima de	US\$ 0,00/kg e	e receita com semer	ntes
desengorduradas e com óleo SFE de urucum ((cenário do produtor); e receita com óleo SF	E de urucum (cenário da indústria	ı).

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

nv – não viável.

Unidade					~	_		、 、		.					
L	С						F	-CI (%	»)	С	%)	CUT (%)			
5															
	0,5	±	0,1	66,4	±	0,3	21,3	±	0,1	9,95	±	0,04	1,9	±	0,3
	0,4	±	0,1	66,7	±	0,2	21,4	±	0,1	10,00	±	0,02	1,5	±	0,2
	0,3	±	0,0	66,8	±	0,1	21,5	±	0,0	10,02	±	0,02	1,4	±	0,2
	0,3	±	0,0	66,9	±	0,1	21,5	±	0,0	10,03	±	0,02	1,3	±	0,1
	0,3	±	0,0	66,9	±	0,1	21,5	±	0,0	10,04	±	0,01	1,3	±	0,1
50															
	2,2	±	0,3	55,2	±	0,9	26,6	±	0,4	8,3	±	0,1	7,7	±	1,2
	1,6	±	0,2	56,4	±	0,6	27,1	±	0,3	8,5	±	0,1	6,5	±	0,8
	1,3	±	0,1	56,8	±	0,5	27,3	±	0,2	8,5	±	0,1	6,0	±	0,6
	1,2	±	0,1	57,0	±	0,3	27,5	±	0,1	8,6	±	0,1	5,7	±	0,4
	1,1	±	0,0	57,2	±	0,2	27,6	±	0,1	8,6	±	0,0	5,5	±	0,3
300															
	5,7	±	0,7	36,0	±	1,6	32,8	±	1,5	5,4	±	0,2	20,1	±	2,5
	4,2	±	0,5	38,0	±	1,1	34,6	±	1,0	5,7	±	0,2	17,5	±	1,9
	3,6	±	0,3	38,8	±	0,9	35,3	±	0,8	5,8	±	0,1	16,5	±	1,5
	3,3	±	0,2	39,3	±	0,6	35,7	±	0,6	5,9	±	0,1	15,8	±	1,1
	3,1	±	0,1	39,6	±	0,4	36,1	±	0,4	5,9	±	0,1	15,3	±	0,7
500															
	7,4	±	0,8	28,0	±	1,6	34,4	±	2,0	4,2	±	0,2	26,0	±	3,0
	5,5	±	0,5	30,0	±	1,2	36,9	±	1,5	4,5	±	0,2	23,1	±	2,3
	4,8	±	0,4	30,8	±	0,9	37,9	±	1,1	4,6	±	0,1	21,8	±	1,8
	4,4	±	0,3	31,3	±	0,7	38,5	±	0,8	4,7	±	0,1	21,0	±	1,3
	4,2	±	0,2	31,7	±	0,4	39,0	±	0,5	4,8	±	0,1	20,3	±	0,8

Capítulo 6 – Extração supercrítica de tocotrienóis de urucum

Para os cenários dos produtores de sementes e das indústrias de colorante (Tabela 6.7), o CRM, representado pela reposição do CO₂ perdido durante a etapa de despressurização, foi o fator minoritário. Enquanto que o COL e FCI foram os fatores majoritários na contribuição do COM para todas as capacidades estudadas.

Considerando pessimistas os preços de venda de óleo e de sementes desengorduradas, US\$ 12,67/kg de extrato e US\$ 1,25/kg de sementes, respectivamente, apenas a unidade de 500 L foi economicamente viável para o cenário do investidor, com tempo de retorno de aproximadamente dois anos (Tabela 6.4). A receita com a venda das sementes desengorduradas, no cenário do produtor, influenciou no tempo de retorno de investimento para unidades de mesma capacidade, em relação ao cenário da indústria. Ainda assim, o tempo de retorno para as indústrias variou apenas de 0,3-2,2 anos a mais em relação ao tempo de retorno para os produtores (Tabela 6.6). Assim, o processo SFE foi economicamente viável no início do processo para 50 L (cenário do produtor) e para as capacidades de 300 e 500 L (cenários do produtor e da indústria).

A Figura 6.8 mostra os COMs dos extratos para os cenários estudados nas escalas 5, 50, 300 e 500 L.

No cenário do investidor, o tempo de ciclo mais favorável do ponto de vista econômico foi em 105 minutos, com COM de (115 ± 5) US\$/kg para a unidade de 500 L. Essa duração de processo foi selecionada como sendo também o tempo de ciclo favorável do ponto de vista da qualidade do extrato. Portanto, a SFE de óleo de urucum pode ser obtida em 313 K/20 MPa, em 105 minutos e S/F de 8,7.

Para os cenários, produtor e indústria, os menores COMs foram (40 ± 6) US\$/kg, (15 ± 2) US\$/kg, e (12 ± 1) US\$/kg, para as capacidades de 50, 300 e 500 L, respectivamente. Estes COMs foram obtidos em 28 minutos de extração. Este tempo foi próximo ao t_{CER} e t_{CER2} (Tabela 6.3) que são considerados pela literatura [40, 51] como sendo o tempo de ciclo economicamente viável. Neste caso, a SFE de óleo de urucum pode ser obtida em 313 K/20 MPa, em 28 minutos e S/F de 3,1.

É interessante observar que o preço de venda do óleo de urucum no mercado brasileiro não leva em conta a composição em tocotrienóis. O óleo é vendido com função apenas de colorante. Já no mercado internacional é possível encontrar tocotrienóis de urucum sendo comercialmente vendidos. O Delta Gold[®] contém mais de 90% de tocotrienóis [53] e o δ -T3 custa em média US\$ 32,00/g em formulações de suplementos funcionais. Considerando o tempo de processo favorável do ponto de vista da qualidade

do extrato, 105 minutos, a produção anual de δ -T3 seria (8,2 ± 0,3) % do extrato produzido (Tabela 6.2); e com base no preço médio de venda do δ -T3 de urucum em suplementos comerciais, o preço de venda do extrato SFE de urucum, rico em T3 e livre de solvente orgânico, poderia ser estimado em até US\$ 2.624/kg, uma vez que ainda precisa ser purificado. Este valor está acima dos COMs dos extratos para todas as capacidades em todos os cenários estudados.



Figura 6.8 - Estimativa do COM de óleo SFE de urucum com custo de matéria-prima de US\$ 2,20/kg (a) e US\$ 0,00/kg (b).

4. CONCLUSÕES

O critério adotado para o aumento de escala de laboratório para a escala piloto foi validado uma vez que as OECs determinadas em ambas as escalas tiveram eficiência similar. Na etapa de extração, o teor de óleo residual nas sementes de urucum pode ser controlado apenas ajustando as condições operacionais de processo. Na etapa de separação, extratos com diferentes concentrações em tocotrienóis podem ser obtidos nos três separadores. O tempo de ciclo de processo mais favorável, do ponto de vista de qualidade de extrato, foi 105 minutos de extração com rendimento de 8% de δ -T3 no extrato. O δ -T3 em alta concentração pode ser obtido, o que pode facilitar no processo de purificação para aplicação em formulações de suplementos funcionais. A SFE é um processo economicamente viável para o investidor, assim como para a inserção na cadeia produtiva do urucum, tanto na região produtora, quanto na indústria de colorantes, desengordurando as sementes como pré-tratamento antes do processo de obtenção da bixina. Desde que o óleo de urucum tem propriedades funcionais devido à presença de tocotrienóis, o valor do extrato pode ser especificado levando em consideração a qualidade do produto final.

AGRADECIMENTOS

C.L.C. Albuquerque agradece ao CNPq: 143092-2008-1 pela bolsa de doutorado. Os autores agradecem ao apoio financeiro do CNPq e da FAPESP Processo: 2009/17234-9 à pesquisa. Os autores também são gratos a Dr.^a Eliane G. Fabri, do Instituto Agronômico de Campinas – IAC, e Mr. W.H. Leong, da empresa Carotech Inc., Malaysia, pela doação das sementes de urucum e da amostra comercial Tocomin[®] 30%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1 B. Tan, Appropriate spectrum vitamin E and new perspectives on desmethyl tocopherols and tocotrienols, The Journal of the American Nutraceutical Association 8 (2005) 35-42.

2 B.C. Pearce, R.A. Parker, M.E. Demon, A.A. Qureshi, J.J.K. Wright, Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols, Journal of Medicinal Chemistry 35 (1992) 3595-3606.

3 A.A. Qureshi, B.C. Pearce, R.M. Nor, A. Gapor, D.M. Peterson, C.E. Elson, Dietary α -tocopherol attenuates the impact of γ -tocotrienol on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in chickens, The Journal of Nutrition 126 (1996) 389-394

4 C.L.C. Albuquerque, M.A.A. Meireles, Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process, The Journal of Supercritical Fluids, 66 (2012) 86-95.

5 L. Danielski, C. Zetzla, H. Henseb, G. Brunner, A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran, Journal of Supercritical Fluids 34 (2005) 133-14.

6 C.M.P. Sarmento, S.R.S. Ferreira, H. Hense, Supercritical fluid extraction (SFE) of rice bran oil to obtain fractions enriched with tocopherols and tocotrienols, Brazilian Journal of Chemical Engineering 23 (2006) 243-249.

7 C. Balachandran, P.N. Mayamol, S. Thomas, D. Sukumar, A. Sundaresan, C. Arumughan, An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications, Bioresource Technology 99 (2008) 2905–2912.

8 K. Gast, M. Jungferb, C. Saurec, G. Brunner, Purification of tocochromanols from edible oil, The Journal of Supercritical Fluids 34 (2005) 17–25.

9 H.L.N. Lau, Y.M. Choo, A.N. Ma, C.H. Chuah, Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of palm oil (Elaeis guineensis), Journal of Food Lipids 13 (2006) 210-221.

10 H.L.N. Lau, Y.M. Choo, A.N. Ma, C.H. Chuah, Quality of residual oil from palmpressed mesocarp fiber (Elaeis guineensis) using supercritical CO2 with and without ethanol, Journal of the American Oil Chemists Society 83 (2006) 893-898.

11 C.W. Puah, Y.M. Choo, A.N. Ma, C.H. Chuah, Solubility of tocopherol and tocotrienols from palm oil in supercritical carbon dioxide, Journal of Food Lipids 14 (2007) 377-385.

12 H.L.N. Lau, Y.M. Choo, A.N. Ma, C.H. Chuah, Selective extraction of palm carotene and vitamin E from fresh palm-pressed mesocarp fiber (Elaeis guineensis) using supercritical CO2, Journal of Food Engineering 84 (2008) 289-296.

13 T.H.J. Beveridge, B. Girard, T. Kopp, J.C.G. Drover, Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 1799-1804.

14 B. Bozan; F. Temelli, Supercritical CO2 extraction of flaxseed. Journal of the American Oil Chemists Society 79 (2002) 231-235.

15 B. Bozan; F. Temelli, Extraction of poppy seed oil using supercritical CO2, Food Chemistry and Toxicology 68 (2003) 422-426.

16 R. Bruni, A. Medici, A. Guerrini, S. Scalia, F. Poli, M. Muzzoli, G. Sacchetti, Wild Amaranthus caudatus seed oil, a nutraceutical resource from ecuadorian flora, Journal of Agriculture and Food Chemitry 49 (2001) 5455-5460.

17 A. Fratianni, M.F. Caboni, M. Irano, G. Panfili, A critical comparison between traditional methods and supercritical carbon dioxide extraction for the determination of tocochromanols in cereals, European Food Research and Technology 215 (2002) 353-358.

18 Y. Ge, Y. Ni, H. Yan, Y. Chen, T. Cai, Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using response surface methodology, Journal of Food Science 67 (2002) 239-243.

19 Y. Ge, H. Yan, B. Hui, Y. Ni, S. WANG, T. Cai, Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide, Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 685-689.

20 G. Panfili, L. Cinquanta, A. Fratianni, R. Cubadda, Extraction of wheat germ oil by supercritical CO2: Oil and defatted cake characterization, Journal of the American Oil Chemists Society 80 (2003) 157-161.

L.A. Follegatti-Romero, C.R. Piantino, R. Grimaldi, F. A. Cabral, Supercritical CO2 extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) seeds, The Journal of Supercritical Fluids 49 (2009) 323–329.

J.M. Prado, G. H.C. Prado, M.A.A. Meireles, Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue, Journal of Supercritical Fluids 56 (2011) 231–237.

23 FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Annatto Extracts: Chemical and Technical Assessment. Available at: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/cta_annatto.pdf.

N. Frega, M. Mozzon, F. Bocci, Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography–mass spectrometry, Journal of the American Oil Chemists' Society 75 (1998) 1723-1727.

25 Annatto tocotrienols: Reshaping the vitamin E landscape. Nutraceutical Business & Technology May-June 2009, ISSN 1745-8307. Available at: http://viewer.zmags.com/publication/4f9a932c#/4f9a932c/40.

26 R.C. Chisté, A.Z.Mercadante, A. Gomes, E. Fernandes, J.L.F.C. Lima, N. Bragagnolo, In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species, Food Chemistry 127 (2011) 419-426.

27 W.F. Castro, L.R.B. Mariutti, N. Bragagnolo, The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage, Food Chemistry 124 (2011) 126-131.

28 M.N.C. Harder, S.G. Canniatti-Brazaca, A.A.D. Coelho, V.J.M.Savino, C.F.O. Franco, Cholesterol and iron availability in yolk of laying hens feed with annatto (Bixa orellana), Animal 1 (2007) 477-482.

B. Tan, J. Foley, Tocotrienols and geranylgeraniol from Bixa orellana byproducts, Patent US6350453, 2002.

30 B. Tan, Annatto extract compositions, including geranyl geraniols and methods of use, Patent US20080031985, 2008.

31 C.F.O. Franco, E.G. Fabri, M. Barreiro Neto, M.H. Manfiolli, M.N.C. Harder, N.C.A. Rucker, Urucum: Sistemas de produção para o Brasil, EMEPA, APTA: João Pessoa, 2008, pp. 112.

A.J. Degnan, J.H. Von Elbe, R.W. Hartel, Extraction of annatto seed pigment by supercritical CO2, J. Food Science 56 (1991) 1656–1659.

33 R.R. Chao, S.J. Mulvaney, D.R. Sanson, F. Hsieh, M.S. Tempesta, Supercritical CO2 extraction of annatto (Bixa orellana) pigments and some characteristics of the color extracts, J. Food Science 56 (1991) 80-83.

34 S.G. Anderson, M.G. Nair, A. Chandra, E. Morrison, Supercritical fluid carbon dioxide extraction of annatto seeds and quantification of trans-Bixin by High Pressure Liquid Chromatography, Phytochemical Analysis 8 (1997) 247–249.

35 B.P. Nobre, R.L. Mendes, E.M. Queiroz, F.L.P Pessoa, J.P. Coelho, A.F. PALAVRA, Supercritical carbon dioxide extraction of pigments from Bixa orellana seeds (experiments and modeling), Brazilian J. Chemical Engineering 23 (2006) 251-258.

36 G.F. Silva, F.M.C. Gamarra, A.L. Oliveira, F.A. Cabral, Extraction of Bixin from Annatto seeds using supercritical carbon dioxide, Brazilian J. Chemical Engineering 25 (2008) 419-426.

37 Carotech Berhad, Tocomin[®] Natural Full Spectrum Palm Tocotrienol / Tocopherol Complex, Online at, 4 April 2012. Available at: http://www.carotech.net/index/product_range/tocomin.html.

38 A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) Official of analysis. 16th ed., Washington, 1997.

39 V.M. Rodrigues, E.M.B.D. Sousa, A.R. Monteiro, O. Chiavone-Filho, M.O.M. Marques, M.A.A. Meireles, Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO2: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure plus solvent, The Journal of Supercritical Fluids 22 (2002) 21-36.

40 M.A.A. Meireles, Extraction of bioactive compounds from Latin American plants, in: José Martinez (Ed.) Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, CRC Press – Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2008, pp. 243-274.

41 P.T.V. Rosa, M.A.M. Meireles, Cost of Manufacturing of Supercritical Fluid Extracts from condimentary plants, in: J. Martinez (Ed.), Extracting bioactive compounds for food products. CRC Press – Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008, pp. 388-401.

42 P.T.V. Rosa, M.A.M. Meireles, Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction, Journal of Food Engineering, 67 (2005) 235-240.

43 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Combined compendium of food additive specifications, in: 67th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, vol. 3, Rome, Italy, 2006, p. 11.

44 G. Panfili, A. Fratiannni, M. Irano, Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals, Journal agriculture food chemistry, 51 (2003) 3940-3944.

45 I.D. Desai; L.J. Machlin, Vitamin E, in: J. Augustin, B.P. Klein; D. Becker (Ed.), Methods of Vitamin, John Wiley & Sons Inc, New York, 1985, pp. 255-283.

46 R. Eitnmiller; J. Lee, Vitamin E: Food Chemistry, Composition and Analysis, Macel Dekker Inc., New York, 2004.

47 I.M Prado, C.L.C. Albuquerque, R.N. Cavalcanti, M.A.A. Meireles, Use of commercial process simulator to estimate the cost of manufacturing (COM) of carotenoids obtained via supercritical technology from palm and buriti trees, in: 9th International Symposium on Supercritical Fluids, Arcachon, França, May 18-20, 2009b, Full paper available in 9th International Symposium on Supercritical Fluids 209 CD-ROM.

48 M. Perrut, Industrial applications of supercritical fluids: development status and scale-up issues. In: I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, Foz do Iguaçu, Brazil, 2007.

49 I.M. Prado, Use of simulator in scale up and economic viability of supercritical fluid extraction from natural sources. Master Thesis, University of Campinas, < http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=727>, 2009 (in Portuguese).

50 Beraca Sabará Químicos e Ingredientes S.A., 2012. Disponível de: www.beraca.com.br.

51 P.F. Leal, Comparative study of cost of manufacturing and functional properties of volatile oils obtained by supercritical fluid extraction and steam distillation, Ph.D. Thesis, University of Campinas. http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver documento.php?did=537>, 2008 (in Portuguese).

52 E.M.B.D. Sousa, O. Chiavone-Filho, M.T. Moreno, D.N. Silva, M.O.M Marques, M.A.A. Meireles, Experimental resoults for the extraction of essencial oil from *Lippia sidoides* Cham. Using pressurized carbon dioxide, Brazilian Journal of Chemical Engineering 2 (2002) 229-241.

53 American River Nutrition, Inc. The purest natural form of delta tocotrienol avaiable in the world. Avaiable at: http://americanrivernutrition.com/.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, a primeira etapa do projeto, apresentada no **Capítulo 2**, foi realizar uma pesquisa sobre o estado da arte da agroindústria do urucum.

A pesquisa mostrou uma tendência crescente do uso do urucum como produto natural devido aos avanços de soluções tecnológicas importantes nos vários setores da cadeia produtiva. Essas soluções tinham como objetivos tornar os colorantes naturais mais estáveis à luz, ao meio ácido, ao calor etc., a fim de encontrar novas aplicações e diminuir problemas de fornecimento. Tais avanços resultaram no aumento da área de produção devido às vantagens oferecidas, que foram fundamentais para agregar valor ao urucum e, consequentemente, proporcionar importantes benefícios socioeconômicos às regiões produtoras.

No entanto, a pesquisa também mostrou alguns problemas que necessitaram ser levados em consideração, como a valorização socioeconômica dos produtores no Brasil; a obtenção de extrato com maior qualidade pelos processos mais utilizados nas indústrias de colorantes; e o aproveitamento dos subprodutos dos processos. Assim, a SFE de óleo de urucum com CO₂ supercrítico foi cogitada como opção de processo para obter extrato rico em substâncias funcionais, e deixar as sementes ricas em bixina, para posterior extração: ambos sem resíduos de solvente. Com essas características, o processo agregaria valor aos produtos/subprodutos do urucum e, consequentemente, traria benefícios sócio-econômicos às regiões produtoras.

Assim, a etapa seguinte do projeto foi realizar um estudo preliminar de viabilidade econômica do processo SFE de óleo de urucum com CO₂ supercrítico, usando os dados disponíveis na literatura para economizar o uso de insumos necessários em ensaios experimentais. O trabalho foi apresentado no **Capítulo 3**. O processo SFE foi simulado em escalas piloto e industriais, usando o *software* SuperPro Designer[®] versão 6.0. Os parâmetros operacionais otimizados da SFE de extrato de cúrcuma foram também simulados para comparação. O estudo mostrou que os parâmetros otimizados permitiram determinar o tempo de processo economicamente viável para a SFE de cúrcuma. E que, apesar dos dados otimizados de SFE do extrato de urucum não estarem disponíveis, ainda assim, a simulação do processo em diferentes escalas industriais mostrou que a SFE de óleo de urucum pode ser viável, uma vez que os COMs do extrato foram US\$

382,82/kg (100 L), US\$ 258,54/kg (500 L) e US\$ 232,88/kg (1000 L), concluindo que foi possível diminuir o COM dos extratos com parâmetros de processo otimizados.

Por isso, a próxima etapa do projeto, apresentada no **Capítulo 4**, foi estudar o processo SFE de sementes inteiras de urucum para estimar o COM dos extratos com parâmetros operacionais otimizados. As condições estudadas foram 313 e 333 K e 20, 31 e 40 MPa. O maior rendimento em extrato, $(2,2 \pm 0,4)$ %, foi obtido em 333 K/40 MPa. Nesta condição, foi recuperada a maior quantidade de bixina das sementes, $(0,040 \pm 0,004)$ %.

Com a determinação das IRGs foi observado que o rendimento em extrato não foi influenciado significativamente com a mudança na temperatura e pressão do processo, embora se tenha observado uma tendência de aumento, quando a temperatura aumentou em pressão constante. O teor de bixina aumentou significativamente quando a temperatura e a pressão foram elevadas de 313 K/20 MPa para 333 K/40 MPa. E o δ -T3 foi obtido em 313 K/20 MPa em concentração significativamente maior do que as concentrações obtidas nas outras condições operacionais estudadas.

Estudos de SFE de bixina na literatura mostraram que a solubilidade da bixina ficou entre 0,001-0,050 g/kg CO₂. Alguns autores verificaram que a solubilidade da bixina das sementes no CO₂ foi maior do que a da bixina pura e concluíram que o óleo das sementes poderia estar agindo como cossolvente, aumentando a eficiência da extração. A bixina em sua forma *cis*- é insolúvel em solventes apolares, enquanto que a forma *trans*- é solúvel em solventes apolares. Devido à temperatura baixa do processo SFE, a bixina das sementes pode não ter sido degradada; ou pode ter sido pouco degradada à sua forma *trans*-, e por isso tenha sido extraída pelo CO₂. Neste caso, o óleo das sementes pode ter funcionado sim como cossolvente e aumentado o rendimento em bixina no extrato, como foi relatado por alguns autores na literatura.

No entanto, neste trabalho, o comportamento da curva de extração para a bixina indicou que a resistência ao mecanismo de transferência de massa se localizou apenas na fase fluida (CO₂+bixina) provavelmente devido à bixina estar disponível apenas na superfície das sementes; e possivelmente também à limitação da solubilidade da bixina no CO₂. Portanto, o óleo contido na semente não aumentou o rendimento em bixina.

A eficiência do processo SFE na obtenção de extrato de urucum, quando comparado ao processo Soxhlet utilizando sementes inteiras, foi de 100% para o tempo

Conclusões gerais

total da extração, 420 minutos. Uma extração por Soxhlet das sementes, já extraídas por SFE, mostrou que este processo desengordurou quase que completamente as sementes, com 85% de eficiência em relação ao teor de lipídios das sementes moídas. Para a curva de extração do extrato de urucum, foi observado um comportamento típico, apresentando os três períodos da extração: CER, FER e DC. Isto indica que existe óleo, tanto na superfície, quanto no interior da semente. No entanto, a moagem das sementes antes do processo SFE não é necessária, uma vez que a eficiência na obtenção do extrato de urucum foi satisfatória (85%); além disso, o custo desse pré-tratamento aumentaria ainda mais o COM do extrato.

A análise do COM do extrato em cada tempo da curva de extração permitiu determinar o tempo de processo viável do ponto de vista econômico, que foi de 40 min. (US\$ 296,78/kg), com rendimento de 2,12% em extrato, contendo 0,7% em bixina, e S/F=2,4. Os primeiros 40 minutos abrangeram as regiões CER e FER da extração. Além disso, coincidiu com o t_{CER2} , que é a intersecção entre as retas das regiões CER e DC, obtidas do ajuste dos dados experimentais ao spline de 3 retas, e que é sugerido pela literatura para ser usado para estimar a duração do processo de extração como uma estimativa de tempo economicamente viável. Nesse tempo, o processo recuperou 60% do rendimento total, corroborando com a metodologia de que aproximadamente 60-80% do extrato é obtido nesta região da curva de extração.

A otimização do tempo de processo diminuiu o COM do extrato. Além disso, a composição do COM foi alterada quando comparada a composição do COM estimado, utilizando apenas dados não otimizados da literatura: 333 K/31 MPa, 1,89 % em extrato, S/F=40, 250 minutos de extração; e 76 % de FCI, 3 % de CRM (**Capítulo 3**).

Com a otimização do tempo de processo, o CRM passou a ser o fator majoritário (33%), enquanto que o FCI (14%) diminuiu significativamente. Para as escalas industriais de capacidades 100 e 500 L, os COMs estimados com parâmetros otimizados caíram 66% e 58%, respectivamente. Esses valores equivalem a 33% e 42% dos COMs estimados, quando os parâmetros de processos não estavam otimizados. Com a diminuição do tempo de processo, o número de bateladas por ano aumentou, elevando consequentemente a demanda por matéria-prima e a taxa de produção de extrato. Assim, o aumento da taxa de produção anual contribuiu para a diminuição do COM. E o custo da matéria-prima (CRM) foi o fator que mais influenciou o COM do extrato.

Devido à grande demanda por matéria-prima, o CRM continuou sendo o fator majoritário e responsável por quase 90% do COM para a capacidade de 500 L. O COM decresceu de US\$ 124,58/kg para US\$ 109,27/kg quando a escala aumentou de 100 para 500 L, respectivamente. Para a escala piloto, o custo foi US\$ 292,5kg. Os COMs dos extratos estimados nesta etapa do projeto estão entre os valores esperados para extratos SFE (US\$ 25/kg – US\$ 7.000/kg), dependendo do custo da matéria-prima.

É importante ressaltar aqui que, após o processo SFE, o pó de bixina se soltava facilmente das sementes de urucum, com a mínima fricção durante o desempacotamento da célula de extração. Isto mostrou que o processo SFE serviu de pré-tratamento, desengordurando as sementes, e que bixina com alta pureza pode ser obtida por outros processos limpos, tais como pela simples abrasão das sementes.

A triagem dos extratos SFE por CCD (Capítulo 5) permitiu acompanhar o perfil químico dos extratos ao longo do estudo de otimização das condições operacionais e auxiliou nas tomadas de decisões com respeito à seleção dos compostos de interesse que deveriam ser estudados. O perfil químico dos extratos SFE foi similar para todas as condições de temperatura e pressão das IRG. Em função do tempo de extração (OEC), a concentração dos compostos antioxidantes, fenólicos e os com características de óleo volátil tiveram suas concentrações diminuídas, enquanto que a concentração de bixina aumentou. Os compostos antioxidantes γ -T3 e δ -T3, assim como o esqualeno e o β sitosterol foram identificados através da comparação de seus Rfs com os dos mesmos compostos da amostra comercial Tocomin 30%. A bixina apresentou atividade antioxidante, porém em menor intensidade comparada a do δ -T3. Uma vez que se trata de uma análise qualitativa, não se pode afirmar em que condição de temperatura e pressão os extratos apresentaram maior ou menor concentração dos compostos antioxidantes, por isso, análises em HPLC confirmaram presença de γ -T3 e δ -T3 nos extratos SFE (**Capítulos 4 e 6**) com teores de δ -T3 que superaram as outras fontes de δ -T3, óleo de palma e farelo de arroz.

Os dados das OECs em escala de laboratório puderam prever o comportamento dos dados das OECs em escala piloto. Este método de estudo do aumento de escala pode ser usado com o critério de manter constantes a razão S/F e o tempo de residência do solvente no leito de extração. Este critério foi validado e está apresentado no **Capítulo 6**. O processo SFE de sementes de urucum apresentou eficiência similar de rendimento,

Conclusões gerais

tanto de extrato, quanto de tocotrienóis, em escalas de laboratório e piloto para as mesmas condições de processo e aumento de escala de 12 vezes, considerando a massa de matéria-prima utilizada. A etapa de separação na unidade piloto, com três separadores, foi bem sucedida porque foi possível obter produtos com concentrações diferentes em compostos de interesse. Do ponto de vista de processo, a duração da SFE não deve se estender além de 120 minutos (laboratório), e 105 minutos (piloto), uma vez que, após estes tempos, as taxas de extração de extrato e de T3, γ -T3 e δ -T3, foram decrescentes.

Na análise da viabilidade econômica do processo, a SFE foi economicamente viável no início do processo para 50 L (cenário do produtor) e para as capacidades de 300 e 500 L (cenários do produtor e da indústria). Para o cenário do investidor, o CRM foi o fator majoritário na composição do COM e aumentou quando as capacidades das unidades aumentaram por causa da grande quantidade de matéria-prima demandada por essas unidades. Ainda neste cenário, o tempo de ciclo mais favorável do ponto de vista econômico foi em 105 minutos, com COM de (115 ± 5) US\$/kg para a unidade de 500 L. Essa duração de processo foi selecionada como sendo também o tempo favorável do ponto de vista da qualidade do extrato. Portanto, a SFE de óleo de urucum pode ser obtida em 313 K/20 MPa, em 105 minutos e S/F de 8,7. Para os cenários, produtor e indústria, os menores COMs foram (40 ± 6) US\$/kg, (15 ± 2) US\$/kg, e (12 ± 1) US\$/kg, para as capacidades de 50, 300 e 500 L, respectivamente. Estes COMs foram obtidos em 28 minutos de extração. Este tempo foi próximo ao t_{CER} e t_{CER2} que são considerados como sendo o tempo de batelada economicamente viável. Neste caso, a SFE de óleo de urucum pode ser obtida em 313 K/20 MPa, em 28 minutos e S/F de 3,1.

Considerando o tempo de processo favorável do ponto de vista da qualidade do extrato, 105 minutos, a produção anual de δ -T3 seria (8,2 ± 0,3) % do extrato produzido; e com base no preço médio de venda do δ -T3 de urucum em suplementos comerciais, o preço de venda do extrato SFE de urucum, rico em T3 e livre de solvente orgânico, poderia ser estimado em até US\$ 2.624/kg, uma vez que ainda precisa ser purificado. Este valor está acima dos COMs dos extratos para todas as capacidades em todos os cenários estudados. Dependendo do produto final desejado, a tecnologia supercrítica se apresentou vantajosa pela seletividade, apenas com a modificação das condições de temperatura e pressão. Com a condição de processo operando em 313 K/20 MPa, um extrato mais concentrado em δ -tocotrienol pode ser obtido. Nesta condição, o teor de

bixina é o mais baixo das condições estudadas. Portanto, se obtém óleo rico em substâncias antioxidantes e com menos bixina, e sementes desengorduradas, ambos livres de solventes.

Finalmente, este estudo apresentou uma solução para o processamento do urucum (*Bixa orellana*), permitindo o aproveitamento do seu óleo, normalmente descartado, por uma tecnologia que utiliza temperaturas relativamente baixas evitando a degradação de compostos termolábeis e preparando, ao mesmo tempo, suas sementes para posterior obtenção dos colorantes. A tecnologia supercrítica obteve uma fração do óleo de urucum enriquecida em δ -tocotrienol que, devido à alta concentração, possibilita relativa facilidade de purificação para posterior uso em formulações de suplementos nutricionais. Adicionalmente, a tecnologia apresentou a vantagem de gerar sementes desengorduradas de urucum e óleo, com menor tempo e igual eficiência em relação ao processo extrator de óleo tradicional (160 minutos, contra 360 min do processo de extração convencional), isentos de resíduos de solventes tóxicos, podendo ser operado em diferentes escalas com igual eficiência.

O processo desenvolvido neste trabalho pode ser realizado em escala industrial e gera dois subprodutos aproveitáveis industrialmente sem resíduos de solventes tóxicos e sem a necessidade da pré-extração do óleo, empregando solventes aquosos e/ou orgânicos ou seu fracionamento em várias etapas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a obtenção de bixina das sementes desengorduradas com solventes GRAS pressurizados: água, etanol, e soluções alcalinas (hidróxido de sódio ou potássio), avaliando os parâmetros de temperatura e pressão no rendimento em bixina;
- Inserir uma maneira de fricção ou abrasão ao processo acima, durante, ou antes, do processo de extração de bixina das sementes desengorduradas, para verificar o aumento da eficiência da extração;
- Estudar o processo de purificação do δ-tocotrienol, estudando o equilíbrio de fases do sistema extrato SFE de urucum+CO₂, e posteriormente utilizar estes dados na seleção das condições de temperatura e pressão nos separadores da unidade piloto (5 L);
- Estudar o processo de clarificação do extrato, para que possa ser usado sem conferir cor aos produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, através da degradação da bixina, por exemplo.
- Inserir um fluxograma do processo de extração de bixina de urucum, acoplado ao processo SFE de óleo já existente, e estimar o COM dos produtos obtidos, assim como as rentabilidades para diferentes capacidades de equipamentos.
- Avaliar economicamente a obtenção de δ-tocotrienol por SFE das matrizes vegetais fontes, óleo de urucum, de palma e de farelo de arroz, através de estudo comparativo dos COMs de seus extratos SFE.

APÊNDICE
SUMÁRIO A

APÊNDICE	149
SUMÁRIO A	151
LISTA DE TABELAS	153
LISTA DE FIGURAS	159
1. UNIDADES DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	
1.1 UNIDADE SPE-ED SFE	
1.2 UNIDADE PILOTO THAR (5 L)	165
2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS	170
2.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS: CAPÍTULO 4	170
2.2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS: CAPÍTULO 6	
2.3 PROCEDIMENTO DO AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS	
2.4 MEDIÇÃO DE PROPAGAÇÃO DE ERROS	225
2.5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE URUCUM (UM - SEMENTES MISTAS)	
2.6 CROMATOGRAMAS DA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS	

LISTA DE TABELAS

Tabela A1 – Composição centesimal das sementes moídas de UP1.170
Tabela A2 - Caracterização das sementes inteiras de UP1: umidade, teor de bixina, teor
de lipídio, diâmetro das partículas, densidade real das sementes170
Tabela A3 – Dados de massa de extrato acumulado de UP1 obtido das curvas cinéticas
de extração em 333 K/40 MPa, em célula de 6,57 mL171
Tabela A4 – Dados de massa e rendimento de extrato de UP1 obtidos nas determinações
das Isotermas de Rendimento Global (IRG): dados operacionais em Table 1, Capítulo 4.
Tabela A5 - Dados de massa e rendimento de bixina no extrato obtidos nas
determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG) de UP1: dados operacionais
em Table 1, Capítulo 4172
Tabela A6 - Dados de massa e rendimento de Tocoferóis (T1), no extrato, obtidos nas
determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG) de UP1: dados operacionais
em Table 1, Capítulo 4173
Tabela A7 - Dados de massa e rendimento de Tocotrienóis (T3), no extrato, obtidos nas
determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG) de UP1: dados operacionais
em Table 1, Capítulo 4174
Tabela A8 - Dados de massa e rendimento de Tocoferóis (T1) e Tocotrienóis (T3) nos
extratos obtidos na extração de sementes inteiras com Soxhlet (S/F = 22.5 ± 0.04 ; massa
de matéria-prima = $(5,11 \pm 0,01)$ g) e na amostra comercial*175
Tabela A9 - Dados de massa de extrato acumulado obtido das curvas globais de extração
(OEC) de UP1 em 333 K/40 MPa, em célula de 290 mL176
Tabela A10 - Dados de massa de bixina no extrato e CO2, acumulados, obtido das curvas
globais de extração (OEC) de UP1 em 333 K/40 MPa, em célula de 290 mL177
Tabela A11 - Dados de extração por Soxhlet de sementes inteiras de UP1 (umidade:
9,71%), após SFE em 333 K/40 MPa (OEC 6 e 7): Éter de petróleo (Synth, Diadema, SP,
Brasil), com S/F = 35,92 ± 0,01178
Tabela A12 – Dados usados no software SuperPro Designer® para simular o processo
SFE de UP1 em 333 K/40 MPa e estimar o COM do extrato179

Tabela A13 – Dados de entrada para a simulação do processo SFE de UP1 em cada ponto da OEC até 105 min., em 333 K/40 MPa, e o COM do extrato para unidade com Tabela A14 – Composição do COM (%) e taxa de produção anual do extrato obtidos pelo simulador SuperPro Designer[®] em cada ponto da OEC de UP1, até 105 min. em 333 K/40 Tabela A15 - COM de extrato de UP1 (US\$/kg), composição do custo (%), taxa de produção anual de extrato e bixina (kg/ano), e demanda anual de matéria-prima, obtidos pelo simulador SuperPro Designer[®] quando simulado o aumento de escala de extratores com 5, 100 e 500 L, com tempo de processo = 40 min. e nas condições operacionais de Tabela A 16 – Parâmetros cinéticos do processo de SFE de UP1: OEC em 333 K/40 MPa. Tabela A17 - Caracterização das sementes de UP2: umidade, teor de bixina, teor de lipídio, diâmetro das partículas, densidade real das sementes......183 Tabela A18 - Dados de rendimento (%) de Tocoferóis (T1) e Tocotrienóis (T3) no extrato e na matéria-prima (MP), em base seca, obtidos na extração de sementes inteiras de UP2 Tabela A19 - Dados de rendimento de Tocoferóis (T1) e Tocotrienóis (T3) em amostra Tabela A20 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, das curvas globais de extração (OECs 8 e 9) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinadas na unidade Spe-ed em célula de 290 mL: dados calculados com base na matéria-prima seca, (8,9 ± Tabela A21 - Rendimento (%) acumulado de γ -T3 no extrato, obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).....186 Tabela A22 – Rendimento (%) de γ-T3 no extrato durante as curvas globais de extração Tabela A23 - Rendimento (%) acumulado de γ -T3 em relação à matéria-prima, em base seca, obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9)......188 Tabela A24 - Rendimento (%) acumulado de δ -T3 no extrato obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).....189

Tabela A25 - Rendimento (%) de δ-T3 no extrato durante as curvas globais de extração Tabela A26 - Rendimento (%) acumulado de δ -T3 em relação à matéria-prima, em base seca, obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).191 Tabela A27 - Dados dos parâmetros cinéticos para t_{CER}, t_{FER} e t_{CER2}: valores, média e amplitude......192 Tabela A28 - Parâmetros cinéticos obtidos do ajuste dos dados experimentais do processo de SFE de UP2 ao spline de três linhas retas: OEC 8 e 9 em 313 K/20 MPa..192 Tabela A29 - Dados usados no software SuperPro Designer[®] para simular o processo SFE de UP2 em 313 K/20 MPa e estimar o COM do extrato......193 Tabela A30 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, obtidos das curvas globais de extração (OECs 10 e 11) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinadas na unidade Spe-ed em célula de 290 mL: dados calculados com base na matéria-prima seca, Tabela A31 - Rendimento (%) acumulado de bixina^a no extrato obtidos das curvas globais de extração (OECs 10 e 11)......195 Tabela A32 - Rendimento (%) de bixina no extrato durante as curvas globais de extração Tabela A33 - Rendimento (%) acumulado de bixina^a em relação à matéria-prima, em base seca, obtidos das curvas globais de extração (OECs 10 e 11).....197 Tabela A34 - Dados de extração por Soxhlet de sementes inteiras de UP2 (umidade: 8,9%), após SFE em 313 K/20 MPa (OEC 10 e 11): Éter de petróleo (Synth, Diadema, SP, Brasil), com S/F = 35,58 ± 0,02......198 Tabela A35 - Dados de rendimento em extrato e razão S/F, em base seca, apresentados como média das porcentagens obtidas das OECs 8, 9 10 e 11......199 Tabela A36 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, obtidos das curvas globais de extração (Piloto 1 e 2) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinadas na unidade piloto em célula de 5 L: dados calculados com base na matéria-prima seca, (8,9 ± 0,2) % de umidade......200 Tabela A37 - Dados de tempo e rendimento (%) em extrato acumulado em cada separador (S) da unidade Piloto, obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e

Tabela A38 - Rendimento (%) de bixina no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de bixina: dados acumulados obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e Tabela A39 - Rendimento (%) de bixina no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de bixina: composição dos extratos durante as curvas globais de extração (OECs Tabela A40 - Rendimento (%) de bixina, por separador (S), e rendimento total (%) de bixina obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados acumulados e calculados em relação à matéria-prima seca......204 Tabela A41 - Rendimento (%) de γ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de γ-T3: dados acumulados obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e Tabela A42 - Rendimento (%) de γ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de γ-T3: composição dos extratos durante as curvas globais de extração (OECs Piloto Tabela A43 - Rendimento (%) de γ -T3, por separador (S), e rendimento total (%) de γ -T3 obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados acumulados e calculados em relação à matéria-prima seca......207 Tabela A44 - Rendimento (%) de δ-T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de δ-T3: dados acumulados obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e Tabela A45 - Rendimento (%) de δ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de δ-T3: composição dos extratos durante as curvas globais de extração (OECs Piloto Tabela A46 - Rendimento (%) de δ -T3, por separador (S), e rendimento total (%) de δ -T3 obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados acumulados e calculados em relação à matéria-prima seca......210 Tabela A 47 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, obtidos da extração (Piloto 3) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinada na unidade piloto em célula de 5,15L: dados calculados com base na matéria-prima seca com umidade igual a (8,9 ±

Tabela A48 – Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste
dos dados experimentais da OEC (333 K/40 MPa) de UP1 a um spline de 3 linhas retas:
PROC REG213
Tabela A49 - Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS 9,2 (SAS
Institute, Inc.)
Tabela A50 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste
dos dados experimentais da OEC (333 K/40 MPa) de UP1 a um spline de 3 linhas retas:
PROC NLIN
Tabela A 51 - Dados de saída do procedimento PROC NLIN do software SAS 9,2 (SAS
Institute, Inc.)
Tabela A52 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste
dos dados experimentais da OEC (313 K/20 MPa) de UP2 a um spline de 3 linhas retas:
PROC REG219
Tabela A53 - Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS 9,2 (SAS
Institute, Inc.)
Tabela A54 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste
dos dados experimentais da OEC (313 K/20 MPa) de UP2 a um spline de 3 linhas retas:
PROC NLIN
Tabela A 55 - Dados de saída do procedimento PROC NLIN do software SAS 9,2 (SAS
Institute, Inc.)
Tabela A56 – Dados de densidade aparente e porosidade do leito e das sementes de UP1
e UP2: parâmetros das IRGs e OECs nas unidades Spe-ed SFE e piloto ^a 225
Tabela A57 - Composição centesimal das sementes de UM-CO – Safra 2010226
Tabela A58 - Composição centesimal das sementes de UM-SO – Safra 2010226
Tabela A59 - Análise de umidade das sementes após 12 meses do recebimento da
matéria-prima
Tabela A60 - Caracterização das sementes de urucum misto com óleo volátil (UM_CO) e

LISTA DE FIGURAS

Figura A1 - Spe-ed SFE: (1). Banho de resfriamento; (2). Bomba pneumática; (3). Unidade
controladora de temperatura; (4). Totalímetro; (5). Rotâmetro; (6). Cilindro de CO ₂ 161
Figura A2 - Célula a: 6,57 mL; Célula b: 290 mL162
Figura A3 - Empacotamento do leito da célula b (VASCONCELLOS, 2007)162
Figura A4 - Fluxograma da unidade experimental Spe-ed SFE (adaptado de
VASCOCELLOS, 2007)163
Figura A5 - Unidade piloto (Thar Technologies, modelo SFE-2X5LF-2-FMC, Pittsburgh,
EUA)167
Figura A6 - Esquema de funcionamento da unidade piloto (Prado, 2010)169
Figura A7 - Dados de rendimento de extrato, em relação a matéria-prima em base seca,
por tempo de extração; e equações lineares das retas do ajuste dos dados experimentais
(OEC 6 e 7, em 333 K e 40 MPa) ao Spline de três retas: CER - constant extraction rate;
FER – falling extraction rate; DC – diffusion controlled218
Figura A 8 - Dados de rendimento de extrato, em relação a matéria-prima em base seca,
por tempo de extração; e equações lineares das retas do ajuste dos dados experimentais
(OEC 8 e 9, em 313 K e 20 MPa) ao Spline de três retas: CER - constant extraction rate;
FER – falling extraction rate; DC – diffusion controlled224

1. UNIDADES DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

As unidades de extração, Spe-ed SFE e piloto (5,15 L), foram usadas para a extração supercrítica de extrato das sementes de urucum. A unidade Spe-ed foi usada nos estudos apresentados nos Capítulos 4 e 6, e a unidade piloto, nos estudos do Capítulo 6. A seguir, os procedimentos operacionais das duas unidades são apresentados em mais detalhes do que nos artigos científicos publicados.

1.1 UNIDADE SPE-ED SFE

A unidade comercial Spe-ed SFE (Applied Separations, Inc., modelo 7071, Allentown, PA, EUA) é equipada com bomba pneumática, unidade controladora de temperatura (forno) e rotâmetro, e opera até 67 MPa de pressão e 513 K de temperatura (Figura A1).



Figura A1 - Spe-ed SFE: (1). Banho de resfriamento; (2). Bomba pneumática; (3). Unidade controladora de temperatura; (4). Totalímetro; (5). Rotâmetro; (6). Cilindro de CO₂.

1.1.1 PREPARO DO LEITO

As células de extração (Thar Designs, CL 1373, Pittsburg, EUA) utilizadas na unidade Spe-ed SFE estão apresentadas na Figura A2. O leito de extração (**a**) possui 2,00 cm de diâmetro e 2,09 cm de altura, totalizando volume de leito de 6,57 mL. E o leito de extração (**b**) possui 5,42 cm de diâmetro e 12,54 cm de altura, totalizando volume de leito de 290 mL.

O preparo do leito seguiu o procedimento padrão para todas as extrações: com uma das extremidades da célula fechada, depositou-se uma camada de lã de vidro em

sua base; acrescentou-se aos poucos a matéria-prima empacotando-a com o auxilio de um bastão cilíndrico de aço inox, para evitar a formação de caminhos preferenciais; posteriormente, depositou-se outra camada de lã de vidro por cima da matéria-prima e fechou-se a célula em seguida.



Figura A2 - Célula a: 6,57 mL; Célula b: 290 mL.



Figura A3 - Empacotamento do leito da célula b (VASCONCELLOS, 2007).

Na célula (**a**) ocupou-se 100 % do volume. Na célula de extração (**b**), ocupou-se aproximadamente 10 % do volume para a determinação das isotermas de rendimento global, e 100% do volume para a determinação da curva global de extração. Esferas de vidro em quantidade suficiente para preencher todo o volume restante do extrator foram adicionadas, fechando-se a célula em seguida. A célula de extração foi então invertida de maneira que a parte preenchida com as esferas de vidro fosse deixada para baixo para que apenas o CO₂ puro, que penetra na parte inferior da célula, percorresse as esferas,

evitando a agregação de extrato nelas, como mostra Figura A3. A lã de vidro serviu como um filtro para evitar a passagem de partículas que pudessem causar obstrução da linha. As esferas de vidro tiveram a finalidade de promover o total preenchimento da célula extratora, bem como manter a estabilidade do escoamento do CO₂ dentro da célula de extração.

1.1.2 PROCEDIMENTO OPERACIONAL

A Figura A4 mostra o fluxograma da unidade Spe-ed. O procedimento operacional da unidade foi padrão para as todas as extrações.



Figura A4 - Fluxograma da unidade experimental Spe-ed SFE (adaptado de VASCOCELLOS, 2007).

- Ligar o banho de resfriamento (BT) e esperar alcançar a temperatura entre 268 K e 263 K;
- Verificar se todas as válvulas (V1, V2, V3 e V4) estão fechadas e ligar o Spe-ed SFE e o compressor (CP);
- Conectar a linha de saída do CO2 no frasco de coleta (FC), previamente tarado, e depois conectar o frasco de coleta (FC) na linha de saída de CO2 + extrato;
- Conectar a célula de extração (CE), com a matéria-prima empacotada, no forno (F) e fixar o termopar em sua superfície;
- 5. Abrir as válvulas do cilindro de CO2 (V1) e de segurança (V2);

- 6. Ligar a bomba de pressurização do CO2 (BB);
- Abrir lentamente a válvula de entrada de CO2 (V3) para pressurização do sistema com a pressão existente no cilindro de CO2 (C-CO2);
- Verificar se não há vazamento, nem na célula de extração (CE) nem na linha do sistema;
- Configurar a temperatura do forno (F) para a temperatura de operação e a temperatura da válvula micrométrica (V5) para 353 K e ligar os botões de temperatura do forno (F) e da válvula micrométrica (V5);
- 10. Esperar o sistema alcançar a temperatura de operação configurada;
- 11. Regular vagarosamente a pressão na bomba (BB) até a pressão de operação e verificar novamente se não há vazamento;
- 12. Ajustar a pressão de operação (após alcance do equilíbrio das temperaturas de operação) na bomba (BB);
- 13. Esperar a estabilização do sistema (período estático: geralmente 10 min.);
- Inserir o frasco de coleta (FC) em banho de gelo (BG) e manter parcialmente imerso, a fim de evitar degradação do extrato durante a extração;
- 15. Abrir vagarosamente a válvula de saída de CO2 + extrato (V4) para iniciar a extração;
- Ajustar a vazão do CO2 através da válvula micrométrica (V5) e manter constante durante o período de extração, controlando pelo rotâmetro (RT) e pelo totalímetro (TT);
- Após o tempo pré-estabelecido de extração, fechar a válvula de saída de CO2 + extrato (V4) e fechar a válvula de entrada de CO2 (V3);
- Diminuir a pressão da bomba (BB) até pressão do cilindro de CO2 (C-CO2) e desligar os botões de temperatura do forno (F) e da válvula micrométrica (V5);
- Retirar o frasco de coleta (FC) de extrato e acoplar o frasco de coleta de extrato da despressurização do sistema e da limpeza da linha/tubulação de CO2 + extrato, previamente tarado;
- 20. Abrir vagarosamente a válvula de saída de CO2 + extrato (V4) para a total despressurização do sistema;
- 21. Desconectar a célula de extração (CE) das linhas e lavar, com auxílio de seringa, a linha de saída de CO2 + extrato com Acetona;
- 22. Após o procedimento de limpeza, retirar o frasco de coleta de despressurização e limpeza;

- 23. Acoplar outra célula de extração no forno (F) e abrir a válvula de entrada (V3) de CO2, para passar corrente de CO2 na linha para retirada total de resíduo de solvente;
- 24. Desconectar a célula, usada para limpeza da linha; desligar o Spe-ed (F), o banho ultratermostático (BT) e compressor (CP).

A vazão do solvente foi monitorada com o auxílio do totalímetro que mede o volume de CO₂ (m³) nas condições ambientes de temperatura e pressão. Estas condições foram registradas com termômetro de mercúrio (PolyScience, EUA) e manômetro (modelo 104, Veb Feingeratebau 9362 Drebach/ERZC GDR, Alemanha), e serviram como dados de entrada no programa de dados de referência padrão do NIST (2005) - *National Institute of Standards and Technology*, base de dados nº 69 publicada em junho de 2005 (http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid), que disponibiliza as propriedades termofísicas de sistemas fluidos, onde se obteve a densidade do CO₂ nas condições ambientes. Com a densidade e a vazão volumétrica calculou-se a vazão mássica do CO₂ (kg/s) utilizada em cada experimento de extração.

1.2 UNIDADE PILOTO THAR (5 L)

A unidade comercial de SFE em escala piloto (Thar Technologies, SFE-2 x 5LF-2-FMC, Pittsburgh, EUA) está equipada com dois extratores de 5,15 L, bomba de CO₂ com capacidade de bombeamento de 200 g/min. e bomba de cosolvente com capacidade de 50 g/min., banho de etileno glicol e água (Thermo Electron Corporation, modelo NESLAB RTE10, Newington, EUA), medidor de vazão (Siemens, modelo Sitrans F C Mass 6000, Munique, Alemanha), e três separadores de 1 L, tipo ciclone, dispostos em série (Figura A5). A vazão máxima de operação é de 3,3 × 10⁻³ kg/s.

1.2.1 CÁLCULO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS PARA O AUMENTO DE ESCALA

Para o aumento de escala, a razão S/F e o tempo de residência do solvente no leito (Equação A1) foram mantidos constantes. Com a densidade aparente constante, consequentemente, a porosidade também foi mantida constante para o mesmo lote de matéria-prima. Logo, a Equação A1 pode ser reescrita como a Equação A2.

Para o cálculo da matéria-prima necessária para o volume do extrator da unidade piloto, a densidade aparente constante do leito foi levada em consideração. A vazão da

unidade piloto foi calculada usando a Equação Equação A2. No entanto, a vazão obtida foi a máxima permitida pelo equipamento. Logo, decidiu-se adotar a vazão como sendo 75% da vazão máxima, obtendo uma vazão de aproximadamente 12 (doze) vezes a vazão adotada no equipamento de laboratório (Spe-ed). Com isso, foi possível calcular a massa de matéria-prima necessária para os experimentos em escala piloto, mantendo constante o critério para o aumento de escala: S/F e o t_{RES}.

$$t_{RES} = \frac{\pi d_B^2 H_B \epsilon \rho_{CO2}}{4Q_{CO2}}$$
Equação A1
$$\frac{Q_{CO2} 2}{Q_{CO2} 1} = \frac{F_2}{F_1}$$
Equação A2

onde t_{RES} é o tempo de residência do solvente no leito; d_B^2 é o diâmetro do leito; H_B é a altura do leito; ϵ é a porosidade do leito e das partículas, ρ é a densidade do solvente; Q_{CO2} é a vazão do solvente; e *F* é a massa de material-prima.

1.2.2 PREPARO DO LEITO DE EXTRAÇÃO DA UNIDADE PILOTO

O leito de extração possui 10,34 cm de diâmetro e 61,40 cm de altura, totalizando volume de leito de 5,15 L.

Quando não se pretende preencher todo o leito de extração com matéria-prima, ou por indisponibilidade, ou para usar quantidade pré-determinada de solvente, o volume restante deve ser preenchido com esferas de vidro. Como o CO₂ flui pela parte inferior da célula, que não pode ser invertida para o empacotamento devido ao tamanho, as esferas de vidro devem ser inseridas no extrator antes de ser inserida a matéria-prima. Para saber a quantidade de esferas de vidro necessária, estima-se o volume, a ser ocupado por elas, pela diferença entre o volume do leito e o volume ocupado pela matéria-prima no leito, se a massa de matéria-prima a ser usada na extração é conhecida.

Para isso, calcula-se o volume que a matéria-prima irá ocupar no leito de extração dividindo-se a massa da matéria-prima pela sua densidade aparente. Logo, é possível saber a altura que a massa de matéria-prima irá ocupar no leito de extração. A altura (ou volume), restante deverá ser ocupada pelas esferas de vidro, onde sua massa pode ser estimada conhecendo sua densidade aparente.

As esferas de vidro, em quantidade estimada para preencher o volume não ocupado pela matéria-prima, foram inseridas em célula de nylon, que deve ter as mesmas

166

dimensões do extrator e que deve estar dentro da célula de extração. Depositou-se uma camada de lã de vidro e, em seguida, a matéria-prima foi empacotada com auxílio de um bastão cilíndrico de aço inox, para evitar a formação de caminhos preferenciais; posteriormente, depositou-se outra camada de lã de vidro, fechou-se a célula de nylon, com barbante, e em seguida fechou-se a célula de extração.



Figura A5 - Unidade piloto (Thar Technologies, modelo SFE-2X5LF-2-FMC, Pittsburgh, EUA).

A célula de nylon facilita no desempacotamento do leito. A lã de vidro serve como um filtro para evitar a passagem de partículas que possam causar obstrução da linha/tubulação. As esferas de vidro promovem o total preenchimento da célula extratora e com isso mantém a estabilidade do fluxo de CO₂ dentro da célula de extração.

1.2.3 PROCEDIMENTO OPERACIONAL DA UNIDADE PILOTO

O procedimento operacional seguiu o protocolo apresentado por Prado (2010) e o Manual de Operação Unidade SFE-2x5L (Figura A6), com algumas modificações:

- 1. Empacotar a célula de extração (LE1 e/ou LE2), como descrito anteriormente;
- Conectar as tomadas da unidade na fonte elétrica e ligar a bomba de CO2, a de cosolvente (quando for utilizar), a válvula Automatic Back Pressure Regulator (ABPR) e os controladores de temperaturas;
- 3. Ligar o banho de resfriamento do CO2 a 271 K;
- Certificar que as válvulas V1a, V1b, V1c, V1d (ou V1e) e V1f (ou V1g) estejam abertas e as demais válvulas, fechadas;
- 5. Conectar o cabo USB de comunicação entre a interface da unidade e o computador;
- Iniciar o software *ProcessSuit* no computador e configurar as condições operacionais: vazão das bombas, temperatura no TC2, temperatura e pressão de extração, temperatura da ABPR (V3) e temperaturas dos separadores (S1, S2 e S3);
- Iniciar o funcionamento da válvula V3 (Start ABPR) antes de iniciar o processo de extração, para a válvula liberar o fluxo de CO2 + extrato apenas quando a pressão de operação for atingida, caso contrário o sistema não será pressurizado;
- 8. Iniciar o processo de pressurização do sistema pelo software (Start method);
- Parar o funcionamento da bomba (B1) de CO2 (*Stop pump*), quando a pressão de operação for atingida, para a estabilização das condições operacionais do sistema (período estático);
- Iniciar novamente o processo de extração para atingir a pressão de operação e liberar o fluxo para S1, através da abertura automática de V3;
- 11. Abrir a V4a para ajustar a pressão desejada em S1, que deve ter pressão menor do que a pressão no extrator;
- 12. Ajustar a pressão em S2 e S3, em V4b e V4c, respectivamente, onde a pressão em S2 deve ser menor do que em S1, e em S3, menor do que em S2;
- 13. Parar a extração em Stop pump, no caso de experimentos cinéticos;
- 14. Despressurizar manualmente os separadores, abrindo lentamente V4a, V4b e V4c;
- 15. Coletar os extratos, após total despressurização dos separadores, em V1h, V1i e V1j;
- Reiniciar o processo de extração até o próximo tempo de coleta dos extratos e repetir os passos descritos em 14 e 15;
- 17. Parar a extração em Stop method, no caso da finalização do processo de extração;
- 18. Religar os aquecimentos dos separadores e da ABPR no software, para não congelar e entupir as linhas entre eles por causa da vazão da despressurização;

- 19. Configurar a pressão de operação da ABPR para 1 bar no software, para que todo o CO2 escoe para fora do sistema através dos separadores;
- 20. Despressurizar o sistema repetindo os passos descritos em 14 e 15;
- 21. Clicar em Stop method para desligar os aquecimentos dos separadores e da ABPR;
- 22. Fechar o software e desligar o computador;
- 23. Desligar o banho, a bomba de CO2, a de co-solvente (quando for utilizar), a válvula Automatic Back Pressure Regulator (ABPR) e os controladores de temperaturas e desconectar as tomadas da unidade na fonte elétrica.



Figura A6 - Esquema de funcionamento da unidade piloto (Prado, 2010).

O procedimento de limpeza de toda a linha de extração foi executado utilizando esferas de vidro empacotadas em célula de *nylon* no extrator 2. O sistema foi operado em 100 bar e 40 °C, utilizando CO₂ com acetona (40%). O objetivo foi limpar a linha de saída de CO₂+extrato, principalmente dentro das válvulas dos separadores onde a limpeza manual não é possível.

2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS.

2.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS: CAPÍTULO 4

A seguir estão apresentados os resultados experimentais utilizando sementes de urucum da variedade Piave – Safra 2010 (UP1) e que resultaram na publicação do artigo que está apresentado no Capítulo 4.

Benlicata	Umidada	Cinzas	Lipío	dios	Protoínoo	Carbaidrataa
Περιιταία	Unidade	Ginzas	% b.u.	% b.s.	FIOLEINAS	Carboluratos
1	12.26	6.18	3.73	4,25	12.41	65.42
2	12.36	6.36	-		12.04	69.24
3	12.18	6.13	3.69	4,21	11.95	66.04
Média	12.27	6.22	3.71	4,23	12.13	66.90
Desvio	0.09	0.12	0.03	0,03	0.24	2.05
Amplitude	0.18	0.22	0.04	0,04	0.46	3.82

Tabela A1 – Composição centesimal das sementes moídas de UP1.

Tabela A2 - Caracteriza	ção das sementes	inteiras de UP1:	umidade, teo	r de bixina,	teor
de lipídio, diâmetro das	partículas, densidad	de real das semer	ntes.		

Bonlicata	Umidade ^a	Diâmetro ^b	Densidade real	Bixina	Soxhlet: semente inteira		
Replicata	[%]	[mm]	[kg/m ³]	[%b.s.]	% b.u.	% b.s.	
1	9,51	-	-	5.03	3,24	3,59	
2	10,32	-	-	4.84	3,15	3,49	
3	9,32	-	-	-	-	-	
Média	9,71	3,74	1111,4		3,20	3,54	
Desvio	0,53	0,2	16,2		0,06	0,07	
Amplitude	1,00	0,6			0,09	0,10	

^a Análise de umidade após 12 meses do recebimento da material prima. ^b Média de 20 medições.

A extração das sementes inteiras de UP1 por Soxhlet foi determinada usando (5,11 \pm 0,01) g de sementes inteiras de urucum e éter de petróleo (Synth, Diadema, SP, Brasil), com S/F = 22,50 \pm 0,04.

OECs	OEC1	OEC2	OEC3ª	OEC4	OEC5
QCO ₂ x 10 ⁻⁵ [kg/s]	17,14	17,40	8,49	5,64	5,64
Massa MP [g]	4,51	4,51	4,53	4,51	4,51
Tempo de extração [min.]		Massa	de extrato acur	nulado [g]	
10	0,0820	0,0743	0,0212	0,0586	0,0521
20	0,0938	0,0914	0,0213	0,0684	0,0629
30	0,1005	0,0982	0,0219	0,0742	0,0677
45	0,1066	0,1034	0,0224	0,0796	0,0717
60	0,1118	0,1076	0,0230	0,0857	0,0770
80	0,1180	0,1117	0,0235	0,0896	0,0804
101	0,1260	0,1147	0,0242	0,0922	0,0867
122	0,1305	0,1175	0,0248	0,0942	
150	0,1345	0,1226	0,0253		
180	0,1393	0,1263	0,0264		
210	0,1422	0,1286	0,0279		
240		0,1308			
Limpeza	0,1524	0,1413	0,0337	0,1020	0,0944

Tabela A3 – Dados de massa de extrato acumulado de UP1 obtido das curvas cinéticas de extração em 333 K/40 MPa, em célula de 6,57 mL.

As duplicatas 1 e 2, e 4 e 5 são as curvas cinéticas preliminares, identificadas como KC1 e KC2, respectivamente, e os dados operacionais estão em Table 1, Capítulo 4.ª A OEC3 foi desconsiderada porque houve vazamento de extrato pela linha de purga do equipamento.

					. (
K/MPa	313/	20	313/31		313/	313/40		333/20		333/31		40
Replicata	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]
1	0,3433	1,94	0,3877	2,16	0,3369	1,89	0,3676	2,07	0,3634	2,05	0,3621	0,36
2	0,3022	1,72	0,3363	1,88	0,3674	2,06	0,3668	2,07	0,3558	2,01	0,4284	0,43
Média	0,32	1,83	0,36	2,02	0,35	1,98	0,37	2,07	0,36	2,03	0,40	0,40
Desvio	0,03	0,16	0,04	0,20	0,02	0,12	0,00	0,0003	0,01	0,02	0,05	0,05
Amplitude	0,04	0,22	0,05	0,28	0,03	0,16	0,00	0,0004	0,01	0,03	0,07	0,07

Tabela A4 – Dados de massa e rendimento de extrato de UP1 obtidos nas determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG): dados operacionais em Table 1, Capítulo 4.

Tabela A5 - Dados de massa e rendimento de bixina no extrato obtidos nas determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG) de UP1: dados operacionais em Table 1, Capítulo 4.

K/MPa	313/	20	313/	31	313/40		333/20		333/31		333/40	
Replicata	[g]	[%]										
1	0,0030	0,87	0,0048	1,23	0,0042	1,24	0,0028	0,76	0,0055	1,53	0,0068	1,89
2	0,0028	0,94	0,0036	1,06	0,0061	1,66	0,0030	0,81	0,0063	1,76	0,0075	1,75
Média	0,0029	0,91	0,004	1,15	0,005	1,45	0,0029	0,78	0,006	1,64	0,007	1,82
Desvio	0,0001	0,05	0,001	0,12	0,001	0,30	0,0001	0,03	0,001	0,17	0,000	0,09
Amplitude	0,0002	0,07	0,001	0,17	0,002	0,42	0,0002	0,05	0,001	0,23	0,001	0,13

K/MPa		313/20		313/31		313/40		333/20		333/31		333/40	
Isômeros	Replicata	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]
β-T1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00067	0,18	0,0007	0,19
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00078	0,22	0,0008	0,18
Média		0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0,20	0,001	0,19
Desvio		0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,03	0,000	0,01
Amplitude		0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,04	0,000	0,01
Σ T1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0014	0,38	0,0014	0,39
0-11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0012	0,34	0,0014	0,33
Média		0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0,36	0,001	0,36
Desvio		0	0	0	0	0	0	0	0	0,0001	0,03	0,0000	0,04
Amplitude		0	0	0	0	0	0	0	0	0,0002	0,04	0,0000	0,06

Tabela A6 - Dados de massa e rendimento de Tocoferóis (T1), no extrato, obtidos nas determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG) de UP1: dados operacionais em Table 1, Capítulo 4.

em Table 1, Capítulo 4.													
K/MPa	_	313/	20	313/	/31	313/	313/40		333/20		333/31		/40
Isômero		[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]
A/ T2	1	0,0068	1,99	0,0060	1,54	0,0054	1,59	0,0061	1,66	0,0061	1,70	0,0066	0,19
γ-13	2	0,0059	1,95	0,0054	1,60	0,0061	1,67	0,0054	1,48	0,0071	1,66	0,0063	0,18
Média		0,0063	1,97	0,0057	1,57	0,0057	1,63	0,0058	1,57	0,0066	1,68	0,0064	0,00
Desvio		0,0007	0,03	0,0004	0,04	0,0005	0,05	0,0005	0,13	0,0007	0,03	0,0002	0,00
Amplitude		0,0009	0,04	0,0006	0,05	0,0008	0,07	0,0007	0,19	0,0009	0,04	0,0004	0,01
5 T2	1	0,0496	14,44	0,0450	11,62	0,0402	11,94	0,0460	12,51	0,0472	13,00	0,0445	12,29
0-13	2	0,0448	14,82	0,0396	11,78	0,0462	12,57	0,0408	11,12	0,0457	12,86	0,0518	12,09
Média		0,047	14,63	0,042	11,70	0,043	12,26	0,043	11,82	0,046	12,93	0,048	12,19

Desvio

Amplitude

 $0,003 \quad 0,27 \quad 0,004 \quad 0,12 \quad 0,004 \quad 0,44 \quad 0,004 \quad 0,98 \quad 0,001 \quad 0,10 \quad 0,005 \quad 0,14$

 $0,005 \quad 0,39 \quad 0,005 \quad 0,17 \quad 0,006 \quad 0,62 \quad 0,005 \quad 1,39 \quad 0,002 \quad 0,14 \quad 0,007 \quad 0,20$

Tabela A7 - Dados de massa e rendimento de Tocotrienóis (T3), no extrato, obtidos nas determinações das Isotermas de Rendimento Global (IRG) de UP1: dados operacionais

Tabela A8 - Dados de massa e rendimento de Tocoferóis (T1) e Tocotrienóis (T3) nos
extratos obtidos na extração de sementes inteiras com Soxhlet (S/F = 22.5 ± 0,04; massa
de matéria-prima = $(5,11 \pm 0,01)$ g) e na amostra comercial*.

Amostras	Isômero	γ-T1		δ-T1		α-Τ3	}	γ-Τ3	3	δ-Τ3	3
Anostas	Replicata	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]	[g]	[%]
Comoroial	1	0,00013	0,08	0,0005	0,32	0	0	0,00091	0,555	0,0046	2,83
Comerciai	2	0,00014	0,08	0,0005	0,30	0	0	0,00090	0,551	0,0046	2,80
Média		0,00013	0,08	0,00050	0,31	0	0	0,00090	0,553	0,00460	2,82
Desvio		0,00001	0,01	0,00002	0,01	0	0	0,00000	0,003	0,00004	0,02
Amplitude		0,00001	0,01	0,00002	0,01	0	0	0,00001	0,004	0,00005	0,03
Souplat	1	0	0	0	0	0,00354	2,16	0	0	0,02142	13,10
Soxillet	2	0	0	0	0	0,00347	2,12	0	0	0,02140	13,09
Média		0	0	0	0	0,00350	2,14	0	0	0,02141	13,10
Desvio		0	0	0	0	0,00005	0,03	0	0	0,00001	0,01
Amplitude		0	0	0	0	0,00007	0,04	0	0	0,00002	0,01

* Amostra comercial, pasta com (14 ± 3) % de bixina cedida por Alejandro Espínola, Gerente de Negócios da Kraki and Kratshmer Ltda.

Tabela	a A9 -	- Dados	de mas	sa de	extrato	acumulad	o obtido	das	curvas	globais	de	extração
(OEC)	de L	JP1 em	333 K/40) MPa	, em cé	lula de 29	0 mL.			-		

OECs	OEC6	OEC7	Média	Amplitude
Vazão CO ₂ x 10 ⁻⁵ [kg/s]	18,83	18,80	18,82	0,03
Velocidade superficial [m/s]	0,08	0,08	0,0815	0,0001
Matéria-prima [g]	190,00	190,65	190,33	0,65
Densidade aparente [kg/m3]	655,17	657,41	656	2
Porosidade	0,41	0,41	0,41	0,01
Tempo de residência [min.]	9,36	9,33	9,35	0,03
Tempo de extração [min.]	Massa de extrat	o acumulado [g]	Média	Amplitude
5	1,2361	1,3929	1,3145	0,16
10	2,2015	1,9587	2,0801	0,24
15	2,2426	2,3695	2,3061	0,13
20	2,5782	2,7178	2,6480	0,14
30	3,1964	3,3307	3,2636	0,13
40	3,5912	3,6862	3,6387	0,10
50	3,8919	4,0015	3,9467	0,11
60	4,1192	4,2258	4,1725	0,11
70	4,2831	4,4573	4,3702	0,17
80	4,4548	4,6341	4,5445	0,18
90	4,5845	4,7631	4,6738	0,18
105	4,7446	4,906	4,8253	0,16
120	4,8851	5,0326	4,9589	0,15
135	4,9979	5,1708	5,0844	0,17
150	5,0994	5,2761	5,1878	0,18
165	5,1894	5,3714	5,2804	0,18
180	5,2720	5,4396	5,3558	0,17
195	5,3297	5,5117	5,4207	0,18
220	5,4376	5,6129	5,5253	0,18
240	5,5345	5,6896	5,6121	0,16
260	5,6150	5,7454	5,6802	0,13
280	5,7001	5,7980	5,7491	0,10
300	5,7593	5,8459	5,8026	0,09
330	5,8512	5,8904*	5,8708	0,04
360	5,9424	5,9974	5,9699	0,05
390	6,0035	6,0452	6,0243	0,04
420	6,0793	6,1257	6,1025	0,05
450	6,1537		6,1537	
480	6,2070		6,2070	
510	6,2570		6,2570	
540	6,3102		6,3102	
Limpeza	6,3504	6,2044	6,2774	

* O extrato foi coletado em 320 min. ao invés de 330. As duplicatas 6 e 7, são as curvas globais de extração identificadas como OEC: dados operacionais em Table 1, Capítulo 4.

giobais de c	//liaçao (Ol	_0, uc 0		0010401	vii a, ciii	cciula ut	5 2 00 m	L.	
OECs	OEC6			OEC7				Média	Amp.
QCO ₂ x10 ⁻⁵ [k	g/s] 18,83			18,80				18,82	0,03
Massa MP [g	g] 190,0			190,65				190,33	0,65
Tempo de extração [min.]	CO ₂ [kg]	Bixir 1	na [g] 2	CO ₂ [kg]	Bixina [g]	Média CO ₂ [kg]	Amp. CO ₂	Média Bixina [g]	Amp. Bixina
5	0,0839	0,0053	0,0052	0,0610	0,0066	0,0724	0,02	0,006	0,001
10	0,1347	0,0108	0,0094	0,1236	0,0101	0,1292	0,01	0,010	0,000
15	0,1923	0,0111	0,0096	0,1795	0,0132	0,1859	0,01	0,011	0,003
20	0,2465	0,0136	0,0129	0,2371	0,0166	0,2418	0,01	0,014	0,003
30	0,3651	0,0198	0,0193	0,3676	0,0236	0,3663	0,00	0,021	0,004
40	0,4836	0,0245	0,0242	0,4675	0,0285	0,4756	0,02	0,026	0,004
50	0,6022	0,0294	0,0290	0,5827	0,0319	0,5924	0,02	0,030	0,003
60	0,7140	0,0336	0,0328	0,6928	0,0359	0,7034	0,02	0,034	0,003
70	0,8292	0,0373	0,0357	0,8062	0,0403	0,8177	0,02	0,038	0,004
80	0,9460	0,0413	0,0391	0,9248	0,0444	0,9354	0,02	0,042	0,004
90	1,0595	0,0448	0,0422	1,0400	0,0477	1,0498	0,02	0,045	0,004
105	1,2323	0,0495	0,0470	1,2111	0,0520	1,2217	0,02	0,050	0,004
120	1,4051	0,0523	0,0513	1,3804	0,0565	1,3928	0,02	0,053	0,005
135	1,5829	0,0558	0,0549	1,5515	0,0603	1,5672	0,03	0,057	0,005
150	1,7608	0,0595	0,0586	1,7192	0,0638	1,7400	0,04	0,061	0,005
165	1,9369	0,0635	0,0626	1,8903	0,0687	1,9136	0,05	0,065	0,006
180	2,1114	0,0689	0,0670	2,0614	0,0722	2,0864	0,05	0,069	0,004
195	2,2841	0,0715	0,0702	2,2290	0,0751	2,2566	0,06	0,072	0,004
220	2,5772	0,0770	0,0759	2,5119	0,0804	2,5445	0,07	0,078	0,004
240	2,7991	0,0827	0,0813	2,7423	0,0849	2,7707	0,06	0,083	0,003
260	3,0260	0,0867	0,0867	2,9658	0,0881	2,9959	0,06	0,087	0,001
280	3,2513	0,0916	0,0910	3,1962	0,0926	3,2238	0,06	0,092	0,001
300	3,4715	0,0961	0,0910	3,4181	0,0956	3,4448	0,05	0,094	0,002
330	3,8018	0,1024	0,0973	3,6400	0,0989	3,7209	0,16	0,100	0,001
360	4,1338	0,1090	0,1037	4,0838	0,1060	4,1088	0,05	0,106	0,0004
390	4,4471	0,1125	0,1081	4,4073	0,1097	4,4272	0,04	0,110	0,001
420	4,7859	0,1179	0,1141	4,7376	0,1163	4,7617	0,05	0,116	0,0004
Limpeza					0 1179				

Tabela A10 - Dados de massa de bixina no extrato e CO₂, acumulados, obtido das curvas globais de extração (OEC) de UP1 em 333 K/40 MPa, em célula de 290 mL.

As duplicatas 6 e 7 são identificadas como OEC e os dados operacionais estão em Table 1, Capítulo 4.

Tabela A11 – Dados de extração por Soxhlet de sementes inteiras de UP1 (umidade: 9,71%), após SFE em 333 K/40 MPa (OEC 6 e 7): Éter de petróleo (Synth, Diadema, SP, Brasil), com S/F = $35,92 \pm 0,01$.

Poplicata	Soxhlet: semente inteira							
Matéria-prima [g b.u.] Matéria		Matéria-prima [g b.s.]	% b.u.	% b.s.				
1	5,0102	4,5232	0,85	0,94				
2	5,0110	4,5239	0,78	0,87				
Média	5,0106	4,5236	0,82	0,90				
Desvio	0,0006	0,0005	0,04	0,05				
Amplitude	0,0008	0,0007	0,06	0,07				

Tabela A12 – Dados usados no software SuperPro Designer[®] para simular o processo SFE de UP1 em 333 K/40 MPa e estimar o COM do extrato.

Unidades industriais (taxa de depreciação 109	%/ano) ^a	
2 extratores de 5 L	US\$ 100.000,00	
2 extratores de 100 L	US\$ 450.000,00	
2 extratores de 500 L	US\$ 1.150.000,00	
Mão de obra ^a	US\$ 6,00/h ^b	
2 extratores de 5 L	1 operador	
2 extratores de 100 L	2 operadores	
2 extratores de 500 L	3 operadores	
Matérias-primas		
Urucum ^c	US\$ 2,00/kg	
Densidade aparente	656 kg/m ³	
Preprocessamento	US\$ 0,00/kg	
CO ₂ (perda de 2 %) ^d	US\$ 0,15/kg	
Utilidades ^a		
Energia elétrica	US\$ 0,092/kWh	
Água para resfriamento	US\$ 0,19/ton.	
Vapor de água	US\$ 4,20/ton.	

^a Prado, 2009.^b Santos et al. 2010, ^cInformado por Christian-Hansen Ind. e Com. Ltda, 2009. ^dPrado, 2010.

t [min.]	Extrato [%]	Extrato [kg]	S/F	CO2 [kg]	Perda CO ₂ [2%]	COM [US\$/kg _{extrato}]
5	0,8	0,025	0,3	2,015	0,040	338,50
10	1,2	0,040	0,6	3,971	0,079	254,47
15	1,3	0,044	0,9	5,927	0,119	270,33
20	1,5	0,051	1,2	7,854	0,157	266,87
25	1,7	0,056	1,5	10,007	0,200	273,73
31	1,9	0,062	1,9	12,146	0,243	274,96
40	2,1	0,069	2,4	15,913	0,318	296,78
50	2,3	0,075	3,0	19,943	0,399	318,82
60	2,4	0,080	3,6	23,768	0,475	341,78
70	2,5	0,083	4,2	27,710	0,554	370,79
90	2,7	0,089	5,4	35,711	0,714	422,94
105	2,8	0,092	6,3	41,639	0,833	465,15

Tabela A13 – Dados de entrada para a simulação do processo SFE de UP1 em cada ponto da OEC até 105 min., em 333 K/40 MPa, e o COM do extrato para unidade com capacidade de 5 L.

MPa para unida	MPa para unidade com capacidade de 5 L.							
5 L	C _{RM}	C _{OL}	F _{CI}	C _{UT}	kg _{extrato} /ano			
5	79,57	15,63	4,36	0,44	2.376,00			
10	66,19	25,99	7,26	0,57	1.900,80			
15	56,66	33,35	9,31	0,67	1.393,92			
20	49,54	38,87	10,85	0,74	1.211,76			
25	44,01	43,14	12,04	0,81	1.064,45			
30	39,59	46,55	13,00	0,86	982,08			
40	32,99	51,67	14,43	0,92	819,72			
50	28,28	55,30	15,44	0,97	712,80			
60	24,80	58,00	16,20	1,00	633,60			
70	22,00	60,20	16,80	1,00	563,40			
90	18,00	63,20	17,70	1,10	469,92			
105	15,90	64,90	18,10	1,10	416,21			

Tabela A14 – Composição do COM (%) e taxa de produção anual do extrato obtidos pelo simulador SuperPro Designer[®] em cada ponto da OEC de UP1, até 105 min. em 333 K/40 MPa para unidade com capacidade de 5 L.

Tabela A15 – COM de extrato de UP1 (US\$/kg), composição do custo (%), taxa de
produção anual de extrato e bixina (kg/ano), e demanda anual de matéria-prima, obtidos
pelo simulador SuperPro Designer [®] quando simulado o aumento de escala de extratores
com 5, 100 e 500 L, com tempo de processo = 40 min. e nas condições operacionais de
333 K/40 MPa.

Unidades [L]	CRM	COL	FCI	CUT	US\$ /kg _{extrato}	Kg _{extrato} /ano	kg _{sementes} /ano	Kg _{bixina} /ano
5	33,0	51,7	14,4	0,9	292,5	831,60	38.966	5,82
100	78,0	12,2	7,7	2,2	124,58	16.525,08	779.328	115,68
500	88,9	4,2	4,5	2,5	109,27	82.613,52	3.896,640	578,29

Tabela A 16 – Parâmetros cinéticos do p	processo de SFE de UP1: OEC em 333 K/40 MPa.

Parâmetros	Descrição	Valores
t _{CER} [min.]	Duração do período de taxa constante de extração (CER).	25
t _{CER2} [min.]	Intersecção dos períodos CER e DC.	40
t _{FER} [min.] ^a	Duração do período de taxa decrescente de extração (FER).	108
M _{CER} [x 10 ⁻⁶ kg/s]	Taxa de transferência de massa no período CER.	1,98
Vazão _{CER} [x 10 ⁻⁵ kg/s]	Vazão média do solvente no período CER.	19,5
S/F _{CER} [kg _{CO2} /kg _{Matéria-prima}]	Razão solvente:matéria-prima no período CER.	1,5
Y _{CER} [kg _{extrato} /kg _{CO2}]	Razão extrato:solvente na saída do extrator, período CER.	0,011
R _{CER} [%, b.s.]	Rendimento em extrato no período CER.	1,5
R _{Total} [% b.s.]	Rendimento em extrato no tempo total de extração, 420 min.	$3,58 \pm 0,04$

^a Foi considerado para o cálculo do COM, 105 min.;

2.2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS: CAPÍTULO 6

A seguir são apresentados os resultados experimentais utilizando sementes de urucum da variedade Piave safra 2011 (UP2), e que resultaram na publicação do artigo que está apresentado no Capítulo 6. A extração com Soxhlet foi determinada usando (5,2 \pm 0,4) g de sementes inteiras de urucum e éter de petróleo (Synth, Diadema, SP, Brasil), com S/F = 35 \pm 2, com duração de 360 minutos.

Roplicata	Umidade	Diâmetro	Densidade real	Bixina	Soxhlet: semente inteira		
nepiicaia ((%)	(mm)	(kg/m ³) ⁶	(% b.s.)	% b.u.	% b.s.	
1	8,81	3,64 ^a	-	5,00	2,95	3,24	
2	8,84	3,67 ^a	-	5,12	2,78	3,05	
3	8,96	-	-	-	-	-	
Média	8,9	3,65	1330	5,1	2,87	3,14	
Desvio	0,1	0,02	10	0,1	0,13	0,14	
Amplitude	0,2	0,03	-	0,1	0,18	0,20	

Tabela A17 - Caracterização das sementes de UP2: umidade, teor de bixina, teor de lipídio, diâmetro das partículas, densidade real das sementes.

^a Médias de 20 medições cada. ^b Resultados obtidos de 10 medições.

Tabela A18 - Dados de rendimento (%) de Tocoferóis (T1) e Tocotrienóis (T3) no extrato e na matéria-prima (MP), em base seca, obtidos na extração de sementes inteiras de UP2 com Soxhlet (S/F = 35 ± 2 ; massa de matéria-prima = $(5, 2 \pm 0, 4)$ g).

Tocóis:	α-Τ	1	α-Τ3		γ-Τ:	3	δ-Τ3		
Replicata	Extrato	MP	Extrato	MP	Extrato	MP	Extrato	MP	
1	0,012	0,0004	0,010	0,0003	2,21	0,07	12,9	0,40	
2	0,013	0,0004	0,015	0,0005	2,15	0,07	13,1	0,41	
Média	0,0126	0,00040	0,013	0,0004	2,18	0,069	13,0	0,408	
Desvio	0,0003	0,00001	0,004	0,0001	0,05	0,001	0,2	0,005	
Amplitude	0,0005	0,00002	0,005	0,0002	0,07	0,002	0,2	0,007	

Tocóis											
Replicata	α-Τ1	α-Τ3	β-Τ3	γ-Τ3	δ-Τ3						
1	6,60	11,00	1,15	7,49	3,22						
2	6,85	11,72	1,12	8,08	3,37						
Média	6,72	11,36	1,13	7,79	3,29						
Desvio	0,18	0,51	0,02	0,42	0,11						
Amplitude	0,25	0,72	0,03	0,60	0,15						

Tabela A19	- Dados d	le rendimento	de	Tocoferóis	(T1)	е	Tocotrienóis	(T3)	em	amostra
comercial To	comin 30%	6*.								

* Amostra cedida por Carotech Berhad, Malaysia. Especificação em Anexos.

Tabela A20 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, das curvas globais de extração (OECs 8 e 9) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinadas na unidade Spe-ed em célula de 290 mL: dados calculados com base na matéria-prima seca, $(8,9 \pm 0,2)$ % de umidade.

OECs			OEC8		OEC 9		Média	Amplitude	
Vazão CO2 [×10⁻⁵ kg/s]			19,42 19,36			19,4	0,1		
Velocidade superficial [m/s]			0,08 0,08			0,0840	0,0003		
Matéria-prima [l	kg]		0,173		0,169		0,171	0,004	
Densidade apa	rente [kg/	m ³]	655,17		639,97		648	15	
Porosidade leite	o e partíc	ulas	0,51		0,52		0,51	0,01	
Tempo residên	cia CO ₂ [r	nin.]	10,59		10,86		10,7	0,3	
Tempo [min.]	Extrato	S/F	Extrato	S/F	Média S/F	Amplitude	Média Extrato	Amplitude	
5	0,53	0,34	0,46	0,34	0,34	0,00	0,49	0,07	
10	0,95	0,68	0,81	0,69	0,68	0,01	0,88	0,14	
15	1,30	1,03	1,09	1,04	1,03	0,01	1,20	0,21	
20	1,55	1,37	1,28	1,39	1,38	0,02	1,42	0,27	
30	1,85	2,05	1,61	2,08	2,07	0,03	1,73	0,24	
40	2,06	2,75	1,85	2,79	2,77	0,04	1,95	0,21	
50	2,21	3,43	2,03	3,47	3,45	0,04	2,12	0,18	
70	2,44	4,79	2,31	4,85	4,82	0,06	2,38	0,13	
90	2,60	6,12	2,50	6,24	6,18	0,12	2,55	0,11	
120	2,80	8,23	2,69	8,33	8,28	0,10	2,74	0,10	
160	2,96	10,95	2,90	11,25	11,10	0,30	2,93	0,06	
210	3,08	14,23	3,05	14,63	14,43	0,40	3,07	0,03	
250	3,16	16,83	3,13	17,63	17,23	0,80	3,15	0,03	
300	3,25	20,23	3,21	20,91	20,57	0,68	3,23	0,04	
335	3,32	22,55	3,26	23,01	22,78	0,46	3,29	0,06	
Limpeza	3,32		3,30				3,31	0,02	

Tempo	OEC8		OEC9		Mádia	Dosvio	Amplitudo	
[min.]	1	2	1	2	Media	Desvio		
5	0,122	0,117	0,113	0,110	0,12	0,01	0,01	
10	0,259	0,252	0,238	0,231	0,24	0,01	0,03	
15	0,402	0,389	0,342	0,339	0,37	0,03	0,06	
20	0,534	0,520	0,430	0,428	0,48	0,06	0,11	
30	0,747	0,738	0,601	0,596	0,67	0,08	0,15	
40	0,928	0,925	0,746	0,738	0,83	0,11	0,19	
50	1,074	1,080	0,876	0,867	0,97	0,12	0,21	
70	1,296	1,295	1,113	1,098	1,20	0,11	0,20	
90	1,459	1,453	1,290	1,278	1,37	0,10	0,18	
120	1,654	1,652	1,512	1,495	1,58	0,09	0,16	
160	1,806	1,809	1,719	1,711	1,76	0,05	0,10	
210	1,930	1,934	1,867	1,854	1,90	0,04	0,08	
250	1,998	2,001	1,945	1,931	1,97	0,04	0,07	
300	2,061	2,064	2,011	1,999	2,03	0,03	0,07	
335	2,105	2,108	2,057	2,046	2,08	0,03	0,06	
Limpeza	2,124		2,077		2,10	0,03	0,05	

Tabela A21 - Rendimento (%) acumulado de γ -T3 no extrato, obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).
Tempo	OEC8		OEC9		Mádia	Docvio	Amplitudo
[min.]	1	2	1	2	Media	Desvio	Amplitude
5	0,770	0,737	0,820	0,793	0,78	0,04	0,08
10	1,094	1,083	1,167	1,143	1,12	0,04	0,08
15	1,372	1,312	1,209	1,239	1,28	0,07	0,16
20	1,787	1,770	1,506	1,543	1,65	0,15	0,28
30	2,372	2,429	1,739	1,703	2,06	0,39	0,73
40	2,932	3,032	1,997	1,960	2,48	0,58	1,07
50	3,161	3,357	2,301	2,282	2,78	0,56	1,08
70	3,244	3,142	2,817	2,748	2,99	0,24	0,50
90	3,409	3,301	3,187	3,227	3,28	0,10	0,22
120	3,432	3,505	3,676	3,600	3,55	0,11	0,24
160	3,116	3,201	3,342	3,477	3,28	0,16	0,36
210	3,342	3,382	3,248	3,154	3,28	0,10	0,23
250	2,865	2,848	3,097	3,063	2,97	0,13	0,25
300	2,420	2,390	2,870	2,947	2,66	0,29	0,56
335	2,151	2,154	3,010	3,088	2,60	0,52	0,94
Limpeza	1,683		1,646		1,66	0,03	0,04

Tabela A22 – Rendimento (%) de γ -T3 no extrato durante as curvas globais de extração (OECs 8 e 9).

Tempo	OEC8	OEC8			Mádia	Donvio	Amplitudo
[min.]	1	2	1	2	Media	Desvio	Amplitude
5	0,0041	0,0039	0,0037	0,0036	0,004	0,0002	0,000
10	0,0087	0,0085	0,0078	0,0076	0,008	0,0005	0,001
15	0,0135	0,0131	0,0113	0,0112	0,012	0,001	0,002
20	0,0179	0,0175	0,0142	0,0141	0,016	0,002	0,004
30	0,0251	0,0248	0,0198	0,0197	0,022	0,003	0,005
40	0,0312	0,0311	0,0246	0,0243	0,028	0,004	0,007
50	0,0361	0,0363	0,0289	0,0286	0,032	0,004	0,008
70	0,0435	0,0435	0,0367	0,0362	0,040	0,004	0,007
90	0,0490	0,0488	0,0425	0,0421	0,046	0,004	0,007
120	0,0555	0,0555	0,0499	0,0493	0,053	0,003	0,006
160	0,0607	0,0607	0,0567	0,0564	0,059	0,002	0,004
210	0,0648	0,0649	0,0616	0,0612	0,063	0,002	0,004
250	0,0671	0,0672	0,0641	0,0637	0,066	0,002	0,004
300	0,0692	0,0693	0,0663	0,0659	0,068	0,002	0,003
335	0,0707	0,0708	0,0678	0,0675	0,069	0,002	0,003

Tabela A23 - Rendimento (%) acumulado de γ -T3 em relação à matéria-prima, em base seca, obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).

Tempo	OEC8		OEC9		Módia	Docyria	Amplitudo
[min.]	1	2	1	2	Meula	Desvio	Amplitude
5	0,745	0,720	0,780	0,773	0,75	0,03	0,06
10	1,611	1,576	1,620	1,629	1,61	0,02	0,05
15	2,518	2,465	2,356	2,383	2,43	0,07	0,16
20	3,370	3,321	2,920	2,952	3,14	0,24	0,45
30	4,786	4,761	4,071	4,106	4,43	0,40	0,71
40	5,987	6,012	5,073	5,089	5,54	0,53	0,94
50	6,948	6,995	5,966	5,959	6,47	0,58	1,04
70	8,439	8,405	7,587	7,521	7,99	0,50	0,92
90	9,546	9,491	8,784	8,725	9,14	0,44	0,82
120	10,882	10,839	10,310	10,206	10,56	0,35	0,68
160	11,969	11,954	11,762	11,708	11,85	0,13	0,26
210	12,867	12,855	12,794	12,728	12,81	0,06	0,14
250	13,358	13,353	13,337	13,269	13,33	0,04	0,09
300	13,833	13,834	13,798	13,745	13,80	0,04	0,09
335	14,193	14,198	14,124	14,070	14,15	0,06	0,13
Limpeza	14,354		14,268		14,31	0,06	0,09

Tabela A24 - Rendimento (%) acumulado de δ -T3 no extrato obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).

Tempo	OEC8		OEC9		Módia	Docyria	Amplitudo
[min.]	1	2	1	2	Meula	Desvio	Ampillude
5	4,71	4,554	5,640	5,585	5,12	0,57	1,09
10	6,91	6,830	7,894	8,048	7,42	0,64	1,22
15	8,69	8,523	8,506	8,709	8,61	0,11	0,20
20	11,51	11,558	9,721	9,814	10,65	1,02	1,84
30	15,77	16,034	11,664	11,691	13,79	2,44	4,37
40	19,48	20,280	13,798	13,546	16,78	3,60	6,73
50	20,88	21,366	15,877	15,476	18,40	3,15	5,89
70	21,73	20,550	19,228	18,528	20,01	1,42	3,20
90	23,15	22,708	21,537	21,663	22,26	0,79	1,61
120	23,57	23,773	25,248	24,508	24,27	0,77	1,68
160	22,20	22,767	23,465	24,255	23,17	0,89	2,05
210	24,24	24,357	22,610	22,358	23,39	1,05	2,00
250	20,83	21,117	21,810	21,723	21,37	0,47	0,98
300	18,15	18,373	20,003	20,642	19,29	1,22	2,49
335	17,71	17,868	21,067	21,009	19,41	1,88	3,36
Limpeza	14,00		12,121		13,06	1,33	1,88

Tabela A25 - Rendimento (%) de δ -T3 no extrato durante as curvas globais de extração (OECs 8 e 9).

Tempo	OEC8		OEC9		Mádia	Dogwio	Amplitudo
[min.]	1	2	1	2	weula	Desvio	Amplitude
5	0,025	0,024	0,026	0,025	0,025	0,001	0,002
10	0,054	0,053	0,053	0,054	0,054	0,000	0,001
15	0,085	0,083	0,078	0,079	0,081	0,003	0,007
20	0,113	0,112	0,096	0,097	0,10	0,01	0,02
30	0,161	0,160	0,134	0,135	0,15	0,01	0,03
40	0,201	0,202	0,167	0,168	0,18	0,02	0,03
50	0,233	0,235	0,197	0,197	0,22	0,02	0,04
70	0,283	0,282	0,250	0,248	0,27	0,02	0,04
90	0,321	0,319	0,290	0,288	0,30	0,02	0,03
120	0,365	0,364	0,340	0,337	0,35	0,02	0,03
160	0,402	0,401	0,388	0,386	0,39	0,01	0,02
210	0,432	0,432	0,422	0,420	0,43	0,01	0,01
250	0,449	0,448	0,440	0,438	0,44	0,01	0,01
300	0,464	0,465	0,455	0,453	0,46	0,01	0,01
335	0,477	0,477	0,466	0,464	0,47	0,01	0,01
Limpeza	0,482		0,471		0,48	0,01	0,01

Tabela A26 - Rendimento (%) acumulado de δ-T3 em relação à matéria-prima, em base seca, obtidos das curvas globais de extração (OECs 8 e 9).

					m _{CER}			M _{CER}			Y _{CER}			R _{CER}	
Tempo)	[mi	n.]	[%]		[×10 ⁻⁶ kg/s]		[kį	[kg _{ext} /kg _{CO2}]		[%]				
tcer-erro	20			1,61			2,14			0,0117			1,61		
tcer	22	22	2	1,64	1,6	0,1	2,29	2,1	0,3	0,0109	0,011	0,001	1,64	1,6	0,1
tcer+erro	24			1,67			2,01			0,0103			1,67		
tfer-erro	76			2,62									2,62		
tfer	85	85	9	2,64	2,64	0,05							2,64	2,64	0,05
tfer+erro	94			2,67									2,67		
tcer2-erro	31			1,78									1,78		
tcer2	33	33	2	1,81	1,8	0,1							1,81	1,8	0,1
tcer2+erro	35			1,85									1,85		

Tabela	A27	-	Dados	dos	parâmetros	cinéticos	para	t _{CER} ,	t_{FER}	е	t _{CER2} :	valores,	média	е
amplitu	ıde.													

Tabela	A28	-	Parâmetros	cinéticos	obtidos	do	ajuste	dos	dados	experimentais	do
process	o de	SF	E de UP2 ao	spline de	três linha	as re	etas: OE	C 8 e	e 9 em 3	313 K/20 MPa.	

Parâmetros	Descrição	Valores
t _{CER} [min.]	Duração do período de taxa constante de extração (CER).	22 ± 2
t _{CER2} [min.]	Intersecção dos períodos CER e DC.	33 ± 2
t _{FER} [min.]	Duração do período de taxa decrescente de extração (FER).	85 ± 9
M _{CER} [x 10 ⁻⁶ kg/s]	Taxa de transferência de massa no período CER.	2,1 ± 0,3
Vazão _{CER} [x 10 ⁻⁵ kg/s]	Vazão média do solvente no período CER.	19,5 ± 0,3
S/F _{CER} [kg _{CO2} /kg _{Matéria-prima}]	Razão solvente:matéria-prima no período CER.	1,60 ± 0,01
$Y_{CER} [kg_{extrato}/kg_{CO2}]$	Razão extrato:solvente na saída do extrator, período CER.	0,011±0,001
R _{CER} [%, b.s.]	Rendimento em extrato no período CER.	1,6 ± 0,1
R _{Total} [% b.s.]	Rendimento em extrato no tempo total de extração, 335 min.	$3,29 \pm 0,06$

Tabela A29 - Dados usados no software SuperPro Designer[®] para simular o processo SFE de UP2 em 313 K/20 MPa e estimar o COM do extrato.

Unidades industriais (taxa de depreciação 10%/an	10) ^a	
2 extratores de 5 L	US\$ 100.000,00	
2 extratores de 50 L	US\$ 300.000,00	
2 extratores de 300 L	US\$ 850.000,00	
2 extratores de 500 L	US\$ 1.150.000,00	
Mão de obra ^a	US\$ 6,00/h ^b	
2 extratores de 5 L	1 operador	
2 extratores de 50 L	2 operadores	
2 extratores de 300 L	3 operadores	
2 extratores de 500 L	3 operadores	
Matérias-primas		
Urucum ^c	0.00-2.20 US\$ /kg	
Densidade aparente	677 kg/m ³	
Preprocessamento	US\$ 0.00/kg	
CO ₂ (perda de 2 %) ^d	US\$ 0.15/kg	
Utilidades ^a		
Energia elétrica	US\$ 0.092/kWh	
Água para resfriamento	US\$ 0.19/ton.	
Vapor de água	US\$ 4.20/ton.	

^a Prado, 2009. ^b Santos et al. 2010, ^cInformado por Christian-Hansen Ind. e Com. Ltda, 2012. ^d Prado et al. 2012.

Tabela A30 – Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, obtidos das curvas globais de extração (OECs 10 e 11) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinadas na unidade Spe-ed em célula de 290 mL: dados calculados com base na matéria-prima seca, $(8,9 \pm 0,2)$ %.

aOECs			OEC 10		OEC 11		Média	Amplitude
Vazão CO2 [×1	0 ⁻⁵ kg/s]		16,53		16,62		16,58	0,09
Velocidade sup	perficial [n	n/s]	0,07		0,07		0,0718	0,0004
Matéria-prima [[kg]		0,17319		0,17324		0,17322	0,00005
Densidade apa	irente [kg/	/m³]	655,34		655,52	655,52		0,2
Porosidade leit	o e partíc	ulas	0,51		0,52		0,507	0,004
Tempo de residência CO ₂ [min.]			12,44		12,37		12,4	0,1
Tempo, min.	Extrato	S/F	Extrato	S/F	Média S/F	Amplitude	Média Extrato	Amplitude
5	0,8645	0,280	0,6178	0,281	0,280	0,001	0,7411	0,2467
10	1,1078	0,559	0,9625	0,562	0,561	0,003	1,0352	0,1453
15	1,3807	0,858	1,1904	0,795	0,827	0,064	1,2856	0,1903
20	1,5577	1,167	1,3384	1,115	1,141	0,052	1,4480	0,2193
30	1,8140	1,755	1,6153	1,686	1,721	0,069	1,7147	0,1988
40	2,0211	2,344	1,8211	2,190	2,267	0,153	1,9211	0,2001
50 ^b	2,1617	2,923	2,0657	2,859	2,891	0,063	2,1137	0,0960
70	2,3809	4,061	2,1876	3,383	3,722	0,678	2,2842	0,1933
90	2,5175	5,228	2,5236	5,205	5,216	0,023	2,5206	0,0061
120	2,6746	6,954	2,7258	6,998	6,976	0,044	2,7002	0,0512
160	2,8238	9,202	2,9038	9,489	9,345	0,287	2,8638	0,0800
210	2,9564	12,037	3,0482	12,552	12,294	0,514	3,0023	0,0918
250	3,0345	14,304	3,1450	15,101	14,702	0,797	3,0897	0,1104
300	3,1379	17,149	3,2350	18,173	17,661	1,024	3,1864	0,0970
335	3,1980	19,184	3,2692	19,278	19,231	0,094	3,2336	0,0712
Limpeza	3,2203		3,2854				3,2528	0,0651

^a Determinadas por Juliana A. Ferreira, bolsista SAE 03/2011-02/2012; ^b OEC11: frasco trocado em 60 min.

Tempo	OEC10		OEC11		Mádia	Mádia Doquio Amplitudo		
[min.]	1	2	1	2	iviedia	Desvio	Amplituae	
5	0,051	0,055	0,033	0,034	0,04	0,01	0,02	
10	0,070	0,073	0,065	0,067	0,07	0,00	0,01	
15	0,099	0,102	0,092	0,096	0,10	0,00	0,01	
20	0,125	0,129	0,112	0,109	0,12	0,01	0,02	
30	0,167	0,174	0,151	0,151	0,16	0,01	0,02	
40	0,206	0,212	0,179	0,176	0,19	0,02	0,04	
50	0,241	0,245	0,225	0,224	0,23	0,01	0,02	
70	0,300	0,307	0,257	0,256	0,28	0,03	0,05	
90	0,345	0,351	0,350	0,357	0,35	0,01	0,01	
120	0,400	0,406	0,420	0,430	0,41	0,01	0,03	
160	0,458	0,461	0,504	0,509	0,48	0,03	0,05	
210	0,509	0,513	0,577	0,588	0,55	0,04	0,08	
250	0,539	0,548	0,632	0,641	0,59	0,05	0,10	
300	0,581	0,594	0,675	0,684	0,63	0,05	0,10	
335	0,606	0,621	0,693	0,701	0,66	0,05	0,10	
Limpeza	0,611	0,626	0,702	*	0,65	0,05	0,09	

Tabela A31 - Rendimento (%) acumulado de bixina^a no extrato obtidos das curvas globais de extração (OECs 10 e 11).

^a Determinado por Juliana A. Ferreira, bolsista SAE 03/2011-02/2012; * Amostra insuficiente para análise.

Tempo	OEC10		OEC11		Mádia	Deguio	Amplitude
[min.]	1	2	1	2	Media	Desvio	Ampillude
5	0,189	0,204	0,176	0,183	0,19	0,01	0,03
10	0,258	0,241	0,306	0,313	0,28	0,04	0,07
15	0,342	0,344	0,384	0,421	0,37	0,04	0,08
20	0,461	0,483	0,439	0,287	0,42	0,09	0,20
30	0,535	0,566	0,468	0,490	0,51	0,04	0,10
40	0,599	0,587	0,443	0,410	0,51	0,10	0,19
50	0,798	0,758	0,622	0,645	0,71	0,09	0,18
70	0,874	0,924	0,853	0,848	0,87	0,03	0,08
90	1,053	1,037	0,915	0,991	1,00	0,06	0,14
120	1,126	1,113	1,138	1,174	1,14	0,03	0,06
160	1,264	1,183	1,549	1,471	1,37	0,17	0,37
210	1,243	1,282	1,659	1,797	1,50	0,28	0,55
250	1,227	1,421	1,857	1,798	1,58	0,30	0,63
300	1,307	1,445	1,575	1,574	1,48	0,13	0,27
335	1,304	1,442	1,749	1,640	1,53	0,20	0,44
Limpeza	0,740	0,736	1,713		1,06	0,56	0,98

Tabela A32 - Rendimento (%) de bixina no extrato durante as curvas globais de extração (OECs 10 e 11).

Tempo	OEC10		OEC11	OEC11		Deguio	Amplitudo
[min.]	1	2	1	2	Media	Desvio	Amplitude
5	0,002	0,002	0,001	0,001	0,0014	0,0003	0,0007
10	0,002	0,002	0,002	0,002	0,0022	0,0001	0,0002
15	0,003	0,003	0,003	0,003	0,0032	0,0001	0,0003
20	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000	0,001
30	0,005	0,006	0,005	0,005	0,005	0,000	0,001
40	0,007	0,007	0,006	0,006	0,006	0,001	0,001
50	0,008	0,008	0,007	0,007	0,008	0,000	0,001
70	0,010	0,010	0,008	0,008	0,009	0,001	0,001
90	0,011	0,011	0,012	0,012	0,011	0,000	0,001
120	0,013	0,013	0,014	0,014	0,013	0,001	0,001
160	0,015	0,015	0,017	0,017	0,016	0,001	0,002
210	0,016	0,017	0,019	0,019	0,018	0,002	0,003
250	0,017	0,018	0,021	0,021	0,019	0,002	0,004
300	0,019	0,019	0,022	0,022	0,021	0,002	0,004
335	0,019	0,020	0,023	0,023	0,021	0,002	0,004
Limpeza	0,020	0,020	0,023	*	0,021	0,002	0,003

Tabela A33 - Rendimento (%) acumulado de bixina^a em relação à matéria-prima, em base seca, obtidos das curvas globais de extração (OECs 10 e 11).

Tabela A34 - Dados de extração por Soxhlet de sementes inteiras de UP2 (umidade: 8,9%), após SFE em 313 K/20 MPa (OEC 10 e 11): Éter de petróleo (Synth, Diadema, SP, Brasil), com S/F = $35,58 \pm 0,02$.

Poplicata	Soxhlet: semente inteira									
Περιιζαία	Matéria-prima [g b.u.]	Matéria-prima [g b.s.]	% b.u.	% b.s.						
1	5,0598	4,6110	1,23	1,35						
2	5,0569	4,6084	1,27	1,40						
Média	5,058	4,610	1,25	1,38						
Desvio	0,002	0,002	0,03	0,03						
Amplitude	0,003	0,003	0,04	0,04						

Extrato			S/F		
Média	Desvio	Amplitude	Média	Desvio	Amplitude
0,62	0,18	0,41	0,31	0,03	0,06
0,96	0,12	0,30	0,62	0,07	0,13
1,24	0,13	0,29	0,93	0,12	0,24
1,43	0,14	0,27	1,26	0,14	0,27
1,72	0,13	0,24	1,89	0,20	0,40
1,94	0,12	0,24	2,52	0,30	0,60
2,12	0,08	0,18	3,17	0,32	0,61
2,33	0,11	0,26	4,27	0,69	1,46
2,54	0,05	0,11	5,70	0,56	1,04
2,72	0,05	0,12	7,63	0,75	1,37
2,90	0,06	0,14	10,22	1,03	2,05
3,03	0,05	0,13	13,36	1,26	2,59
3,12	0,06	0,13	15,97	1,53	3,33
3,21	0,05	0,11	19,12	1,75	3,76
3,26	0,05	0,12	21,00	2,06	3,82
3,28	0,04	0,10	-	-	-

Tabela A35 - Dados de rendimento em extrato e razão S/F, em base seca, apresentados como média das porcentagens obtidas das OECs 8, 9 10 e 11.

O objetivo desta tabela foi mostrar a baixa diferença entre as duplicatas 8 - 9 e 10 - 11 realizadas por operadores diferentes e, assim, assumir composição similares de tocóis totais e bixina nos extratos das OECs.

Piloto 1			Piloto 2			Média Amplitude				
297,14			277,73			287,44	±	19,41	Vazã [×10 ⁻	to CO₂ ⁵ kg/s]
0,35			0,33	0,34	±	0,02	Veloc [m/s]	idade superficial		
2,15			2,15			2,1505	±	0,0003	Maté	ria-prima [kg]
677,12			685,48			681	±	8	Dens [kg/m	idade aparente 3]
0,49			0,48			0,49	±	0,01	Poros	sidade
8,07			8,42		8,2	±	0,4	Temp [min.]	oo residência	
Tempo, min.	Extrato	S/F	Tempo, min.	Extrato	S/F	Temp (méd±a	oo mp)	Extra (méd±	ato amp)	S/F (méd±amp)
25	1,87	3,11	30	1,86	3,11	28	5	1,86	0,00	3,11 0,00
50	2,33	5,12	58	2,25	5,12	54	8	2,29	0,08	5,12 0,00
75	2,60	7,03	85	2,53	7,03	80	10	2,56	0,06	7,03 0,00
100	2,78	8,78	110	2,71	8,77	105	10	2,75	0,07	8,78 0,00
130	2,90	10,83	137	2,90	10,61	134	7	2,90	0,00	10,72 0,22
Limpeza	3,24			3,26				3,25	0,02	

Tabela A36 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, obtidos das curvas globais de extração (Piloto 1 e 2) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinadas na unidade piloto em célula de 5 L: dados calculados com base na matéria-prima seca, (8,9 \pm 0,2) % de umidade.

* méd±amp: média ± amplitude.

Tempo	Piloto	1		Piloto	2		S1	S2	S3	
[min.]	S1	S2	S3	S1	S2	S3	(méd±amp)	(méd±amp)	(méd±amp)	
28 5	0,13	0,50	1,23	0,15	0,58	1,14	0,14 0,01	0,54 0,08	1,18 0.09	
54 8	0,22	0,60	1,51	0,21	0,65	1,39	0,21 0,01	0,63 0,05	1,45 0.12	
80 10	0,24	0,69	1,66	0,24	0,74	1,56	0,241 0,005	0,71 0,05	1,61 0.10	
105 10	0,25	0,76	1,77	0,25	0,80	1,66	0,25 0,01	0,78 0,05	1,71 0.11	
134 7	0,26	0,79	1,85	0,26	0,85	1,79	0,26 0,00	0,82 0,06	1,82 0.06	
Limpeza	0.40	0,85	1,99	0,32	1,04	1,90	0,36 0,07	0,94 0,19	1,95 0,09	

Tabela A37 - Dados de tempo e rendimento (%) em extrato acumulado em cada separador (S) da unidade Piloto, obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados calculados com base na matéria-prima seca.

* méd±amp: média ± amplitude.

ÓEC	Piloto1		Piloto2		Mádia	Deside	م معمد الله معمد ال
Replicata	1	2	1	2	- Media	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,01	0,01
54	0,06	0,06	0,07	0,07	0,068	0,004	0,007
80	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,01	0,01
105	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,01	0,01
134	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,01	0,01
Limpeza	0,15	0,17	0,12	0,12	0,14	0,02	0,05
Tempo	S2						
28	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,01	0,01
54	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,01	0,01
80	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,00	0,01
105	0,15	0,15	0,14	0,15	0,148	0,002	0,005
134	0,16	0,16	0,17	0,17	0,165	0,002	0,005
Limpeza	0,20	0,20	0,34	0,40	0,28	0,10	0,20
Tempo	S3						
28	0,02	0,02	0,01	0,01	0,015	0,001	0,002
54	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,01	0,02
80	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,01	0,01
105	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,01	0,01
134	0,09	0,10	0,09	0,09	0,092	0,004	0,010
Limpeza	0,13	0,14	0,11	0,11	0,12	0,02	0,03
Tempo	Bixina	total					
28	0,12	0,12	0,14	0,14	0,13	0,01	0,02
54	0,19	0,19	0,19	0,19	0,189	0,003	0,007
80	0,25	0,25	0,25	0,26	0,252	0,005	0,010
105	0,30	0,30	0,30	0,30	0,302	0,003	0,007
134	0,34	0,34	0,35	0,35	0,344	0,01	0,01
Limpeza	0,48	0,51	0,56	0,62	0,54	0,07	0,15

Tabela A38 - Rendimento (%) de bixina no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de bixina: dados acumulados obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2).

OEC	Piloto1		Piloto2	Piloto2		Deevie	Americking
Replicata	1	2	1	2	— iviedia	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,98	0,97	1,14	1,11	1,05	0,09	0,17
54	0,95	0,96	1,11	1,13	1,04	0,10	0,19
80	1,12	1,05	1,24	1,33	1,18	0,13	0,29
105	1,35	1,26	1,46	1,36	1,36	0,08	0,20
134	1,26	1,29	1,42	1,63	1,40	0,17	0,37
Limpeza	1,56	2,15	1,43	1,27	1,60	0,38	0,88
Tempo	S2						
28	0,43	0,43	0,42	0,45	0,43	0,01	0,03
54	0,56	0,55	0,63	0,67	0,60	0,06	0,12
80	1,23	1,16	1,10	1,11	1,15	0,06	0,13
105	1,53	1,55	1,33	1,20	1,40	0,16	0,34
134	1,47	1,48	1,51	1,41	1,47	0,04	0,10
Limpeza	2,23	2,06	3,01	4,03	2,83	0,90	1,98
Tempo	S3						
28	0,04	0,04	0,04	0,04	0,040	0,001	0,002
54	0,25	0,31	0,16	0,16	0,22	0,07	0,15
80	0,43	0,42	0,45	0,49	0,45	0,03	0,07
105	0,50	0,55	0,54	0,53	0,53	0,02	0,05
134	0,73	0,70	0,53	0,55	0,63	0,10	0,20
Limpeza	0,81	0,93	0,53	0,48	0,69	0,22	0,45
Tempo	Bixina te	otal					
28	0,21	0,21	0,24	0,25	0,23	0,02	0,04
54	0,45	0,48	0,40	0,40	0,43	0,04	0,08
80	0,76	0,72	0,73	0,77	0,75	0,02	0,04
105	0,93	0,96	0,88	0,82	0,89	0,06	0,14
134	0,95	0,93	0,82	0,83	0,88	0,07	0,13
Limpeza	1,35	1,62	1,99	2,48	1,86	0,49	1,14

Tabela A39 - Rendimento (%) de bixina no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de bixina: composição dos extratos durante as curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2).

OEC	Piloto1		Piloto2		- Módia	Dogvio	Amplitudo
Replicata	1	2	1	2	- Meula	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,0013	0,0013	0,0017	0,0016	0,0015	0,0002	0,0004
54	0,0021	0,0021	0,0024	0,0023	0,0022	0,0001	0,0003
80	0,0024	0,0024	0,0027	0,0027	0,0026	0,0002	0,0004
105	0,0025	0,0025	0,0028	0,0028	0,0027	0,0002	0,0003
134	0,0026	0,0026	0,0030	0,0030	0,0028	0,0003	0,0005
Limpeza	0,0047	0,0055	0,0039	0,0038	0,0045	0,0008	0,0017
Tempo	S2						
28	0,0021	0,0022	0,0024	0,0026	0,0023	0,0002	0,0005
54	0,0027	0,0027	0,0029	0,0031	0,0028	0,0002	0,0004
80	0,0038	0,0037	0,0038	0,0040	0,0038	0,0001	0,0003
105	0,0048	0,0048	0,0047	0,0048	0,0048	0,0001	0,0001
134	0,0053	0,0053	0,0054	0,0055	0,0054	0,0001	0,0002
Limpeza	0,0065	0,0064	0,0110	0,0131	0,0092	0,0033	0,0067
Tempo	S3						
28	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0000	0,0001
54	0,0012	0,0014	0,0009	0,0009	0,0011	0,0002	0,0005
80	0,0019	0,0020	0,0016	0,0017	0,0018	0,0002	0,0004
105	0,0024	0,0026	0,0022	0,0022	0,0023	0,0002	0,0004
134	0,0030	0,0032	0,0029	0,0029	0,0030	0,0001	0,0003
Limpeza	0,0042	0,0045	0,0034	0,0035	0,0039	0,0005	0,0010
Tempo	Bixina To	otal					
28	0,0039	0,0040	0,0046	0,0047	0,0043	0,0004	0,0008
54	0,0060	0,0062	0,0061	0,0063	0,0061	0,0001	0,0003
80	0,0080	0,0081	0,0082	0,0084	0,0082	0,0002	0,0004
105	0,0097	0,0099	0,0097	0,0099	0,0098	0,0001	0,0002
134	0,0109	0,0110	0,0113	0,0115	0,0112	0,0002	0,0005
Limpeza	0,0154	0,0164	0,0184	0,0204	0,018	0,002	0,005

Tabela A40 - Rendimento (%) de bixina, por separador (S), e rendimento total (%) de bixina obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados acumulados e calculados em relação à matéria-prima seca.

OEC	Piloto1		Piloto2		NA (al' a	Duri	A see l'he she
Replicata	1	2	1	2	— Media	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,15	0,14	0,15	0,14	0,14	0,00	0,01
54	0,24	0,23	0,20	0,19	0,21	0,02	0,04
80	0,27	0,26	0,23	0,23	0,25	0,02	0,04
105	0,28	0,27	0,24	0,23	0,25	0,02	0,05
134	0,28	0,27	0,25	0,23	0,26	0,02	0,05
Limpeza	0,42	0,41	0,30	0,28	0,35	0,07	0,15
Tempo	S2						
28	0,30	0,30	0,36	0,36	0,33	0,03	0,06
54	0,38	0,38	0,42	0,42	0,40	0,02	0,04
80	0,47	0,48	0,53	0,52	0,50	0,03	0,06
105	0,57	0,57	0,61	0,61	0,59	0,03	0,05
134	0,62	0,62	0,67	0,67	0,64	0,03	0,06
Limpeza	0,68	0,68	0,90	0,89	0,79	0,12	0,22
Tempo	S3						
28	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,00	0,01
54	0,22	0,22	0,19	0,20	0,21	0,01	0,03
80	0,28	0,28	0,34	0,32	0,31	0,03	0,06
105	0,37	0,38	0,42	0,41	0,39	0,02	0,05
134	0,42	0,42	0,52	0,50	0,47	0,05	0,10
Limpeza	0,59	0,59	0,57	0,55	0,58	0,02	0,04
Tempo	γ-T3 tot	al					
28	0,52	0,52	0,58	0,57	0,55	0,03	0,06
54	0,83	0,83	0,81	0,81	0,82	0,01	0,02
80	1,02	1,02	1,10	1,08	1,05	0,04	0,09
105	1,22	1,21	1,28	1,25	1,24	0,03	0,06
134	1,32	1,30	1,44	1,40	1,37	0,07	0,14
Limpeza	1,70	1,68	1,77	1,72	1,72	0,04	0,08

Tabela A41 - Rendimento (%) de γ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de γ -T3: dados acumulados obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2).

OEC	Piloto1		Piloto2		Mádia	Deerie	Amplitudo
Replicata	1	2	1	2	- weula	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	3,62	3,47	3,24	3,17	3,38	0,21	0,46
54	3,39	3,34	2,73	2,69	3,04	0,38	0,70
80	3,56	3,42	3,98	4,00	3,74	0,29	0,58
105	3,36	3,32	4,37		3,68	0,60	1,05
134	3,62		2,66		3,14	0,68	0,97
Limpeza	3,36	3,33	2,45	2,44	2,90	0,52	0,92
Tempo	S2						
28	1,93	1,94	2,03	2,00	1,98	0,05	0,11
54	2,55	2,48	2,77	2,77	2,64	0,15	0,29
80	3,51	3,66	4,15	4,17	3,87	0,33	0,65
105	4,55	4,21	4,05	4,17	4,25	0,21	0,49
134	4,78	4,84	4,15	4,02	4,45	0,42	0,82
Limpeza	4,02	4,04	4,00	3,85	3,98	0,09	0,19
Tempo	S3						
28	0,20	0,20	0,21	0,21	0,20	0,01	0,01
54	1,67	1,64	1,53	1,66	1,62	0,06	0,14
80	1,26	1,40	2,84	2,39	1,97	0,77	1,58
105	2,82	2,89	2,60	2,77	2,77	0,12	0,29
134	2,06	1,53	2,43	2,23	2,06	0,38	0,90
Limpeza	3,83	3,98	1,46	1,56	2,71	1,39	2,53
Tempo	γ-T3 to	tal					
28	0,91	0,90	1,02	1,00	0,96	0,06	0,11
54	2,17	2,13	1,95	2,02	2,07	0,10	0,22
80	2,22	2,34	3,35	3,10	2,75	0,56	1,13
105	3,49	3,40	3,23	3,20	3,33	0,14	0,29
134	2,86	2,35	2,85	2,49	2,64	0,26	0,51
Limpeza	3,67	3,72	2,96	2,92	3,32	0,44	0,80

Tabela A42 - Rendimento (%) de γ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de γ -T3: composição dos extratos durante as curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2).

OEC	Piloto1		Piloto2		Mádia	Doguio	Amplitudo
Replicata	1	2	1	2	- Media	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000
54	0,008	0,007	0,006	0,006	0,007	0,001	0,001
80	0,009	0,008	0,008	0,008	0,008	0,001	0,001
105	0,009	0,009	0,008	0,008	0,008	0,001	0,001
134	0,009	0,009	0,008	0,008	0,008	0,001	0,002
Limpeza	0,014	0,013	0,010	0,009	0,011	0,002	0,005
Tempo	S2						
28	0,010	0,010	0,012	0,012	0,011	0,001	0,002
54	0,012	0,012	0,014	0,014	0,013	0,001	0,002
80	0,015	0,015	0,017	0,017	0,016	0,001	0,002
105	0,018	0,018	0,020	0,020	0,019	0,001	0,002
134	0,020	0,020	0,022	0,022	0,021	0,001	0,002
Limpeza	0,022	0,022	0,029	0,029	0,026	0,004	0,007
Tempo	S3						
28	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000
54	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,000	0,001
80	0,009	0,009	0,011	0,011	0,010	0,001	0,002
105	0,012	0,012	0,014	0,013	0,013	0,001	0,002
134	0,014	0,014	0,017	0,016	0,015	0,002	0,003
Limpeza	0,019	0,019	0,018	0,018	0,019	0,001	0,001
Tempo	γ-T3 tota	al					
28	0,017	0,017	0,019	0,019	0,018	0,001	0,002
54	0,027	0,027	0,027	0,026	0,027	0,000	0,000
80	0,033	0,033	0,036	0,035	0,034	0,002	0,003
105	0,039	0,039	0,042	0,041	0,040	0,001	0,002
134	0,043	0,042	0,047	0,046	0,044	0,002	0,005
Limpeza	0,055	0,055	0,058	0,056	0,056	0,001	0,003

Tabela A43 - Rendimento (%) de γ -T3, por separador (S), e rendimento total (%) de γ -T3 obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados acumulados e calculados em relação à matéria-prima seca.

OEC	Piloto1		Piloto2		Mádia	Decuie	٨٠٠٠٠
Replicata	1	2	1	2	- Media	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,96	0,95	0,99	1,00	0,98	0,03	0,05
54	1,52	1,53	1,30	1,31	1,42	0,13	0,23
80	1,72	1,72	1,55	1,54	1,63	0,10	0,17
105	1,78	1,78	1,60	1,54	1,68	0,12	0,24
134	1,82	1,78	1,67	1,54	1,70	0,12	0,28
Limpeza	2,86	2,79	1,99	1,87	2,38	0,52	0,99
Tempo	S2						
28	2,22	2,32	2,18	2,10	2,21	0,09	0,23
54	2,70	2,81	2,54	2,44	2,62	0,17	0,37
80	3,31	3,44	3,23	3,13	3,28	0,13	0,31
105	3,95	4,06	4,03	3,98	4,00	0,05	0,11
134	4,28	4,39	4,42	4,37	4,37	0,06	0,14
Limpeza	4,78	4,88	6,03	5,93	5,40	0,66	1,24
Tempo	S3						
28	0,48	0,48	0,40	0,39	0,44	0,05	0,09
54	1,42	1,41	1,25	1,25	1,33	0,09	0,17
80	1,80	1,84	2,15	1,97	1,94	0,15	0,34
105	2,45	2,45	2,64	2,46	2,50	0,10	0,20
134	2,81	2,71	3,39	3,20	3,03	0,32	0,68
Limpeza	3,99	3,94	3,75	3,57	3,81	0,19	0,42
Tempo	δ-T3 tota	I					
28	3,65	3,76	3,58	3,49	3,62	0,11	0,27
54	5,65	5,76	5,09	5,00	5,37	0,38	0,76
80	6,83	7,00	6,92	6,64	6,85	0,15	0,35
105	8,18	8,28	8,28	7,98	8,18	0,14	0,30
134	8,92	8,87	9,48	9,12	9,10	0,28	0,61
Limpeza	11,64	11,61	11,76	11,37	11,59	0,16	0,39

Tabela A44 - Rendimento (%) de δ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de δ -T3: dados acumulados obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2).

OEC	Piloto1		Piloto2		Mádia	Deguio	Amplitudo
Replicata	1	2	1	2		Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	23,36	23,17	22,02	22,34	22,72	0,65	1,34
54	21,68	22,20	16,59	16,11	19,15	3,24	6,09
80	24,12	23,18	26,22	25,31	24,71	1,33	3,04
105	22,22	21,60	26,30		23,38	2,55	4,70
134	23,57		17,28		20,43	4,45	6,30
Limpeza	24,33	23,89	16,17	16,73	20,28	4,43	8,17
Tempo	S2						
28	14,25	14,94	12,25	11,76	13,30	1,54	3,18
54	15,88	15,99	16,16	15,89	15,98	0,13	0,28
80	22,41	23,15	26,77	26,60	24,73	2,28	4,36
105	30,15	29,02	38,61	40,98	34,69	5,99	11,96
134	32,63	32,35	28,19	28,53	30,42	2,39	4,44
Limpeza	30,10	29,44	27,86	26,92	28,58	1,45	3,18
Tempo	S3						
28	1,25	1,27	1,15	1,12	1,20	0,07	0,15
54	10,91	10,75	10,82	10,89	10,84	0,07	0,16
80	8,16	9,11	17,51	14,16	12,23	4,40	9,36
105	19,59	18,25	16,01	15,61	17,36	1,89	3,99
134	13,94	10,15	18,10	18,08	15,07	3,82	7,95
Limpeza	27,06	28,15	10,95	11,39	19,39	9,50	17,19
Tempo	δ-T3 tota	al					
28	6,33	6,52	6,26	6,11	6,30	0,17	0,41
54	13,94	13,96	12,70	12,63	13,31	0,74	1,34
80	14,39	15,10	21,24	19,11	17,46	3,27	6,85
105	23,65	22,42	25,08	24,76	23,98	1,21	2,66
134	19,42	15,64	20,40	19,28	18,69	2,09	4,76
Limpeza	26,42	26,60	20,75	20,48	23,56	3,40	6,11

Tabela A45 - Rendimento (%) de δ -T3 no extrato, por separador (S), e rendimento total (%) de δ -T3: composição dos extratos durante as curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2).

OEC	Piloto1		Piloto2		Mádia	Doguio	Amplitudo
Replicata	1	2	1	2	weula	Desvio	Amplitude
Tempo	S1						
28	0,031	0,031	0,032	0,033	0,032	0,001	0,002
54	0,049	0,050	0,042	0,043	0,046	0,004	0,007
80	0,056	0,056	0,050	0,050	0,053	0,003	0,005
105	0,058	0,058	0,052	0,050	0,054	0,004	0,007
134	0,059	0,058	0,055	0,050	0,055	0,004	0,009
Limpeza	0,092	0,090	0,065	0,061	0,077	0,017	0,031
Tempo	S2						
28	0,072	0,075	0,071	0,068	0,072	0,003	0,007
54	0,088	0,091	0,083	0,080	0,085	0,005	0,011
80	0,107	0,111	0,105	0,102	0,106	0,004	0,009
105	0,128	0,131	0,131	0,130	0,130	0,002	0,004
134	0,139	0,142	0,144	0,143	0,142	0,002	0,005
Limpeza	0,155	0,158	0,196	0,193	0,176	0,022	0,042
Tempo	S3						
28	0,015	0,016	0,013	0,013	0,014	0,002	0,003
54	0,046	0,046	0,041	0,041	0,043	0,003	0,005
80	0,058	0,060	0,070	0,064	0,063	0,005	0,012
105	0,079	0,079	0,086	0,080	0,081	0,003	0,007
134	0,091	0,088	0,110	0,104	0,098	0,011	0,023
Limpeza	0,129	0,127	0,122	0,116	0,124	0,006	0,013
Tempo	δ-T3 tota	l					
28	0,118	0,122	0,117	0,114	0,118	0,003	0,008
54	0,183	0,186	0,166	0,163	0,175	0,012	0,023
80	0,221	0,226	0,226	0,217	0,222	0,005	0,010
105	0,265	0,268	0,270	0,260	0,266	0,004	0,010
134	0,289	0,287	0,309	0,297	0,296	0,010	0,022
Limpeza	0,377	0,376	0,383	0,371	0,377	0,005	0,013

Tabela A46 - Rendimento (%) de δ -T3, por separador (S), e rendimento total (%) de δ -T3 obtidos das curvas globais de extração (OECs Piloto 1 e 2): dados acumulados e calculados em relação à matéria-prima seca.

Tabela A 47 - Dados de tempo de extração, rendimento (%) em extrato e S/F, obtidos da extração (Piloto 3) de UP2 em 313 K/20 MPa, determinada na unidade piloto em célula de 5,15L: dados calculados com base na matéria-prima seca com umidade igual a $(8,9 \pm 0,2)$ %.

Piloto 3					
Vazão CO₂, ×10⁻⁵ kg/s	Velocidade superficial, m/s	Matéria-prima, kg	Densidade aparente, kg/m ³	Porosidade	Tempo de residência, min.
0,0025	0,30	2,192	669	0,50	9,11
Tempo, min.	S/F, b.s.	Extrato, % b.s.	S1, % b.s.	S2, % b.s.	S3, % b.s.
143,3	10,76	2,51	0,07	0,10	2,35
Limpeza		2,97	0,13	0,25	2,58

2.3 PROCEDIMENTO DO AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS.

O procedimento para o ajuste dos dados experimentais da OECs 333 K/40 MPa de UP1 e 313 K/20 MPa de UP2 a um spline de três linhas retas foi realizado da seguinte maneira: inicialmente, utilizou-se o procedimento PROC REG (Tabela A48 e Tabela A52) para estimar os valores dos coeficientes lineares, que no programa são nomeados como Intercept (b₀), tmin (b₁), AL1 (b₂), e AL2 (b₃). Posteriormente, utilizaram-se estes dados como valores de entrada para o procedimento PROC NLIN (Tabela A50 e Tabela A54).

Os valores iniciais dos parâmetros knot1 e knot2 foram estimados pela visualização da curva obtida do primeiro ajuste da cinética de extração, feito pelo procedimento PROC REG. Como o cálculo é iterativo, a convergência é bem mais rápida quando os valores iniciais estão mais próximos das estimativas. Finalmente, foram obtidos os valores do modelo ajustado, onde knot1 e knot2 são os parâmetros cinéticos t_{CER} e t_{FER} , respectivamente.

Os dados ajustados fornecidos pelo aplicativo foram plotados em termos de rendimento em extrato, em base seca, em função do tempo de extração. A seguir são mostradas as rotinas de programação, informações de saída do software SAS 9.2, e as equações das retas do modelo obtido.

Tabela A48 – Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (333 K/40 MPa) de UP1 a um spline de 3 linhas retas: PROC REG.

```
options ls=80 ps=50;
Title 'OEC6-7 a 333K e 40 MPa';
data OEC67;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-80, 0);
AL2 = max(tmin-200, 0);
Cards;
1
      0.334231
5
      0.764776
10
      1.210445
15
      1.341733
20
      1.540693
      1.898859
31
40
      2.117163
50
      2.296368
60
      2.427753
70
      2.542753
      2.64414
80
90
      2.719403
105
      2.807564
120
      2.885278
135
      2.958288
150
      3.018451
      3.072357
165
180
      3.116237
195
      3.153992
220
      3.214829
240
      3.265344
260
      3.30501
280
      3.345087
300
      3.376251
330
      3.415958
360
      3.473612
390
      3.505301
420
      3.550771
Proc Reg;
Model mext = tmin AL1 AL2;
Output out = a p=mexthat r=Mres;
Proc print;
Axis1 order = (0 \text{ to } 4.0 \text{ by } 0.5);
Proc gplot; Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color =
black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mexthat*tmin/legend
overlay vaxis = axis1;
Run;
```

Tabela A49 - Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.).

100000, 1100.								
			0EC6-7 a	a 333K	e 40 MPa			
			The R	EG Pro	ocedure			
			Mod	MC				
			Donondont	- Voni	abla, maxt			
			Dependent	L vart	abie: mext			
		Number	ot Observ	ations	s Read	28		
		Number	of Observ	ations	s Used	28		
		Ana	lvsis of	Varia	nce			
			Sum o	f	Mean			
Courses		DE	Cauana	/1 	Caucaa			
Source		DF	Square	5	Square	F Value		
Model		3	20.1663	80	6.72210	236.84	<.0001	
Error		24	0.6811	9	0.02838			
Corrected Tot	tal	27	20.8474	8				
	Boot MSE		0 1684	.7 F	8-Square	0 9673		
	Dopondont	Moon	0.1004		Adi D Sa	0.0620		
	Dependent	Mean	2.0179		Auj R-Sy	0.9032		
	Coeff Var		6.4352	26				
		Par	ameter Es	stimate	es			
		Parame	ter	Stand	dard			
Variable	⊳ DF	Fstim	ate	F	rror t Va	alue Pr>	+	
Tatanaa	- I		001				001	
Intercel	pt i	0.85	201	0.00		J.43 \.00		
tmin	1	0.02	478	0.00	0160 15	5.51 <.00	001	
AL1	1	-0.02	200	0.00	0237 -9	9.28 <.00	001	
AL2	1	-0.00093	715	0.0	0152 -0	0.61 0.54	445	
			0FC6-7 a	a 333K	e 40 MPa			
Obe	tmin	movt	AL 1		movthat	Mros		
003	CIII 11							
1	1	0.33423	0	0	0.87759	-0.54336		
2	5	0.76478	0	0	0.97672	-0.21194		
3	10	1.21045	0	0	1.10063	0.10982		
4	15	1.34173	0	0	1.22454	0.11719		
5	20	1.54069	0	0	1.34845	0.19224		
6	31	1 89886	0	0	1 62105	0 27781		
7	40	0 11716	0	0	1 94400	0.07207		
1	40	2.11/10	0	0	1.64409	0.27307		
8	50	2.29637	0	0	2.09191	0.20445		
9	60	2.42775	0	0	2.33974	0.08802		
10	70	2.54275	0	0	2.58756	-0.04480		
11	80	2.64414	0	0	2.83538	-0.19124		
12	90	2,71940	10	0	2.86325	-0.14385		
13	105	2 80756	25	0	2 90506	-0 09749		
10	100	2.00750	40	0	2.30300	0.06150		
14	120	2.00020	40	0	2.94060	-0.00156		
15	135	2.95829	55	0	2.98867	-0.03038		
16	150	3.01845	70	0	3.03048	-0.01202		
17	165	3.07236	85	0	3.07228	0.00008		
18	180	3.11624	100	0	3.11409	0.00215		
19	195	3,15399	115	0	3,15589	-0.00190		
20	220	3 21483	140	20	3 20683	0 00800		
20	220	0.21400	160	40	0.20000	0.00150		
21	240	3.20534	100	40	3.24383	0.02152		
22	260	3.30501	180	60	3.28083	0.02418		
23	280	3.34509	200	80	3.31783	0.02726		
24	300	3.37625	220	100	3.35482	0.02143		
25	330	3,41596	250	130	3,41032	0,00563		
26	360	3 47361	280	160	3 46582	0 00770		
20	200	3 50520	210	100	3 50100	0.01600		
27	390	3.50530	310	190	0.52132	-0.01002		
28	420	3.55077	340	220	3.5/682	-0.02605		

Intercept (b0), tmin (b1), AL1 (b2), e AL2 (b3) são parâmetros de entrada do procedimento PROC NLIN: OEC (333 K/40 MPa) de UP1.

Tabela A50 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (333 K/40 MPa) de UP1 a um spline de 3 linhas retas: PROC NLIN.

```
options ls=120 ps=70;
Title 'OEC67 a 333 K e 40 MPa';
data OEC67;
input tmin rend;
AL1 = max(tmin-80, 0);
AL2 = max(tmin-200, 0);
Cards;
      0.334231
1
      0.764776
5
10
      1.210445
15
      1.341733
20
      1.540693
31
      1.898859
40
      2.117163
50
      2.296368
60
      2.427753
70
      2.542753
80
      2.64414
      2.719403
90
105
      2.807564
120
      2.885278
135
      2.958288
      3.018451
150
165
      3.072357
180
      3.116237
195
      3.153992
220
      3.214829
240
      3.265344
260
      3.30501
280
      3.345087
300
      3.376251
330
      3.415958
360
      3.473612
390
      3.505301
420
      3.550771
Proc Nlin;
parms
b0 = 0.85281
b1 = 0.02478
b2 = -0.02200
b3 = -0.00093715
knot1 = 40
knot2 = 90;
AL1 = max(tmin-knot1, 0);
AL2 = max(tmin-knot2, 0);
Model rend = b0 + b1 \times tmin + b2 \times AL1 + b3 \times AL2;
Output out = a p=rendi r=Mrend;
Axis order = (0 \text{ to } 4.0 \text{ by } 0.5);
Proc print;
Proc gplot;
Plot Mrend*rendi;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black;
Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;
```

institute	, , iii0. <i>j</i> .								
	· ·			0EC67	'a 333 K	e 40	MPa		
				The	NLIN Pr	ocedur	re		
				Depen	dent Vari	able	rend		
				Meth	od: Gaus	s-New1	ton		
				I	terative	Phase			
Iter	b0	b1		b2	b3		knot1	knot2	SumOfSquares
0	0.8528	0.	0248	-0.0220	-0.0009	94	40.0000	90.0000	17.0882
1	0.5078	0.	0493	-0.0363	-0.010)6	24.7822	148.1	1.8360
2	0.4088	0.	0617	-0.0521	-0.0076	68	26.9582	134.8	0.2350
3	0.4088	0.	0617	-0.0511	-0.0086	64	25.6472	117.2	0.1331
4	0.4088	0.	0617	-0.0497	-0.0098	37	24.8422	107.2	0.1231
5	0.4088	0.	0617	-0.0497	-0.0098	37	24.8206	108.4	0.1212
			N	OTE: Conve	rgence cr	riteri	on met.Est	imation Summ	nary
			Me	thod		Ga	auss-Newton	l	
			It	erations			5	5	
			R				C)	
			PF	O			C)	
			RF	C(knot2)			0.011665	5	
			Ob	oject			0.015544	Ļ	
			Ob	jective			0.121225	5	
			Ob	servations	Read		28	3	
			Ob	servations	Used		28	3	
			Ob	servations	Missing		C)	
Source			DF	SumOfS	quares	Me	anSquare	F Value	Approx Pr > F
Model			5	20.726	3	4.	1453	752.28	<.0001
Error			22	0.121	2	0.	00551		
Correct	ted Total		27	20.847	5				
F	Parameter		Estimate	Approx	Std Erron	- A	pproximate	95% Confide	ence Limits
	b0		0.408	8 0.0	599		0.2846	0.53	330
	b1		0.061	7 0.0	0489		0.0516	0.07	719
	b2		-0.049	7 0.0	0501		-0.0601	-0.03	393
	b3		-0.0098	7 0.0	0113		-0.0122	-0.007	754
	knot1		24.820	6 1.9	020		20.8761	28.76	650
	knot2		108.	4 6.5	289		94.9057	122	2.0
				Approxima	te Corre	latior	n Matrix		
	b0		b1	b2		b	3	knot1	knot2
b0 ·	1.0000000	- 0	.8322718	0.81	17227	-0.0	000000	0.4340650	-0.0000000
b1 -0	0.8322718	1	.0000000	-0.97	53096	0.0	000000	-0.7553429	0.000000
b2 (0.8117227	- 0	.9753096	1.00	00000	-0.2	170226	0.6309538	-0.1618524
b3 -0	0.000000	0	.0000000	-0.21	70226	1.0	000000	0.4705200	0.6356252
knot1 (0.4340650	- 0	.7553429	0.63	09538	0.4	705200	1.0000000	0.2379174
knot2-0	0.000000	0	.0000000	-0.16	18524	0.6	356252	0.2379174	1.0000000
				0EC67	'a 333 K	e 40	MPa		
		0bs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend	
		1	1	0,33423	0	0	0,47054	-0,13631	
		2	5	0,76478	0	0	0,71743	0,04735	
		3	10	1,21045	0	0	1,02603	0,18441	
		4	15	1,34173	0	0	1,33464	0,00710	

Tabela A 51	- Dados	de saída	do	procedimento	PROC	NLIN	do	software	SAS	9,2	(SAS
Institute, Inc.).										

5	20	1,54069	0	0	1,64324	-0,10255	
6	31	1,89886	0	0	2,01490	-0,11604	
7	40	2,11716	0	0	2,12286	-0,00570	
8	50	2,29637	0	0	2,24282	0,05355	
9	60	2,42775	0	0	2,36278	0,06498	
10	70	2,54275	0	0	2,48273	0,06002	
11	80	2,64414	0	0	2,60269	0,04145	
12	90	2,71940	10	0	2,72264	-0,00324	
13	105	2,80756	25	0	2,90258	-0,09502	
14	120	2,88528	40	0	2,96845	-0,08317	
15	135	2,95829	55	0	3,00030	-0,04201	
16	150	3,01845	70	0	3,03215	-0,01370	
17	165	3,07236	85	0	3,06400	0,00835	
18	180	3,11624	100	0	3,09585	0,02038	
19	195	3,15399	115	0	3,12770	0,02629	
20	220	3,21483	140	20	3,18079	0,03404	
21	240	3,26534	160	40	3,22326	0,04209	
22	260	3,30501	180	60	3,26573	0,03928	
23	280	3,34509	200	80	3,30819	0,03689	
24	300	3,37625	220	100	3,35066	0,02559	
25	330	3,41596	250	130	3,41437	0,00159	
26	360	3,47361	280	160	3,47807	-0,00446	
27	390	3,50530	310	190	3,54177	-0,03647	
28	420	3,55077	340	220	3,60547	-0,05470	

 t_{CER} (knot1) e t_{FER} (knot2) e rendimentos obtidos experimentalmente (rend) e pelo modelo (rendi): OEC (333 K/40 MPa) de UP1, onde tmin: tempo de extração; rend: rendimento experimental; AL1 e AL2: parâmetros do modelo; rendi: rendimento calculado pelo modelo; Mrend: diferença entre o rendimento experimental e o calculado. *b0*, *b1*, *b2*, e *b3* são coeficientes lineares da equação descrita por Meireles (2008).



Figura A7 - Dados de rendimento de extrato, em relação a matéria-prima em base seca, por tempo de extração; e equações lineares das retas do ajuste dos dados experimentais (OEC 6 e 7, em 333 K e 40 MPa) ao Spline de três retas: CER – *constant extraction rate*; FER – *falling extraction rate*; DC – *diffusion controlled*

Tabela A52 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (313 K/20 MPa) de UP2 a um spline de 3 linhas retas: PROC REG.

```
options ls=80 ps=50;
Title 'OEC 8 e 9 a 313K e 20 MPa';
data OEC313K20MPa;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-30, 0);
AL2 = max(tmin-90, 0);
Cards;
      0
0
5
      0.530875474
      0.951671677
10
15
      1.302123415
20
      1.550754716
30
      1.852346505
40
      2.05939487
50
      2.213887026
70
      2.444268038
90
      2.604824371
120
      2.795297317
      2.959665419
160
210
      3.083952192
250
      3.163133032
300
      3.251034736
335
      3.319357809
0
      0
5
      0.456219552
10
      0.806898423
15
      1.092419965
20
      1.2837531
30
      1.609184984
40
      1.848528783
50
      2.033949275
70
      2.31196176
90
      2.495194574
120
      2.694509777
160
      2.898614222
210
      3.049090993
250
      3.131158481
300
      3.207195073
335
      3.258221184
Proc Reg;
Model mext = tmin AL1 AL2;
Output out = a p=mexthat r=Mres;
Proc print;
Axis1 order = (0 \text{ to } 4.0 \text{ by } 0.5);
Proc gplot; Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color =
black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mexthat*tmin/legend
overlay vaxis = axis1;
Run;
```

institute	, INC.).										
				OEC	8 e 9 a 3	313K e :	20 MPa				
					The REG H	Procedu	re				
					Model:	MODEL1					
				Dep	endent Va	riable:	mext				
			Nun	ber of (Observatio	ons Rea	d	32			
			Nun	ber of (Observatio	ons Use	d	32			
					Analys	is of V	ariance	è			
					Sum of	N	Mean	-			
	Source			DF	Squares	ç	Square		F Value		Pr > F
	Model			3	31.73358	-	10.5778	6	661.66		<.0001
	Frror			28	0.44763		0.0159	9			
	Correcte	⊳d Tota	1	31	32,18121			-			
			-	•••							
			Root MS	SF	0	. 12644		R-Squar	e	0.9861	
			Depende	ent Mean	2	.07061		Adi R-S	a	0.9846	
			Coeff	Var	6	.10636		···· ·	-1		
					_						
				1	Parameter	Estima	tes				
					Paramete	- E	Standar	d			
		Variab]	Le	DF	Estimate	E	Error		t Value	•	Pr > t
		Interce	ept	1	0.20331	(0.05939		3.42		0.0019
		tmin	- F -	1	0.05563	(0.00307		18.12		<.0001
		AI 1		1	-0.04272	Ċ	0.00408		-10.47		<.0001
		AL 2		1	-0.01003	(0.00165		-6.08		<.0001
				-		-					
		0bs	tmin	mext	A	L1 A	AL2	mexthat		Mres	
		1	0	0.00000) 0	(C	0.20331		-0.2033	51
		2	5	0.53088	3 0	(C	0.48148		0.0494	0
		3	10	0.95167	7 O	(2	0.75964		0.1920	3
		4	15	1.30212	2 0	(5	1.03781		0.2643	51
		5	20	1.55075	5 0	(5	1.31598		0.2347	'8
		6	30	1.85235	5 0	Ć	-)	1.87231		-0.0199	6
		7	40	2.05939)) 1	0 0	5	2.00145		0.0579	5
		8	50	2.21389	,) 2	0 0	-)	2.13059		0.0833	10
		9	70	2.44427	/ <u> </u>	0 0	,)	2.38886		0.0554	0
		10	90	2 60482	, , ,	0 0	- 1	2 64714		-0 0423	2
		11	120	2 79530	-) 9	0 9	30	2 73367		0 0616	3
		12	160	2.95967	7 1	30 7	70	2.84904		0.1106	3
		13	210	3 08395	· ·	80 1	120	2 99325		0 0907	70
		14	250	3 16313	3 2	20 1	160	3 10862		0 0545	2
		15	300	3 25103	, <u> </u>	70 2	210	3 25283		-0 0017	<u>'</u> 9
		16	335	3 31936	3	05 2	245	3 35378		-0 0344	2
		17	0	0.00000) 0	<u> </u>	e ว	0.20331		-0.2033	1
		18	5	0 45622	, î	(5 1	0 48148		-0 0252	26
		10	10	0.90600	<u> </u>	0	5 1	0.75064		0.0232	26
		20	15	1 00242	, 0 , 0		5 1	1 03781		0.05/6	.u
		20	20	1 28375	0		ן ר	1 31508		-0.0322	20
		21 00	30	1 60019	2 0		ן ר	1 97231		-0.0022	2
		22 00	40	1 04050	, U	0 0	5	0.00145		0.1500	2
		23	40 50	1.04000	י היי		ן ר	2.00145		-0.1528	2
		24 25	70	2.00090	2		ן ר	2.13039		-0.0900	9 4
		20 06	70	2.31190	, 4) 2		ן ר	2.00000		-0.0/09	NE NE
		20 07	100	2.49018			2	2.04/14		-0.1518	6
		<i>21</i>	120	2.09451	9	ບ ເ ດດ -	30	2./330/		-0.0391	0
		∠ŏ	100	2.89861	1	30 <i>I</i>	100	2.84904		0.0495	00
		29 20	210	3.04909	• 1	8U 1	120	2.99325		0.0558	94
		30	250	3.13116	2	20 1	100	3.10862		0.0225	94
		31	300	3.20720	2	70 2	210	3.25283		-0.0456	3
		32	335	3.25822	2 3	05 2	245	3.35378		-0.0955	5

Tabela A53 - Dados de saída do procedimento PROC REG do software SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.).

Intercept (b0), tmin (b1), AL1 (b2), e AL2 (b3) são parâmetros de entrada do procedimento PROC NLIN: OEC (313 K/20 MPa) de UP2.

Tabela A54 - Rotina de programação usada no SAS 9,2 (SAS Institute, Inc.) para o ajuste dos dados experimentais da OEC (313 K/20 MPa) de UP2 a um spline de 3 linhas retas: PROC NLIN.

```
options ls=120 ps=70;
Title 'OEC 8 e 9 a 313K e 20 MPa';
data OEC313K20MPa;
input tmin rend;
AL1 = max(tmin-30,0);
AL2 = max(tmin-90, 0);
Cards;
0
       0
       0.530875474
5
10
       0.951671677
15
20
       1.302123415
       1.550754716
30
       1.852346505
40
       2.05939487
       2.213887026
50
70
       2.444268038
90
       2.604824371
120
       2.795297317
       2.959665419
160
210
       3.083952192
250
       3.163133032
300
       3.251034736
335
       3.319357809
0
       0
       0.456219552
5
10
       0.806898423
15
       1.092419965
20
       1.2837531
       1.609184984
30
40
       1.848528783
       2.033949275
50
70
       2.31196176
       2.495194574
2.694509777
90
120
160
       2.898614222
       3.049090993
210
250
       3.131158481
       3.207195073
300
335
       3.258221184
Proc Nlin;
parms
b0 = 0.20331
b1 = 0.05563
b2 = -0.04272
b3 = -0.01003
knot1 = 30
knot2 = 90;
AL1 = max(tmin-knot1,0);
AL2 = max(tmin-knot2, 0);
Model rend = b0 + b1 \times tmin + b2 \times AL1 + b3 \times AL2;
Output out = a p=rendi r=Mrend;
Axis order = (0 \text{ to } 4.0 \text{ by } 0.5);
Proc print;
Proc gplot;
Plot Mrend*rendi;
Proc gplot;
Symbol1 value = diamond color = black;
Symbol2 value = star color = red;
Plot1 rend*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Plot2 rendi*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;
```

institute	e, mo. <i>j</i> .										
				Т	he NLI	N Proced	lure				
				Dep	endent	Variabl	e rend				
				Me	ethod: (Gauss-Ne	wton				
					Iterat	ive Pha	se				
											Sum of
Iter	b0	b1	b2		b3		knot1		knot2		Squares
0	0.2033	0.0556	-0.0427	7	-0.0100)	30.0000		90.0000		0.4476
1	0.1466	0.0632	-0.0488	}	-0.0115	5	24.8085		86.7061		0.3389
2	0.0973	0.0698	-0.0541		-0.0128	}	21.9884		84.9564		0.2916
3	0.0900	0.0707	-0.0549)	-0.0130)	21.9225		84.9228		0.2821
4	0.0898	0.0708	-0.0549)	-0.0130)	21.9218		84.9224		0.2821
5	0.0898	0.0708	-0.0549)	-0.0130)	21.9218		84.9224		0.2821
				NOTE: Co Estimati	onverge Lon Sum	nce crit mary	erion met				
				Method			Gauss-	Newtor	า		
				Iteratio	ons			Ę	5		
				Subitera	ations				1		
				Average	Subite	rations		0.2	2		
				R			2	.61E-8	3		
				PPC(b0)			1.	066E-8	3		
				RPC(b0)			0.	00001	1		
				Object			6.	71E-10)		
				Objectiv	/e		0.	282124	1		
				0bservat	tions R	ead		32	2		
				0bservat	tions U	sed		32	2		
				0bservat	tions M	issing		()		
				Sum of		Mean				Approx	(
Source			DF	Squares		Square	F	Value		Pr > F	
Model			5	31.8991		6.3798	58	87.95		<.0001	
Error			26	0.2821		0.0109					
Correc	ted Tota	1	31	32.1812							
				Approx							
Parame	ter	Estimat	te	Std Erro	or	Approxi	mate 95%	Confid	lence Li	mits	
b0		0.0898	3	0.0571		-0.0275		0.2071			
b1		0.0708	3	0.00466		0.0612	. (0.0803			
b2		-0.0549	9	0.00528		-0.0658	- (0.0441			
b3		-0.0130)	0.00251		-0.0182	- (0.0078	5		
knot1		21.9218	3	1.7828		18.2572	25	5.5864			
knot2		84.9224	1	8.5855		67.2746	10	02.6			
				Approxi	mate Co	orrelati	on Matrix				
	b0		b1		b2		b3		knot1	kn	ot2
b0	1,0000	0000	-0.8164	966	0.7200	823	-0.00000	00	0.2689	561-0	000000
b1	-0.8164	4966	1.0000	0000	-0.8819	171	0.000000	0	-0.5673	478 0.	0000000
b2	0.7200	0823	-0.8819	9171	1.0000	0000	-0.467358	8	0.1936	378-0.	3931796
b3	-0.0000	0000	0.0000	0000	-0.4673	588	1.000000	00	0.6450	587 0.	7791192
knot1	0.2689	9561	-0.5673	8478	0.1936	378	0.645058	87	1.0000	000 0.	4186565

Tabela A 55 - Dados	s de saída do	procedimento	PROC NLIN	do software	SAS 9,2	(SAS
Institute, Inc.).						
	^					
---	------	------				
Δ	non	dina				
	DEII	uice				

knot2	-0.000000	0.000	00000	-0.3931796	0.77	91192	0.4186565 1.0000000
	Obs	tmin	rend	AL1	AL2	rendi	Mrend
	1	0	0.00000	0	0	0.08983	-0.08983
	2	5	0.53088	0	0	0.44365	0.08723
	3	10	0.95167	0	0	0.79747	0.15420
	4	15	1.30212	0	0	1.15129	0.15083
	5	20	1.55075	0	0	1.50512	0.04564
	6	30	1.85235	0	0	1.76920	0.08314
	7	40	2.05939	10	0	1.92777	0.13163
	8	50	2.21389	20	0	2.08633	0.12756
	9	70	2.44427	40	0	2.40346	0.04081
	10	90	2.60482	60	0	2.65451	-0.04968
	11	120	2.79530	90	30	2.73980	0.05549
	12	160	2.95967	130	70	2.85353	0.10613
	13	210	3.08395	180	120	2.99569	0.08826
	14	250	3.16313	220	160	3.10942	0.05371
	15	300	3.25103	270	210	3.25158	-0.00054
	16	335	3.31936	305	245	3.35109	-0.03173
	17	0	0.00000	0	0	0.08983	-0.08983
	18	5	0.45622	0	0	0.44365	0.01257
	19	10	0.80690	0	0	0.79747	0.00943
	20	15	1.09242	0	0	1.15129	-0.05887
	21	20	1.28375	0	0	1.50512	-0.22136
	22	30	1.60918	0	0	1.76920	-0.16002
	23	40	1.84853	10	0	1.92777	-0.07924
	24	50	2.03395	20	0	2.08633	-0.05238
	25	70	2.31196	40	0	2.40346	-0.09150
	26	90	2.49519	60	0	2.65451	-0.15931
	27	120	2.69451	90	30	2.73980	-0.04529
	28	160	2.89861	130	70	2.85353	0.04508
	29	210	3.04909	180	120	2.99569	0.05340
	30	250	3.13116	220	160	3.10942	0.02174
	31	300	3.20720	270	210	3.25158	-0.04438
	32	335	3.25822	305	245	3.35109	-0.09287

 t_{CER} (knot1) e t_{FER} (knot2) e rendimentos obtidos experimentalmente (rend) e pelo modelo (rendi): OEC (313 K/20 MPa) de UP2, onde tmin: tempo de extração; rend: rendimento experimental; AL1 e AL2: parâmetros do modelo; rendi: rendimento calculado pelo modelo; Mrend: diferença entre o rendimento experimental e o calculado. *b0*, *b1*, *b2*, e *b3* são coeficientes lineares da equação descrita por Meireles (2008).

Apêndice



Figura A 8 - Dados de rendimento de extrato, em relação a matéria-prima em base seca, por tempo de extração; e equações lineares das retas do ajuste dos dados experimentais (OEC 8 e 9, em 313 K e 20 MPa) ao Spline de três retas: CER – *constant extraction rate*; FER – *falling extraction rate*; DC – *diffusion controlled*.

2.4 MEDIÇÃO DE PROPAGAÇÃO DE ERROS.

A Tabela A56 apresenta o cálculo do erro propagado da porosidade do leito e das partículas na célula de extração para todas as condições de extração estudadas.

Tabela A56 - Dados de densidade aparente e porosidade do leito e das sementes de UP1	
e UP2: parâmetros das IRGs e OECs nas unidades Spe-ed SFE e piloto ^a .	

Densidade real UP1 (kg/m ³) =		1111,4	±	16,2			(σb/b)^2 =	0,000212		
Densi	dade real UF	P2 (kg/m ³) =	1330,0	±	10,0			(σb/b)^2 =	0,000057	
lde	ntificação	Densidade aparente (kg/m ³)	Media	Amplitude	Porosidade	R	(σa/a)^2	(σa/a)^2 + (σb/b)^2	Raiz ((σa/a)^2 + (σb/b)^2)	σR
	313/20	689,10 692,87	690,98	3,77	0,38	0,62	0,00003	0,00024	0,01556	0,01
	313/31	701,79 700,08	700,94	1,71	0,37	0,63	0,00001	0,00022	0,01478	0,01
IRG	313/40	695,96 698,36	697,16	2,40	0,37	0,63	0,00001	0,00022	0,01498	0,01
K/MPa	1333/20	694,59 695,99	695,29	1,40	0,37	0,63	0,00000	0,00022	0,01471	0,01
	333/31	694,59 691,84	693,22	2,75	0,38	0,62	0,00002	0,00023	0,01511	0,01
	333/40	696,30 695,96	696,13	0,34	0,37	0,63	0,00000	0,00021	0,01458	0,01
	OEC12	686,45 686,45	686,45	0,00	0,38	0,62	0,00000	0,00021	0,01458	0,01
OEC (UP1)	OEC45	686,45 686,45	686,45	0,00	0,38	0,62	0,00000	0,00021	0,01458	0,01
	OEC67	655,17 657,41	656,29	2,24	0,41	0,59	0,00001	0,00022	0,01497	0,01
UP2	OEC89	655,17 639,97	647,57	15,21	0,51	0,487	0,00055	0,00061	0,02466	0,012
UP2	OEC1011	655,34 655,52	655,43	0,18	0,507	0,493	0,00000	0,00006	0,00752	0,004
UP2	OECPiloto	677,12 685,48	681,30	8,36	0,49	0,512	0,00015	0,00021	0,01439	0,007
UP2	X0Piloto	669,00 669,00	669,00	0,00	0,50	0,503	0,00000	0,00006	0,00752	0,004

^aToginho Filho, D.O.; Andrello, A.C., 2009 (Anexo).

2.5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE URUCUM (UM - SEMENTES MISTAS)

A seguir estão apresentados os resultados experimentais obtidos de sementes mistas de urucum (UM) que foram extraídas pelo processo de arraste a vapor para obter óleo volátil e que, por isso, foram identificadas por urucum misto sem óleo (UM-SO), e sementes que não passaram pelo processo, ou seja, com óleo (UM-CO). O objetivo foi verificar a influência do óleo volátil na extração de bixina das sementes.

Replicata	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
1	8,71	5,25	2,50	11,27	72,27
2	8,77	5,29	3,25	11,23	71,46
3	8,77	5,08	-	11,28	74,88
Média	8,75	5,21	2,87	11,26	72,87
Desvio	0,04	0,11	0,53	0,03	1,78
Amplitude	0,07	0,21	0,75	0,05	3,42

Tabela A57 - Composição centesimal das sementes de UM-CO - Safra 2010.

Tabela A58 - Composição centesimal das sementes de UM-SO – Safra 2010.

Replicata	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos
1	12,73	4,48	1,75	11,57	69,47
2	12,97	4,81	2,98	11,78	67,47
3	12,63	4,61	-	11,28	71,49
Média	12,78	4,63	2,37	11,54	69,48
Desvio	0,17	0,17	0,86	0,25	2,01
Amplitude	0,34	0,33	1,22	0,50	4,01

Apêndice

Doplicato	Umidade pelo método gravimétrico [%]			Umidade pelo método de destilação [%]		
nepiicala	UM-CO	UM-SO	UP1	UM-CO	UM-SO	UP1
1	6,84	10,19	9,51	11,15	9,15	11,78
2	6,96	9,87	10,32	12,52	9,81	10,41
3	6,94	9,83	9,32	-	-	-
Média	6,92	9,96	9,71	11,83	9,48	11,10
Desvio	0,07	0,20	0,53	0,96	0,46	0,97
Amplitude	0,12	0,37	1,00	1,36	0,66	1,37

Tabela A59 - Análise de umidade das sementes após 12 meses do recebimento da matéria-prima.

A extração com Soxhlet foi determinada usando (5,1851 \pm 0,2) g de sementes inteiras de urucum e éter de petróleo (Synth, Diadema, SP, Brasil), com S/F = 34,7 \pm 1.

Tabela A60 - Caracterização das sementes de urucum misto com	óleo volátil (UM_CO) e
sem óleo volátil – Safra 2010.	

		UM-CO		UM-SO		
Replicata	Diâmetro ^a (mm)	Densidade real (kg/m ³) ^b	Soxhlet semente inteira % b.u.	Diâmetro ^a (mm)	Densidade real (kg/m ³) ^b	
1	-	-	1,49	-	-	
2	-	-	1,59	-	-	
Média	3,9	1396,3	1,54	4,1	1457,9	
Desvio	0,2	1,9	0,07	0,2	30,9	
Amplitude	0,7	-	0,10	1,0	-	

^a Médias de 20 medições, ^b Resultados obtidos de 10 medições,

2.6 CROMATOGRAMAS DA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS

As análises de composição em ácidos graxos foram realizadas em extratos SFE de urucum obtidos quando da determinação das isotermas de rendimento global, no Laboratório de Óleos e Gorduras DTA/FEA/UNICAMP. OS ácidos graxos não foram identificados devido à grande quantidade de picos presentes na amostra, que possivelmente foi o motivo dos diferentes tempos de retenção encontrados. Os extratos apresentaram um perfil de ácidos graxos diferente dos produtos que normalmente era avaliados pelo Laboratório e este não dispunha de padrão analítico para a comparação. A metodologia adotada pelo laboratório foi a oficial da American Oil Chemists' Society AOCS Ce 1c-89, 2004. Os ésteres metílicos foram preparados seguindo metodologia de Hartmann & Lago (1973). Os cromatogramas estão apresentados a seguir.

a File C:\HPCHEM\1	.\DATA\CAGJAN11\18JA	N014.D	5	bampie Name.	
Injection Date : Sample Name : Acq. Operator :	1/18/2011 10:33:42 P 129 - 1 MARCELLA	PM Seq. L Locat	ine : 14 ion : Vial 6 Inj : 1	40) 200
		Inj Vol	\texttt{ume} : 1 $\mu\texttt{l}$		
Acq. Method :	$C: \ HPCHEM \ 1 \ METHOD$	S\CAG2.M M by MARCELLA			
Analysis Method :	C:\HPCHEM\1\METHOD	S\CAG2.M			
Last changed :	5/3/2011 4:47:45 P	M by MARCELLA			
	(modified after lo	ading)			
FIDTA, (CAGJ	ANTI\I6JANU14.D)				
		<u>6</u> . 7 .			
90		50 F3			
80					
-					
70 -		0			
	0				
60 -	Q	048			
	Ö	590.0			
50	.44	2			
-	10	4 C23			
40 -		267			
-		866 559 222	0		
30					
	-	334		0	
	Q 181	81.20 220 220 220 233 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20	8.0	ž	
20-				S (135)	
	93 367 14.2		73.73 .73	68 × 00	
10 -	11.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1.1	11 10 10 10 10 10 10	20 Fr 50 1950	80 Noo	
	hundren up Apply provident	defendente den mar de Martin de Marten and Providente and	Afflitah from	- Mining	
0	10	20	20		
0	10	20	30	40	
				==	
	Area Percen	t Report ====================================		==	
Sorted By	: Signal				
Multiplier	: 1.0000				
Dilution	: 1.0000				
Signal 1. FID1 A					
Peak RetTime Type	Width Area	Height Area			
Peak RetTime Type # [min]	> Width Area [min] [pA*s]	Height Area [pA] %			
Peak RetTime Type # [min]	<pre>Width Area [min] [pA*s]</pre>	Height Area [pA] % 	- 30		
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP	Width Area [min] [pA*s] 	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345	-270		
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12 735 VB	e Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8 95552	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3641	- 0- 7 ~ 6		
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB	e Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821	Height Area [pA] % 	6 1 0		
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV	e Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821 0.0424 5.61965	Height Area [pA] % 			
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP	e Width Area [min] [pA*s] 	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3681 13.86710 1.4347 2.08667 0.2309 5.78801 0.8541		×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 9 13 522 VV	e Width Area [min] [pA*s] 	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3681 13.86710 1.4347 2.08667 0.2309 5.78801 0.8541 40.89244 4.1756		×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB	e Width Area [min] [pA*s] 	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3681 13.86710 1.4347 2.08667 0.2309 5.78801 0.8541 40.89244 4.1756 7.76454 0.9716 2.98575 0.3597	- - - - - - - - - - - - - - - - - - -		
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB 10 13.763 BB	e Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821 0.0424 5.61965 0.0589 20.78329 0.0380 101.59994 0.0445 23.64191 0.0442 8.75226 0.0460 5.63623	Height Area [pA] % 	$ \begin{array}{c} $	×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB 10 13.763 BB 11 14.209 PB	<pre>Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821 0.0424 5.61965 0.0589 20.78325 0.0380 101.59994 0.0445 23.64191 0.0445 23.64191 0.0442 8.75226 0.0460 5.63623 0.0385 16.44302</pre>	Height Area [pA] % 	$ \begin{array}{c} $	×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB 10 13.763 BB 11 14.209 PB 12 16.005 BV	<pre>Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821 0.0424 5.61965 0.0589 20.78329 0.0380 101.59994 0.0445 23.64191 0.0445 23.64191 0.0442 8.75226 0.0460 5.63623 0.0385 16.44302 0.0409 4.10342</pre>	Height Area [pA] % 	$ \begin{array}{c} $	×	
Peak RetTime Type # [min] 	<pre>Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821 0.0424 5.61965 0.0589 20.78329 0.0380 101.59994 0.0445 23.64191 0.0445 23.64191 0.0442 8.75226 0.0385 16.44302 0.0385 16.44302 0.0385 16.44302 0.0386 4.29834 0.0386 4.29834</pre>	Height Area [pA] % 	$ $	×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB 10 13.763 BB 11 14.209 PB 12 16.005 BV 13 17.756 BP 14 17.907 BB 15 18.237 RB	<pre>Width Area [min] [pA*s] - 0.0413 8.13880 0.0564 9.44939 0.0410 8.95652 0.0394 34.90821 0.0424 5.61965 0.0589 20.78329 0.0380 101.59994 0.0445 23.64191 0.0445 23.64191 0.0445 23.64191 0.0442 8.75226 0.0385 16.44302 0.0385 16.44302 0.0385 4.29834 0.0472 19.38691 0.0461 15 88616</pre>	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3681 13.86710 1.4347 2.08667 0.2309 5.78801 0.8541 40.89244 4.1756 7.76454 0.9716 2.98575 0.3597 1.82879 0.2316 6.49377 0.6757 1.60145 0.1686 1.75575 0.1766 5.92811 0.7967 5.13375 0.6529	$ $	×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB 10 13.763 BB 11 14.209 PB 12 16.005 BV 13 17.756 BP 14 17.907 BB 15 18.237 BB 16 18.512 BB	e Width Area [min] [pA*s] 	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3681 13.86710 1.4347 2.08667 0.2309 5.78801 0.8541 40.89244 4.1756 7.76454 0.9716 2.98575 0.3597 1.82879 0.2316 6.49377 0.6757 1.60145 0.1686 1.75575 0.1766 5.92811 0.7967 5.13375 0.6529 2.93389 0.3128	$ $	×	
Peak RetTime Type # [min] 1 9.293 BP 2 11.867 BB 3 12.735 VB 4 12.871 BB 5 13.040 BV 6 13.234 VP 7 13.443 BV 8 13.522 VV 9 13.630 VB 10 13.763 BB 11 14.209 PB 12 16.005 BV 13 17.756 BP 14 17.907 BB 15 18.237 BB 16 18.512 BB 17 18.933 BB	e Width Area [min] [pA*s] 	Height Area [pA] % 3.13268 0.3345 2.37642 0.3883 3.36593 0.3681 13.86710 1.4347 2.08667 0.2309 5.78801 0.8541 40.89244 4.1756 7.76454 0.9716 2.98575 0.3597 1.82879 0.2316 6.49377 0.6757 1.60145 0.1686 1.75575 0.1766 5.92811 0.7967 5.13375 0.6529 2.93389 0.3128	$ $		

Equipamento 1 5/3/2011 4:51:48 PM MARCELLA

Apêndice

Peak #	RetTim [min]	е Туре	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
19	19 82	-	0.0257			
20	21 29		0.0357	3.49956	1.52820	0.14383040
21	21.20	ים ג מם ג	0.0335	32.47818	14.83365	1.33482
22	22 11	7 BD	0.0345	20.55402	9.41616	0.84475
23	22 56		0.0377	14.40919	6.07652	0.59221
2.4	22.50		0.0333	63.40147	29.25309	2.60574
25	22.050		0.0357	5.98775	2.61922	0.24609
26	22.703		0.0402	20.53994	7.93770	0.84417
27	23 055		0.0351	22.17842	9.91473	0.91151
28	23.057	VP VD	0.0357	4.21308	1.90964	0.17315
29	23.135		0.0338	49.73019	23.40133	2.04387
30	23.420	PV	0.0430	5.65659	2.00153	0.23248
31	23.004		0.0620	9.31378	2.13199	0.38279
32	23.910	1717	0.0385	453.48962	185.66583	18.63803
33	23.397	1717	0.0460	5.14103	1.57979	0.21129
34	24.133		0.0553	8.84059	2.49436	0.36334
35	24.090		0.0389	3.41983	1.46349	0.14055
36	25.195	PP	0.0343	10.04144	4.62943	0.41269
37	26.046	VV	0.0339	99.81706	46.72647	4.10239 🕻 😼 🔵
30	20.100	VP	0.0352	50.09507	22.29470	2.05886
30	20.390	VV	0.0357	24.75577	10.80971	1.01744
40	26.510	VV	0.0403	766.56854	277.09241	31.50529010
41	20.024	VV	0.0392	87.96235	34.01883	3.61518
42	20.714		0.0387	43.10358	17.49850	1.77152
42	27.234	BV	0.0424	37.18268	13.38165	1.52818
4.5	27.311	VP ·	0.0361	9.61733	4.13371	0.39526
44	27.434	BV	0.0358	68.58475	29.86102	2.81877018
45	27.552	VV	0.0361	9.74482	4.20241	0.40050
40	27.720	VB	0.0379	21.25260	8.89870	0.87346
4 /	20.507	PP	0.0382	35.29626	14.61648	1.45065083
40	29.223	VP	0.0414	26.77767	10.28983	1.10054
49	29.794	BP	0.0469	6.20572	1.96127	0.25505(20)
50	30.244	BB	0.0441	4.43636	1.61350	0.18233
51	30.454	Bb	0.0456	16.81865	5.83272	0.69123
52	30.666	BV	0.0450	13.02454	4.46577	0.53530
53	30.808	VB	0.0472	37.79268	12.51036	1.55325
54	31.738	BB	0.0515	8.89911	2.62564	0.36575
55	33.142	MM	0.0596	4.67375	1.30590	0.19209022
56	38.789	MM	0.0987	4.06735	6.86798e-1	0.16716 CJU

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\CAGJAN11\18JAN014.D

Totals :

2433.14198 951.08853

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

quipamento 1 5/3/2011 4:51:48 PM MARCELLA

Page 2 of 2

Sample Name: P 129 - 1



Sorted By	:	Signal
Multiplier	:	1.0000
Dilution	:	1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	9.295	BP	0.0410	5.33757	2.07299	0.23361
2	11.869	BB	0.0545	8.97264	2.35334	0.39270
3	12.737	VB	0.0422	8.41572	3.14422	0.36833
4	12.873	BB	0.0395	33.15459	13.13384	1.45107
5	13.041	BV	0.0422	5.28075	1.97215	0.23112
6	13.236	VP	0.0582	19.73184	5.44987	0.86360
7	13.444	BV	0.0394	97.62612	38.76421	4.27278
8	13.523	VV	0.0444	23.54086	7.75473	1.03031
9	13.632	VB	0.0441	8.06931	2.76414	0.35317
10	13.765	BB	0.0472	5.53362	1.78187	0.24219
11	14.211	PB	0.0393	15.40180	6.14139	0.67409
12	16.006	BV	0.0396	4.03769	1.59323	0.17672
13	17.757	BP	0.0384	4.01154	1.64966	0.17557
14	17.907	BB	0.0474	17.29304	5.38788	0.75686
15	18.238	BB	0.0453	15.11791	4.99834	0.66166
16	18.513	PB	0.0373	7.64118	3.14928	0.33443
17	18.934	BP	0.0389	18.94880	7.65959	0.82933
18	19.610	PB	0.0395	7.90926	3.12992	0.34616

Equipamento 1 5/3/2011 4:52:40 PM MARCELLA

Peak	RetTime	e Type	Width	Area	Hojoht	7)
#	[min]	11-	[min]	[nA*s]	[p]	Area
				[PA 5]	[pA]	8
19	19.824	BB	0.0350	3 53921	1 52100	0 15400
20	21.299	BV	0.0335	31 52078		0.15490
21	21.993	BB	0.0331	19 85098		1.3/956
22	22.118	BP	0.0364	13,90372	5 91027	0.86881
23	22.568	PV	0.0339	62.04701	29 09226	0.60852
24	22.658	VV	0.0354	6.06372	2 67496	2.71560
25	22.770	VP	0.0390	16 77701	6 52669	0.26539
26	22.962	BV	0.0347	22 36424	9 79969	0.73428
27	23.058	VP	0.0342	4 01599	1 95904	0.97881
28	23.159	VP	0.0328	45 53676	21 40000	0.1/5//
29	23.422	PV	0.0440	5 28848	1 97099	1.99300
30	23.672	BV	0.0640	8 55718	1 95657	0.23146
31	23.917	VV	0.0356	399 54367	168 66900	0.37452
32	24.141	VV	0.0547	7 42935	2 12121	17.48675
33	24.697	MM	0.0359	2 88198	1 22006	0.32516
34	25.196	VV	0.0353	9 01421	1.33096	0.12614
35	26.049	VV	0.0342	99 22811	45 03600	0.39452
36	26.165	VP	0.0351	45 88707	45.55609	4.34290
37	26.396	vv	0.0353	22 64694	10 02961	2.00833
38	26.508	vv	0.0431	724 88953	263 55225	0.99118
39	26.624	VV	0.0392	83.06800	32 06283	31.72610
40	26.713	VV	0.0384	41.80666	17 17100	1 02074
41	27.237	VV	0.0485	38.87020	11 77022	1.029/4
42	27.311	VV	0.0401	11.77979	4 41452	0 51556
43	27.433	VB	0.0373	64.35268	26 57412	2 91651
44	27.552	BV	0.0373	9,91390	4 08071	2.01051
45	27.721	VB	0.0382	20.43994	8 45106	0.43390
46	28.507	BP	0.0384	33.03739	13 56356	1 44504
47	29.223	VP	0.0402	25,20524	9 72922	1 10015
48	29.794	BP	0.0473	6.03671	1 94031	1.10315
49	30.244	PB	0.0403	4.56370	1 754031	0.20421
50	30.453	BP	0.0449	17 29524	I.75493	0.19974
51	30.667	BV	0.0470	13 59251	J.JJJJZ 4 E2112	0.75696
52	30.807	VB	0.0467	39.07439	12 77007	0.59490
53	31.738	BB	0.0510	8 25154	2 16664	1./1016
54	33.141	MM	0.0654	5 35005	4.40064	0.36114
55	38.792	MM	0.1091	5 1 9747	1.30366	0.23419
			0.1091	5.18/4/	/.92635e-1	0.22704

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\CAGJAN11\18JAN016.D

Totals :

2284.83651 894.73139

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Equipamento 1 5/3/2011 4:52:40 PM MARCELLA

Page 2 of 2

Sample Name: P 130 - 1



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	9.314	BP	0.0397	4.38995	1.72203	0.24980
2	11.889	BB	0.0541	6.72370	1.73935	0.38260
3	12.756	VB	0.0412	6.65019	2.48787	0.37841
4	12.892	BB	0.0392	26.22447	10.48602	1.49224
5	13.059	BV	0.0407	4.08549	1.55489	0.23247
6	13.255	VP	0.0576	14.96167	4.19727	0.85136
7	13.462	BV	0.0377	74.90913	30.40074	4.26252
8	13.541	VV	0.0443	17.69353	5.84354	1.00681
9	13.650	VB	0.0437	6.32327	2.18899	0.35981
10	14.228	PB	0.0398	11.90171	4.66288	0.67724
11	17.921	BB	0.0470	14.80840	4.54888	0.84264
12	18.251	BB	0.0456	11.52183	3.77920	0.65562
13	18.524	PB	0.0392	6.11326	2.44076	0.34786
14	18.946	BB	0.0387	14.68279	5.95897	0.83549
15	19.621	BB	0.0395	6.25154	2.46842	0.35573
16	21.306	BV	0.0336	23.31946	10.63012	1.32694
17	21.999	BB	0.0345	14.63870	6.70894	0.83298
18	22.125	BP	0.0367	10.41818	4.38686	0.59282

Equipamento 1 5/3/2011 4:53:12 PM MARCELLA

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\CAGJAN11\19JAN001.D

Peak	RetTime	Type	Width	Area	Height	Area
#	[min]	11	[min]	[pA*s]	[pA]	80
			-			
19	22.574	BV	0.0329	44.89206	21.00904	2.55447
20	22.664	vv	0.0341	4.05371	1.81272	0.23067
21	22.775	VB	0.0395	16.38776	6.26189	0.93250
22	22.968	BV	0.0340	15.24924	6.84213	0.86772
23	23.164	VP	0.0326	38.68518	18.36379	2.20128
24	23.428	PV	0.0420	4.16571	1.51795	0.23704
25	23.668	BB	0.0726	8.64498	1.63719	0.49192
26	23.918	BV	0.0351	334.59695	143.92937	19.03941
27	24.137	VB	0.0525	6.12207	1.85368	0.34836
28	24.700	MM	0.0358	2.22616	1.03567	0.12667
29	25.200	BV	0.0346	8.23218	3.74925	0.46843
30	26.050	BP	0.0327	70.82668	33.39366	4.03022
31	26.167	BB	0.0345	38.58386	17.65624	2.19552
32	26.401	VV	0.0347	17.28248	7.83474	0.98342
33	26.503	VV	0.0377	551.29077	216.87595	31.36984
34	26.624	VV	0.0395	64.54735	25.54063	3.67291
35	26.712	VP	0.0381	29.63583	12.29420	1.68635
36	27.234	BV	0.0413	27.63757	10.30658	1.57265
37	27.316	VV	0.0387	7.85930	3.09176	0.44721
38	27.435	VP	0.0368	53.19222	22.34646	3.02677
39	27.555	BV	0.0357	6.64279	2.89736	0.37799
40	27.723	VB	0.0373	14.69522	6.27599	0.83620
41	28.509	PP	0.0385	27.20808	11.14669	1.54821
42	29.225	VP	0.0417	21.32992	8.10049	1.21373
43	29.797	BP	0.0453	4.46958	1.56646	0.25433
44	30.456	BP	0.0451	11.61529	4.09406	0.66094
45	30.668	BV	0.0460	9.05774	3.11028	0.51541
46	30.811	VB	0.0479	26.14576	8.49406	1.48776
47	31.740	BB	0.0509	7.19238	2.10538	0.40926
48	33.144	MM	0.0688	4.92755	1.19302	0.28039
49	38.790	MM	0.1103	4.37761	6.61665e-1	0.24910

Totals :

1757.39122 713.20412

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Equipamento 1 5/3/2011 4:53:12 PM MARCELLA

Page 2 of 2



Area Percent Report

Sorted By	:	Signal
Multiplier	:	1.0000
Dilution	:	1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak	RetTime	Туре	Width	Area	Height	Area
#	[min]		[min]	[pA*s]	[pA]	8
1	9.298	MM	0.0414	2.61327	1.05127	0.13139
2	11.872	BB	0.0536	6.37907	1.70528	0.32072
3	12.740	VB	0.0413	6.03894	2.24883	0.30362
4	12.876	BB	0.0393	24.05584	9.57234	1.20946
5	13.043	BV	0.0419	4.04712	1.53010	0.20348
6	13.239	VP	0.0590	14.51022	4.02990	0.72953
7	13.446	BV	0.0383	71.97205	28.66667	3.61856
8	13.525	VV	0.0436	18.81409	6.33527	0.94592
9	13.634	VB	0.0436	6.15971	2.07617	0.30969
10	14.212	PB	0.0399	10.74004	4.19528	0.53998
11	16.007	MM	0.0434	3.18716	1.22415	0.16024
12	17.908	BB	0.0472	12.10489	3.79365	0.60860
13	18.239	BB	0.0463	10.35814	3.32598	0.52078
14	18.513	PB	0.0386	5.83080	2.29492	0.29316
15	18.934	BB	0.0388	12.82075	5.19986	0.64459
16	19.609	BB	0.0391	6.85456	2.74694	0.34463
17	21.298	BV	0.0345	27.79653	12.73116	1.39753
18	21.992	BB	0.0343	17.85672	8.24680	0.89779

Equipamento 1 5/3/2011 4:53:49 PM MARCELLA

Sample Name: P 132 - 1

Data Fil	e C:\HPC	CHEM\1\DATA	\CAGJAN11\	19JAN003.D
----------	----------	-------------	------------	------------

Deak	RetTime	Type	Width	Area	Height	Area
#	[min]	-16-	[min]	[pA*s]	[pA]	8.
			-			
19	22.116	BP	0.0365	13.14804	5.58233	0.66105
2.0	22.566	BV	0.0341	56.88745	26.44422	2.86014
21	22.656	VV	0.0344	5.86912	2.58880	0.29508
22	22.768	VP	0.0382	15.08016	6.03428	0.75819
23	22,960	BV	0.0342	21.39263	9.53461	1.07556
2.4	23.056	VP	0.0344	3.89899	1.78798	0.19603
25	23.157	VB	0.0331	39.66176	18.46313	1.99408
26	23.420	PV	0.0430	4.43923	1.61737	0.22319
27	23.665	BV	0.0618	7.15755	1.64509	0.35986
28	23.912	VV	0.0362	347.82602	149.18803	17.48774
29	24.136	VB	0.0573	5.92477	1.59465	0.29788
30	24.695	MM	0.0357	2.32528	1.08418	0.11691
31	25.194	vv	0.0364	8.13902	3.59679	0.40921
32	26.046	vv	0.0332	94.24554	43.66463	4.73841
33	26.163	VP	0.0363	39.57283	17.55442	1.98961
34	26.395	vv	0.0350	18.04063	8.08389	0.90703
35	26.504	VV	0.0402	662.16699	247.32098	33.29193
36	26.622	vv	0.0399	77.17339	30.10385	3.88007
37	26.710	vv	0.0384	39.12437	16.07709	1.96707
38	27.232	vv	0.0493	33.08076	10.08377	1.66321
39	27.310	VV	0.0391	9.93776	3.85305	0.49964
40	27.431	VB	0.0367	54.53289	22.95689	2.74176
41	27.550) BV	0.0377	8.50303	3.58060	0.42751
42	2 27.718	B VB	0.0388	18.80055	7.61796	0.94524
43	3 28.504	PP	0.0384	26.77809	11.01867	1.34633
44	1 29.220	VP	0.0413	20.97541	8.06484	1.05459
4	5 29.791	L BP	0.0492	5.15450	1.57424	0.25915
46	5 30.243	L BP	0.0422	4.68837	1.75033	0.23572
4	7 30.452	2 BP	0.0446	16.53214	5.73649	0.83119
48	B 30.662	2 BV	0.0462	13.00009	4.43937	0.65361
4	9 30.80	5 VB	0.0477	37.33047	12.19678	1.87687
5	0 31.73	3 BB	0.0523	7.42510	2.14873	0.37331
5	1 33.13	3 MM	0.0581	3.76803	1.08181	0.18945
5	2 38.77	9 MM	0.1056	4.25033	6.70916e-1	0.21369

Totals :

1988.97122 789.71531

Equipamento 1 5/3/2011 4:53:49 PM MARCELLA

Page 2 of 2

Apêndice



Peak	RetTime	Туре	Width	Area	Height	Area
#	[min]		[min]	[pA*s]	[pA]	8
1	9.294	BP	0.0408	4.10171	1.60667	0.32969
2	12.735	BP	0.0478	5.08809	1.57237	0.40897
3	12.871	VB	0.0393	16.65450	6.63455	1.33866
4	13.233	VP	0.0575	10.03197	2.81823	0.80635
5	13.441	BV	0.0391	47.72266	19.11743	3.83587
6	13.521	VV	0.0444	11.79642	3.88564	0.94818
7	14.208	PB	0.0386	8.13214	3.20700	0.65365
8	16.003	MM	0.0417	1.90869	7.63167e-1	0.15342
9	17.903	BB	0.0463	9.21530	2.87971	0.74071
10	18.234	PB	0.0454	6.92675	2.28326	0.55676
11	18.508	PB	0.0386	4.15664	1.63774	0.33410
12	18.930	BP	0.0390	9.18864	3.69654	0.73857
13	19.605	BB	0.0397	4.39793	1.72531	0.35350
14	21.293	BV	0.0333	16.91649	7.80765	1.35972
15	21.987	BB	0.0333	10.92144	5.03633	0.87785
16	22.112	BP	0.0367	7.52651	3.16780	0.60497
17	22.561	BV	0.0341	33.56854	15.61326	2.69818
18	22.764	VP	0.0400	10.67775	4.02481	0.85826

Equipamento 1 5/3/2011 4:54:34 PM MARCELLA

Peak # 	RetTime [min]	Туре	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40	22.955 23.152 23.902 24.690 25.189 26.039 26.156 26.391 26.485 26.485 26.610 26.699 27.213 27.304 27.2425 27.545 27.712 28.497 29.212 30.443 30.654 30.795 33.131	BV WB BV BV BP BB PV VV VV VV VV VV BV VB BP BV VB BB BV VB BB BV VB BB BV VB BV BV	0.0345 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0341 0.0328 0.0374 0.0374 0.0463 0.0463 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0351 0.0363 0.0351 0.0351 0.0363 0.0351 0.0363 0.0351 0.0363 0.0351 0.0363 0.0363 0.0351 0.0363 0.0363 0.0351 0.0363 0.0363 0.0363 0.0363 0.0363 0.0363 0.0363 0.0364 0.0364 0.0462 0.0462 0.0462 0.0462 0.0462 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0463 0.0351 0.0374 0.0374 0.0364 0.0462 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.0462 0.0463 0.0463 0.0462 0.0463 0.04	$\begin{array}{c} 11.40384\\ 29.38819\\ 244.75223\\ 2.00832\\ 5.43881\\ 52.54645\\ 27.76270\\ 10.26936\\ 405.71057\\ 48.17586\\ 21.71250\\ 24.29041\\ 6.60981\\ 41.85620\\ 5.00612\\ 10.69937\\ 21.86117\\ 15.50580\\ 8.53660\\ 6.63093\\ 19.12562\\ 2.71199\\ \end{array}$	5.01495 13.91272 109.36057 8.66817e-1 2.43428 24.91823 12.89312 4.82341 166.94835 19.08743 8.90998 7.80383 2.36678 17.89720 2.23778 4.56486 8.57324 5.71357 2.92777 2.25896 6.19195 7.75789e-1	0.91662 2.36217 19.67277 0.16143 0.43716 4.22360 2.23152 0.82543 32.61033 3.87229 1.74521 1.95242 0.53129 3.36433 0.40238 0.86000 1.75716 1.24633 0.68616 0.53298 1.53729 0.21799
Total	s :		0.1033	3.18153	5.13561e-1	0.25573

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\CAGJAN11\19JAN005.D

1244.11655 518.47263

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

quipamento 1 5/3/2011 4:54:34 PM MARCELLA

Page 2 of 2

Sample Name: P 133 - 1

Apêndice



Equipamento 1 5/3/2011 4:55:06 PM MARCELLA

Peak Ret # [m 	Time Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
19 23 20 23 21 24 22 25 23 26 24 26 25 26 26 26 27 26 28 26 29 27 30 27 32 27 33 27 34 28 35 29 36 30 37 30 38 30 39 33	.153 VB .894 BP .689 MM .190 PV .039 BB .155 BB .391 VV .483 VV .610 VV .607 VV .200 BV .304 VB .424 BP .544 BP .712 PB .498 PB .213 VP .444 BP .655 BV .798 VB	0.0337 0.0343 0.0479 0.0353 0.0349 0.0349 0.0349 0.0322 0.0356 0.0403 0.0374 0.0436 0.0380 0.0368 0.0342 0.0364 0.0391 0.0413 0.0455 0.0457 0.0491	$\begin{array}{c} 23.83238\\ 139.03519\\ 2.07607\\ 3.80908\\ 58.24677\\ 23.27686\\ 9.24536\\ 358.65512\\ 46.61215\\ 22.65353\\ 12.07308\\ 4.78271\\ 34.34079\\ 4.00046\\ 9.12505\\ 16.76228\\ 11.30389\\ 11.30389\\ 11.39214\\ 9.11841\\ 26.20997\\ 2.6559\\ 22.65353\\ 22.6553\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.6552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 22.65552\\ 2$	$\begin{array}{c}$	$\left \begin{array}{c} 2.28898\\ 13.35362\\ 0.19940\\ 0.36584\\ 5.59431\\ 2.23562\\ 0.88797\\ 34.44701\\ 4.47686\\ 2.17576\\ 1.15956\\ 0.45935\\ 3.29826\\ 0.38422\\ 0.87641\\ 1.60993\\ 1.08568\\ 1.09416\\ 0.87578\\ 2.51733\\ \end{array}\right.$
40 38	.769 MM	0.0653	2.61504	6.67371e-1 4 55527e-1	0.25116
Totals :			1041.17936	438.53856	0.30152

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\CAGJAN11\19JAN007.D

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Equipamento 1 5/3/2011 4:55:06 PM MARCELLA

Page 2 of 2

Sample Name: P 134 - 1

Apêndice



Equipamento 1 5/3/2011 4:56:04 PM MARCELLA

Satu File C:\HPCHEM\1\DATA\CAGJAN11\19JAN009.D

Sample Name: P 135 - 1

Peak RetTime T # [min] 19 28.499 BF 20 29.216 MM 21 30.800 BF 22 33.139 MM 23 38.784 MM	ype Width [min]	Area [pA*s] 5.17059 3.24062 6.01924 1.62556 1.63589	Height [pA] 2.07134 1.10782 2.00926 2.71278e-1 1.50309e-1	Area % 1.70522 1.06873 1.98509 0.53609 0.53950	
Totals :		303.22200	131.88334		
Results obtain =======	ed with enh	anced integ ====================================	grator! ====================================	=======	

Juipamento 1 5/3/2011 4:56:04 PM MARCELLA

Page 2 of 2

ANEXOS



This information is believed to be accurate and represents the best information currently available to us. However we make no warranty of merchantability or any other warranty, express or implied, with respect to such information, and we assume no liability resulting from its use. Users should make their own investigation to determine the suitability of the information for their own particular purposes.

SECTION 2: COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS

Ingredients Name	Percent (%)	CAS Number
Total Tocotrienols		
- d-Alpha-Tocotrienol		58864-81-6
- d-Beta-Tocotrienol	24.0	490-23-3
- d-Gamma-Tocotrienol		14101-61-2
- d-Delta-Tocotrienol		25612-59-3
d-Alpha-Tocopherol	6.5	59-02-9
Plant Squalene	6.0	111-02-4
Mixed Carotenoid Complex predominantly beta-carotene	0.03	7235-40-7
Sterol Complex predominantly beta-sitosterol	2.1	83-46-5
RBD Palm Olein (Monoglyceride/Diglyceride/Triglyceride)	61.37	Not Noted

Remark: The above data is average analytical results accumulated over the past yea

Molecular Formula &	d-Gamma-Tocotrienol	C28H42O2	410
Molecular Weight	d-Delta-Tocotrienol	C27H40O2	396
	d-Beta-Tocotrienol	C28H42O2	410
	d-Alpha-Tocotrienol	C29H44O2	424
	d-Alpha-Tocopherol	C29H50O2	430
someric Forms Approximately 22% typical tocopherols and 78% tocotrier		ols	

Lot 56442, 7¹/₂ Mile, Jalan Ipoh/Chemor, 31200 Chemor, Perak, Malaysia. Tel: +60(5) 201 4192 Fax: +60(5) 201 4213 Homepage: www.carotech.net E-mail: info@carotech.net



Medição e propagação de erros

1 – Sistema de unidades padrão

Para facilitar o comércio internacional, diversos países criaram padrões comuns para medir grandezas através de um acordo internacional.

A 14^a Conferência Geral sobre Pesos e Medidas (1971) elegeu as *sete grandezas físicas fundamentais*, que constituem a base do Sistema Internacional de Unidades (SI): comprimento, massa, tempo, intensidade de corrente elétrica, temperatura, quantidade de matéria e intensidade luminosa.

- metro [m]: unidade de comprimento. É o comprimento do trajeto percorrido pela luz no vácuo durante um intervalo de tempo de 1/299.792.458 de segundo.
- *quilograma* [kg]: unidade de massa. É a massa do protótipo internacional do quilograma existente no Instituto Internacional de Pesos e Medidas em Sévres, na França.
- segundo [s]: unidade de tempo. É a duração de 9.192.631.770 períodos da radiação correspondente à transição entre dois níveis hiperfinos do estado fundamental do átomo de césio-133.
- *ampére* [A]: unidade de corrente elétrica. É a intensidade de uma corrente elétrica constante que, mantida em dois condutores paralelos, retilíneos, de comprimento infinito, de secção circular desprezível e situados à distância de um metro entre si, no vácuo, produz entre esses dois condutores uma força igual a 2x10⁻⁷ newton por metro de comprimento.
- *kelvin* [K]: unidade de temperatura termodinâmica. É a fração 1/273,16 da temperatura termodinâmica do ponto tríplice da água.
- *mol* [*mol*]: unidade de quantidade de matéria. É a quantidade de matéria de um sistema contendo tantas entidades elementares quantos átomos existem em 0,012 quilogramas de carbono-12.
- candela [cd]: unidade de intensidade luminosa. É a intensidade luminosa, numa dada direção de uma fonte que emite uma radiação monocromática de freqüência 540x10¹² hertz (1 hertz = 1 /segundo) e cuja intensidade energética nessa direção é de

1/683 watts (1 Watt = 1 Joule /segundo) por esferoradiano.

2 – Medições

É conveniente definir o significado dos termos *medição*, *medida(s)*, *dados experimentais* e *resultados experimentais*.

- Medição é o ato ou efeito de medir
- Medida é o termo usado para se referir ao valor numérico (e unidade padrão) resultante de uma dada medição
- *Dados experimentais* são os valores obtidos nas medições diretas
- Resultados Experimentais são, geralmente, os valores obtidos após serem realizados cálculos com os dados experimentais.

Os *resultados experimentais* podem ser obtidos de duas maneiras: através de *medições diretas* ou de *medições indiretas*.

3 – Incertezas de uma medida

Um dos princípios básicos da física diz: "Não se pode medir uma grandeza física com precisão absoluta", ou seja, "qualquer medição, por mais bem feita que seja, é sempre aproximada".

De acordo com o princípio descrito no parágrafo anterior, o valor medido nunca representa o *valor verdadeiro* da grandeza, pois este nunca é conhecido com total certeza. Quando este resultado (número e unidade) vai ser aplicado ou registrado é necessário saber com que *confiança* se pode dizer que o número obtido representa a grandeza física. O valor medido ou o resultado deve ser expresso com a *incerteza da medida*, utilizando uma representação em uma linguagem universal, fazendo com que seja compreensível a outras pessoas.

Chama-se *valor verdadeiro* ou *valor do mensurando* ao valor que seria obtido se a medição da grandeza fosse feita de maneira perfeita e com instrumentos perfeitos.

Por isso, deve-se necessariamente associar um *erro* ou *desvio* ao valor de qualquer medida.

É importante salientar que a palavra *erro* não tem, aqui, o significado de distração, descuido ou engano,

Toginho Filho, D. O., Andrello, A.C., Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física • Universidade Estadual de Londrina, Março de 2009.



Medição e propagação de erros

pois estes podem ser evitados, enquanto o *erro experimental* não pode ser evitado, mesmo nas medições mais precisas.

4 – Algarismos significativos

Ao expressar uma medida é necessário saber expressar o número de algarismos com que se pode escrever tal medida, a unidade e o grau de confiança do valor expresso, ou seja, é necessário incluir uma *primeira estimativa de incerteza*. O erro de uma medida é classificado como incerteza do tipo *A* ou incerteza do tipo *B*. A incerteza obtida a partir de várias medições é chamada de *incerteza padrão do tipo A*, que é o desvio padrão determinado por métodos estatísticos. A incerteza estimada em uma única medição é classificada como *incerteza padrão tipo B*, que é a incerteza obtida por qualquer método que não seja estatístico.

Um exemplo da incerteza do tipo B é apresentado na Figura 1, medida obtida com uma única medição do comprimento S de um lápis, utilizando uma régua com menor divisão em mm.



Figura 1 - Medição do comprimento de um lápis utilizando uma régua com escala de 1 mm.

A incerteza pode ser estimada como sendo a *metade da menor divisão da escala* do equipamento utilizado. A estimativa da incerteza é uma avaliação visual, podendo ser considerada uma fração da menor divisão da escala, feita mentalmente por quem realiza a medição.

A medida do comprimento do lápis, obtida na Figura 2 é:

$$S = 5,75 \pm 0,05 \ cm$$

O resultado é apresentado com três algarismos significativos. A incerteza ou erro na medida é representado pelo termo 0,05 cm ou 0,5 mm, que é a metade da menor divisão da escala do equipamento.

Este procedimento só pode ser adotado quando houver segurança de quem realiza a medição, ao avaliar visualmente uma casa decimal a mais que a descrita na escala do equipamento. Caso contrário a incerteza deve ser considerada a menor divisão da escala do equipamento.

Os algarismos significativos do comprimento do lápis são representados por algarismos corretos e pelo primeiro algarismo duvidoso, de acordo com a descrição abaixo:

algarismos	= algarismos	+ primeiro algarismo
significativos	corretos	duvidoso
\downarrow	\downarrow	\downarrow
5,75	5 , 7 5	5,7 5

5 – Operações aritméticas

Medidas devem ser escritas com o número correto de algarismos significativos, omitindo todos os algarismos sobre os quais não se tem informação. Ao efetuar alguma operação com tais números, não se deve escrever algarismos sem significado. A seguir são apresentados exemplos e regras simples para operações aritméticas com números que representem medidas.

A adição ou subtração de números que possuem algarismos significativos é feita com o alinhamento das casas decimais, sendo completados com zero, da mesma forma que em uma operação aritmética de soma e subtração convencional. Ao final da operação, o número de algarismos significativos do resultado é o mesmo do elemento somado com menor precisão. Consideremos como exemplo a adição dos seguintes valores de comprimento: 83mm + 83,4mm + 83,52mm. Os valores são organizados da seguinte maneira:

83	mm
83,4	mm
83,52	mm
	_
249,92	mm

O resultado desta operação é 250 mm.

A multiplicação ou divisão de números com algarismos significativos também deve ser feita como na forma. No resultado final o número de algarismos

Toginho Filho, D. O., Andrello, A.C., Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física • Universidade Estadual de Londrina, Marco de 2009.



significativos do produto ou da divisão de dois ou mais números (medidas) deve ser igual ao número de algarismos significativos do fator menos preciso.

Consideremos como exemplo, a multiplicação dos valores dos comprimentos 83,4 mm e 83 mm. A operação é escrita como:

 $\begin{array}{c} 83,4 \text{ mm} \\ \underline{x \ 83} \text{ mm} \\ 02 \ 5 \ 0 \ 2 \\ \underline{6 \ 6 \ 7 \ 2} \\ 6 \ 9 \ 2 \ 2,2 \end{array}$

O resultado da operação é 69 x 10^{2} mm² ou ainda $6,9x10^{3}$ mm².

6 - Regras de arredondamento

O arredondamento dos números é feito de acordo com as seguintes regras:

- Os algarismos 1,2,3,4 são arredondados para baixo, isto é, o algarismo precedente é mantido inalterado. Por exemplo: 3,14 e 2,73 são arredondados para 3,1 e 2,7 respectivamente.
- Os algarismos 6,7,8,9 são arredondados para cima, isto é, o algarismo precedente é aumentado de 1. Por exemplo: 3,16 e 2,78 são arredondados para 3,2 e 2,8 respectivamente.

Para o algarismo 5 é utilizada a seguinte regra: 5 é arredondado para baixo sempre que o algarismo precedente for par e, é arredondado para cima sempre que o algarismo precedente for impar. Por exemplo: 4,65 e 4,75 são arredondados para 4,6 e 4,8 respectivamente.

7 – Erros ou desvios

Os erros podem ser classificados em dois grandes grupos: *erros sistemáticos* ou erros *aleatórios*.

Os *erros sistemáticos* são aqueles que resultam das discrepâncias observacionais persistentes, tais como erros de paralaxe. Os erros sistemáticos ocorrem principalmente em experimentos que estão sujeitos a mudanças de temperatura, pressão e umidade. Estas mudanças estão relacionadas a condições ambientais. Os *erros sistemáticos* podem e devem ser eliminados ou minimizados pelo experimentador. Isso pode ser feito, observando se os instrumentos estão corretamente

ajustados e calibrados, e ainda se estão sendo usados de forma correta na interligação com outros instrumentos, na montagem experimental.

Existe um limite abaixo do qual não é possível reduzir o erro sistemático de uma medição. Um destes erros é o de calibração, diretamente associado ao instrumento com o qual se faz a medição. Este tipo de erro é também chamado *erro sistemático residual*. Geralmente, o erro de calibração (residual) vem indicado no instrumento ou manual, pelo fabricante; é o limite dentro do qual o fabricante garante os erros do instrumento.

Os *erros aleatórios* (ou estatísticos) são aqueles que ainda existem mesmo quando todas as discrepâncias sistemáticas num processo de mensuração são minimizadas, balanceadas ou corrigidas. Os *erros aleatórios* jamais podem ser eliminados por completo.

6 - Desvio padrão amostral e populacional

Define-se *desvio padrão amostral* ou *desvio médio quadrático*, a raiz quadrada da variância amostral, descrita pela relação:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \qquad (1)$$

O valor de *s* fornece uma idéia sobre a **incerteza padrão** (**incerteza típica**) de qualquer medida, tendo como base o conjunto das *N* medidas. O parâmetro *s* pode ser interpretado como sendo a incerteza que se pode esperar, dentro de certa probabilidade, se uma (N+1)-ésima medição viesse a ser realizada, quando já se conhece o que ocorreu nas *N* medições anteriores. O desvio padrão amostral indica uma boa avaliação sobre a distribuição das medidas, em torno do valor médio.

Considerando um conjunto de dados experimentais, são apresentados na Tabela I, alguns parâmetros estatísticos como: o seu valor médio, o seu desvio experimental médio, o seu desvio absoluto médio e o seu desvio quadrático médio.

Toginho Filho, D. O., Andrello, A.C., Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física • Universidade Estadual de Londrina, Março de 2009.



Medição e propagação de erros

Tabela I - Parâmetros estatísticos de um conjunto de dados obtidos com a medição da massa de um cilindro metálico, utilizando uma balança de braço

Parâmetro	Definição	Resultado
Valor médio	$\overline{x} = \frac{1}{200} \sum_{i=1}^{200} x_i$	$\overline{x} = 43,56\overline{0}050 \ g$
Desvio absoluto	$\overline{d}_{abs} = \frac{1}{200} \sum_{i=1}^{200} \left x_i - \overline{x} \right $	$\overline{d}_{abs} = 0,01\overline{1}364\ g$
Desvio relativo	$\overline{d}_{rel} = rac{\overline{d}_{abs}}{\overline{x}}$	$\overline{d}_{rel} = 0,00\overline{0}261$
Desvio percentual	$\overline{d}_{\%} = 100\overline{d}_{rel}$	$\overline{d}_{\%} = 0,02\overline{6}088\%$
Desvio padrão	$s = \sqrt{\frac{1}{200 - 1} \sum_{i=1}^{200} (x_i - \overline{x})^2}$	$s = 0,01\overline{5}021g$

A partir dos resultados apresentados na Tabela I, supõese que as medidas foram realizadas com muito cuidado pois o desvio percentual tem um valor muito abaixo de 1%. Os resultados foram tratados com 2 dígitos depois da vírgula, mas a balança permitia a obtenção dos valores até o primeiro dígito. Esta aparente irregularidade resulta do fato de que o segundo dígito foi obtido através da inferência nas medidas. O resultado numérico só pode ser escrito até o terceiro dígito depois da vírgula, devido às regras sobre algarismos significativos.

Na expressão (2), é apresentada a definição do desvio padrão da \overline{x} .

$$\sigma_m \cong \sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$
(1)

Esta expressão é a que apresenta maior interesse, pois ela indica a maior ou menor incerteza da média \overline{x} em relação a uma média mais geral, que seria a média de diversas médias. Uma média mais geral seria a média de K conjuntos, cada um com M medidas. Obviamente,

$$\sigma_{\bar{x}} < \sigma$$

Assim, o resultado de uma série de *N* medições pode ser escrita como:

$$x = \overline{x} \pm \sigma_{\overline{z}} \tag{3-47}$$

A cada valor medido isolado adicionado aos Nvalores previamente utilizados, modifica o valor médio \bar{x} resultante. Porém, $\sigma_{\bar{x}}$ será tanto menor quanto maior o número N, ou quanto maior o número K, de conjuntos com N medidas. Com isto, oscilações irregulares (δx_j),são cada vez menores, fazendo com que o valor médio se aproxime assintoticamente de um valor final quando $N \rightarrow \infty$. Um número de medições excessivo não compensa o tempo gasto, pois, ao invés de se repetir mais e mais vezes as medições, é preferível uma realização cuidadosa de uma série, de umas 10 medições, para assegurar a qualidade do resultado. De acordo com a teoria de erros, se forem realizadas N medições, o desvio (σ) diminuirá para

 $1/\sqrt{N}$ do valor inicial. Portanto, pode ser utilizada a relação (2), especialmente em trabalhos de Laboratório de Ensino, onde não são exigidas grandes precisões.

8 - Intervalo de confiança

O desvio padrão σ é uma medida, que permite fornecer intervalos que quantificam a qualidade das medidas, indicando qual é a probabilidade mais provável de encontrar as medidas nesse intervalo, conforme os desvios vão se afastando do ponto de valor médio. Podemos ver a quantificação do fator de confiança em relação aos intervalos limitados por valores inteiros de desvio padrão, no quadro abaixo:

Tabela II – Relação entre o intervalo da variável, o fator de confiança, e a probabilidade de encontrar a medida dentro do intervalo.

meet valo.		
Intervalo	Fator de confiança	Probabilidade
$[-\sigma,+\sigma]$	$\alpha = 0,683$	68,3%
$[-2\sigma,+2\sigma]$	$\alpha = 0,954$	95,4%
$[-3\sigma,+3\sigma]$	$\alpha = 0,997$	99,7%

Assim, praticamente quase todas as flutuações aleatórias dos valores medidos se situam na faixa de $\{\bar{x}\pm 3\sigma\}$, ou seja, do fator de confiança $\alpha = 0,997$. Isto significa que apenas 3 dentro de 1000 medidas podem estar fora da faixa. Normalmente, é praxe rejeitar os erros que excedam esta faixa, considerando, que eles não sejam mais erros aleatórios, mas sim enganos.

Toginho Filho, D. O., Andrello, A.C., Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física • Universidade Estadual de Londrina, Março de 2009.



Medição e propagação de erros

9 - Propagação de erros ou desvios

Na maioria dos experimentos, a medição de uma grandeza R de interesse é feita de maneira indireta, sendo esta grandeza obtida a partir de medidas de <u>n</u> grandezas primárias $\{a_1, a_2, a_3, ..., a_k, ..., a_n\}$. O cálculo de R é feito a partir de uma função conhecida das grandezas primárias. Estas grandezas são também denominadas grandezas de entrada, enquanto a grandeza R é denominada grandeza de saída. Um exemplo é o cálculo da densidade de um objeto (grandeza R), no qual se mede a massa e o volume do corpo. As grandezas massa e volume são chamadas grandezas de entrada. Os valores das grandezas de entrada provêm, todos ou em parte, de medições diretas. Em linguagem formal escrevemos:

$$R = R(a_1, a_2, a_3, \dots, A_n) \tag{1}$$

Utilizando aproximações e um grande número de medidas (amostras), podemos admitir que o valor médio seja considerado o valor verdadeiro. Da mesma forma, a incerteza padrão pode ser considerada como o desvio padrão verdadeiro.

Fazendo um desenvolvimento matemático apropriado, temos uma expressão para o cálculo da incerteza padrão da grandeza de saída.

$$\sigma_{\overline{R}} = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial a_1}\right)^2 \left(\sigma_{\overline{a}_1}\right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial a_2}\right)^2 \left(\sigma_{\overline{a}_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{\partial R}{\partial a_n}\right) \left(\sigma_{\overline{a}_n}\right)^2} \quad (2)$$

Esta expressão para a incerteza padrão da grandeza de saída, também chamada de *incerteza padrão combinada*, é utilizada quando as grandezas de entrada $\{a_1, a_2, \ldots, a_n\}$ são medidas repetidas vezes, gerando valores médios \overline{a}_k e desvios padrão das médias $\sigma_{\overline{a}_k}$.

Em muitas situações não é necessário muito rigor quanto à exatidão nos valores das incertezas combinadas, sendo aceitável que sejam usadas expressões para obter valores aproximados das grandezas de interesse. Neste caso, quando é realizada apenas uma medição isolada (e não uma série de medições) devemos usar o conceito de *limite máximo de erro*.

Consideremos o caso em que se deseja calcular a incerteza padrão propagada no valor de uma grandeza de saída R, com relação funcional do tipo $\mathbf{R} = \mathbf{a} + \mathbf{b}$. São realizadas medições diretas das grandezas de entrada $\mathbf{a} \in \mathbf{b}$, com suas respectivas incertezas padrão $\sigma_{\overline{a}} \in \sigma_{\overline{b}}$. Neste caso, as grandezas <u>a</u> e <u>b</u> são equivalentes às grandezas $a_1 \in a_2$, contidas na equação (2), da qual se obtém:

$$\sigma_{\overline{R}} = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial a}\right)^2 (\sigma_{\overline{a}})^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial b}\right)^2 (\sigma_{\overline{b}})^2}$$
$$\sigma_{\overline{R}} = \sqrt{(\sigma_{\overline{a}})^2 + (\sigma_{\overline{b}})^2}$$

Sendo a forma final para grandeza combinada e sua incerteza padrão combinada escrita como:

$$R \pm \sigma_{\overline{a}} = (\overline{a} + \overline{b}) \pm \sqrt{(\sigma_{\overline{a}})^2 + (\sigma_{\overline{b}})^2}$$

Na Tabela são apresentadas as expressões para o cálculo da incerteza padrão em grandezas combinadas, utilizando a propagação de erro para diversas relações funcionais.

Referências Bibliográficas

- Domiciano, J. B., Juraltis K. R., "Introdução ao laboratório de Física Experimental", Departamento de Física, Universidade Estadual de Londrina, 2003.
- Vuolo, J. H. "Fundamentos da Teoria de Erros" Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 1992.

Toginho Filho, D. O., Andrello, A.C., Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física • Universidade Estadual de Londrina, Março de 2009.



Medição e propagação de erros

 Tabela III - Expressões para cálculos das incertezas combinadas ou propagadas de algumas grandezas R que possuem formas funcionais simples.

Relação funcional	Erro propagado
$\overline{R} = R(\overline{a}_1, \overline{a}_2, \dots, \overline{a}_n)$	$\sigma_{\overline{R}} = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial a_1}\right)^2 \sigma_{\overline{a_1}}^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial a_2}\right)^2 \sigma_{\overline{a_2}}^2 + \dots + \left(\frac{\partial R}{\partial a_n}\right)^2 \sigma_{\overline{a_n}}^2}$
$\overline{R} = \overline{a} \pm \overline{b}$	$\left(\sigma_{\overline{R}} ight)^2=(\sigma_{\overline{a}})^2+(\sigma_{\overline{b}})^2$
$\overline{R} = \overline{a}.\overline{b}$ ou $\overline{R} = \frac{\overline{a}}{\overline{b}}$	$(rac{\sigma_{\overline{R}}}{\overline{R}})^2 = (rac{\sigma_{\overline{a}}}{\overline{a}})^2 + (rac{\sigma_{\overline{b}}}{\overline{b}})^2$
$\overline{R} = \overline{a}^r$	$\frac{\sigma_{\overline{R}}}{\overline{R}} = r \frac{\sigma_{\overline{a}}}{\overline{a}}$
$\overline{R} = \ln \overline{a}$	$\sigma_{\overline{R}} = \frac{\sigma_{\overline{a}}}{\overline{a}}$
$\overline{R} = e^{\overline{a}}$	$\frac{\sigma_{\overline{R}}}{\overline{R}} = \sigma_{\overline{a}}$

Toginho Filho, D. O., Andrello, A.C., Catálogo de Experimentos do Laboratório Integrado de Física Geral Departamento de Física • Universidade Estadual de Londrina, Março de 2009.

MEMÓRIA DO PERÍODO DO DOUTORADO

A doutoranda Carolina L.C. de Albuquerque realizou as atividades de pesquisa apresentadas nesta Tese durante seu trabalho no grupo de pesquisas do laboratório LASEFI - Tecnologia Supercrítica, entre agosto de 2008 e julho de 2012, referente ao projeto de Doutorado com número de processo 562766/2008-1, financiado com bolsa do CNPq (Edital MCT/CNPq – 027/2007) e auxílio pesquisa, processo nº 143092/2008-1.

As disciplinas obrigatórias oferecidas pelo programa de pós-graduação da FEA foram cursadas no período do mestrado (2006-2008): Termodinâmica; Fenômenos de Transporte I e II; Seminários; Planejamento Experimental e Otimização de Processos, Por isso, a doutoranda foi dispensada de cursá-las no período do doutorado. A carga horária obrigatória foi completada com disciplinas eletivas: NG110-Tópicos Especiais em Genética (Propriedade Intelectual); TP199-Seminários; CT019-Instrumentos de Política e Gestão de C, T&I; TP356-Caracterização e Transformações de Pigmentos Naturais; TP121-Tópicos em Engenharia de Alimentos (Uso do Ciclo de Aprendizagem (PDSA) para a redação de textos científicos); e estágios em docência, através do Programa de Estágio Docente (PED)/Pró-Reitoria de Pós Graduação/UNICAMP, com atividades de apoio parcial à docência da disciplina TA 331-A Termodinâmica, sob supervisão: atuou como voluntária (PED C) entre 03/2008 e 07/2009, 8h semanais, e 0% de carga didática, e como bolsista (PED B), 12 h semanais, e 20% de carga didática,

As pesquisas referentes, tanto ao projeto de Doutorado, quanto às parcerias com colegas do grupo de pesquisa - LASEFI, resultaram em dois artigos publicados (Capítulos 2 e 3), e trabalhos publicados em anais de eventos, sendo cinco completos, um resumo expandido e seis resumos, com participação nos eventos VII CIBIA, na cidade de Bogotá/Colômbia em 2009, 2ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum, Campinas/SP em 2010, PROSCIBA 2010, e 9th SLACA, Campinas/SP em 2011, IUFoST, Foz do Iguaçu, em 2012.

Como formação complementar, a doutoranda participou de cursos de capacitação em Informação Científica, cursos de Propriedade Intelectual e Busca em Bases de Patentes e cursos de Propriedade Intelectual, este realizado pela INOVA/UNICAMP em parceria com o Instituto Nacional de Propriedade Industrial, no âmbito do projeto InovaNIT com apoio da FINEP. Adicionalmente, participou de cursos Melhorando o Potencial em

253

Publicações Científicas, FEA/UNICAMP, Método Lógico para a Escrita Científica, Espaço da Escrita/UNICAMP e Process Modeling and Optimization with SuperPro Designer and SchedulePro, no Laboratório Nacional Ciência e Tecnologia do Bioetanol-CTBE.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

- Albuquerque, Carolina L.C., Meireles, M. Angela A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process, The Journal of Supercritical Fluids, v.66, p.86 - 95, 2012.
- ALBUQUERQUE, C.L.C., MEIRELES, M.A.A. Trends in Annatto Agroindustry: Bixin Processing Technologies and Market, Recent patents in engineering, v.5, p. 94 -102, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

- Santos, D.T., Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A., Antioxidant dye and pigment extraction using a homemade pressurized solvent extraction system. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). Procedia Food Science v. 1, p. 1581 – 1588, 2011.
- Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A, Estimate of the Cost of Manufacturing (COM) of Natural Colorants Obtained by Supercritical Fluid Extraction, In: II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIBA), 2010, Natal, Proccedings of PROSCIBA 2010, Natal: UFRN, 2010.
- Albuquerque, C.L.C., Santos, D.T., Meireles, M.A.A, Functional Properties of Supercritical Extract from Ylang-Ylang (Cananga odorata) Peel Fruit, In: 12th European Meeting On Supercritical Fluids, 2010, Graz, Proceedings of the 12th European Meeting on Supercritical Fluids, Nanci: ISASF, 2010.
- Navarro-Díaz, H.J., Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A, Antioxidant Activity of Origanum vulgare extracts obtained with supercritical carbon dioxide In: CIBIA VII -

Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2009, Bogotá, VII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Bogotá: 2009.

Prado, I. M., Albuquerque, C.L.C., Cavalcanti, R.N., Meireles, M.A.A, Use of a Commercial Process Simulator to Estimate the Cost of Manufacturing (COM) of Carotenoids Obtained Via Supercritical Technology from Palm and Buriti Trees In: 9th International Symposium on SuperCritical Fluids New trends in Supercritical Fluids: Energy, Materials, Processing, 2009, Arcachon - Fr, 9th International Symposium on SuperCritical Fluids New trends in Supercritical Fluids: Energy, Materials, Processing, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- Albuquerque, C.L.C., Silva, M.G., Fabri, E.G., Carvalho, P.R.N., Meireles, M.A.A, Extraction of Annatto Oil by Supercritical CO2: effect of process time on the tocopherols (T1) and tocotrienols (T3) composition. In: 16th World Congress of Food Science and Technology - IUFoST - "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology", Foz do Iguaçu, Paraná, 2012.
- Albuquerque, C.L.C., Ferreira, J.A., Fabri, E.G., Meireles, M.A.A, Vitamin E from annatto: tocotrienol-rich extract, tocopherol free, obtained by supercritical fluid technology In: 9 Slaca - Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, 2011, Campinas, 9 Slaca - Simpósio Latino Americano de Ciência dos Alimentos, Campinas: Associação Latina Alemericana de Ciência dos Alimentos, 2011.
- Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A, Estimate of the Cost of Manufacturing (COM) of Natural Colorants Obtained by Supercritical Fluid Extraction, In: II Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, 2010, Natal, Book of Abstracts, Natal: UFRN, 2010, p.99 – 99.
- Albuquerque, C.L.C., Fabri, E.G., Meireles, M.A.A, Extração Supercrítica de Pigmentos de Urucum: otimização, simulação e custo de manufatura, In: 2ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum, 2010, Campinas-SP, 2ª Reunião Nacional da Cadeia Produtiva do Urucum, 2010.
- Albuquerque, C.L.C., Santos, D.T., Meireles, M.A.A, Functional Properties of Supercritical Extract from Ylang-Ylang (Cananga odorata) Peel Fruit, In: 12th European Meeting on Supercritical Fluids, 2010, Graz, Graz, Abstracts: 12th European Meeting on Supercritical Fluids, Nanci: ISASF, 2010, p.159 – 159.

- Navarro-Díaz, H.J., Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A, Antioxidant Activity of Origanum vulgare extracts obtained with supercritical carbon dioxide In: CIBIA VII -Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2009, Bogotá, VII - Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2009.
- Prado, I. M., Albuquerque, C.L.C., Cavalcanti, R.N., Meireles, M.A.A, Use of Commercial Process Simulator to Estimate the Cost of Manufactuting (COM) of Carotenoids Obtained Via Supercritical Tecnology from Palm and Buriti Trees In: 9th International Symposium on Supercritical Fluids New trends in Supercritical Fluids: Energy, Materials, Processing, 2009, Arcachon, Abstracts ISSF 2009, Nanci: Ecole des Mines d'Albi-Carmaux, 2009, p.284 – 284.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

Santos, D.T., Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A, Antioxidant dyes and pigments extraction using a home-made pressurized solvent extraction system. In: 11th International Congress on Engineering and Food, 2011, Atenas, iCEF11 Congress Proceedings, Atenas: Cosmosware, 2011, v.III, p.2113 – 2114.