

**TONIMAR DOMICIANO ARRIGHI SENRA**

**TERMODINÂMICA E OTIMIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE  
NORBIXINA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Agroquímica, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S478t  
2010

Senra, Tonimar Domiciano Arrighi, 1985-

Termodinâmica e otimização da transferência de norbixina  
em sistemas aquosos bifásicos / Tonimar Domiciano Arrighi  
Senra. – Viçosa, MG, 2010.

xv, 98f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Norbixina - Análise.  
3. Norbixina - Purificação. 4. Separação (Tecnologia).  
5. Química ambiental. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 543.55

**TONIMAR DOMICIANO ARRIGHI SENRA**

**TERMODINÂMICA E OTIMIZAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE  
NORBIXINA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Agroquímica, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de julho de 2010.

---

Profa. Maria da Carmo Hespanhol  
da Silva (Coorientadora)

---

Prof. Alvaro Vianna Novaes de  
Carvalho Teixeira

---

Prof. Paulo César Stringheta

---

Prof. Luis Antonio Minim  
(Coorientador)

---

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva  
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha família, e em especial a minha avó (D. Eda) pelo incentivo, apoio, carinho e exemplo de vida, o que propiciou me tornar a pessoa que sou hoje.

*"Há duas coisas infinitas: o Universo e a tolice dos homens."*

*(Albert Einstein)*

*"No fim do jogo, o rei e o peão voltam para a mesma caixa"*

*(Ditado Italiano)*

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, pela oportunidade e pela coragem.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), pelo auxílio financeiro.

Aos professores Luis Henrique Mendes da Silva e Maria do Carmo Hespanhol da Silva pelas orientações, conversas, confiança e amizade, além dos ensinamentos que me ajudaram a crescer como pessoa e profissional.

Aos professores Álvaro Vianna, Luis Antônio Minim e Paulo César Stringheta que aceitaram participar desta banca.

Aos grandes amigos do 411, que ficarão para sempre: Cristhiano (Latão), Helisson e Leandro, obrigado pelos bons momentos vividos em Viçosa.

Aos amigos e companheiros do QUIVECOM pela convivência que tornaram o nosso dia-a-dia mais alegre e descontraído.

Aos amigos que estavam sempre presentes nesse período de Viçosa e que continuarão pelo resto da vida: Adrianna, Fernanda, Filipe, Flávia, Herbert, José e Vânia.

Aos meus pais e avó, D. Eda, por tornar possível a realização deste sonho e pelo exemplo de vida, força e superação.

Aos meus irmãos Toniel e Helen e ao meu sobrinho Henzo, pelo apoio, incentivos e bons momentos vividos.

À toda minha família, em especial a minha prima Michelle e Ana Luíza.

E a todos que de uma forma ou outra contribuíram com a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

TONIMAR DOMICIANO ARRIGHI SENRA, filho de Everaldo Mário Domiciano Campos e Isabel Arrighi Senra Campos, nasceu no dia 03 de julho de 1985, na cidade de Rio Pomba, Minas Gerais.

Em março de 2004, ingressou no curso de Química pela Universidade Federal de Viçosa, em janeiro de 2009 obteve o título de Bacharel e Licenciado em Química.

Em março de 2009 iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica ao nível de mestrado com ênfase em Físico-química na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2010.

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
Capítulo 1: REVISÃO DE LITERATURA	1
1. Introdução e Objetivos	1
1.1. O Urucum	3
1.1.1. O Mercado do Urucum	5
1.1.2. Usos e Utilidades	8
1.1.2.1. Extrato de Urucum	10
1.1.3. Propriedades dos Pigmentos	11
1.1.4. Toxicologia	15
1.2. Processos de Obtenção de Corantes de Urucum	16
1.2.1. Processos de Extração	16
1.2.1.1. Atrito e Secagem em Leito de Jorro	17
1.2.1.2. Raspagem e Peneiramento	18
1.2.1.3. Lixiviação das Sementes com Água e Agitação	18
1.2.1.4. Extração com CO <sub>2</sub> Supercrítico	19
1.2.1.5. Extração com Óleo Vegetal	20
1.2.1.6. Extração com Solventes	21
1.2.1.7. Extração com Soluções Alcalinas	22
1.2.1.8. Precipitação Ácida	25
1.2.1.9. Secagem por Atomização em “Spray-Dryer”	25
1.3. Procedimentos Analíticos Utilizados na Análise da bixina/norbixina	27
1.3.1. Métodos Espectrofotométricos	27

1.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	28
1.3.3. Cromatografia em Camada Delgada	28
1.3.4. Cromatografia em Papel	29
1.4. Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)	30
1.4.1. Aplicação dos SAB na purificação de corantes	38
2. Justificativa	40
Referências	42
Capítulo 2: Termodinâmica e Otimização da Transferência de Norbixina em Sistemas Aquosos Bifásicos	52
Resumo	52
Palavras-Chaves	52
Abstract	53
Keywords	53
1. Introdução	54
2. Seção Experimental	56
2.1. Materiais	56
2.2. Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos	57
2.3. Coleta e Diluição das Fases	58
2.4. Quantificação do Coeficiente de Partição da Norbixina	58
2.5. Estudo dos Fatores que Afetam a Partição da Norbixina nos SAB	59
2.6. Parâmetros Termodinâmicos da Partição da Norbixina	62
2.6.1. Variação da Energia Livre de Gibbs de Transferência da Norbixina ( $\Delta G_{tr}$ )	62

2.6.2. Variação da Entalpia de Transferência da Norbixina	62
( $\Delta H_{tr}$ )	
2.6.3. Variação da Entropia de Transferência da Norbixina	63
( $\Delta S_{tr}$ )	
3. Resultados e Discussões	64
3.1. Otimização do Coeficiente de Partição da Norbixina	64
3.1.1. Gráfico da Superfície de Resposta	70
3.2. Parâmetros Termodinâmicos da Transferência da Norbixina	74
3.3. Análise das Propriedades dos Componentes Formadores dos SAB sobre o KN Baseados no Modelo Termodinâmico de Johansson	81
3.3.1. Efeito da Massa Molar do Polímero PEO na Partição da Norbixina	83
3.3.2. Efeito da Natureza do Eletrólito na Partição da Norbixina	84
3.3.3. Efeito da Hidrofobicidade na Partição da Norbixina	89
4. Conclusões	92
Referências	94

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**DNA** = Ácido desoxirribonucléico

$K_N$  = Coeficiente de partição da norbixina

$E_{1cm}^{1\%}$  = Coeficiente de extinção

**CLA** = Comprimento da Linha de Amarração

$\lambda_{M\acute{a}x}$  = Comprimento de onda de máxima absorvância

**CCF** = Planejamento Composto de Face Centrada

**C<sub>12</sub>NE** = Brometo de dodeciltrietilamônio

$C_{Pol}^{FS}$  = Concentração % (m/m) de polímero na fase superior

$C_{Pol}^{FI}$  = Concentração % (m/m) de polímero na fase inferior

$C_{Sal}^{FS}$  = Concentração % (m/m) de sal na fase superior

$C_{Sal}^{FI}$  = Concentração % (m/m) de sal na fase inferior

$C_{FS}$  = Concentração de norbixina em mol.L<sup>-1</sup> na fase superior

$C_{FI}$  = Concentração de norbixina em mol.L<sup>-1</sup> na fase inferior

**DSC** = Dye-sensitized solar cells (células fotoelétricas)

$\Delta_{tr}G$  = Variação da energia livre de Gibbs de transferência

$\Delta_{tr}H$  = Variação da entalpia de transferência

$\Delta_{tr}S$  = Variação da entropia de transferência

$\Delta_{i-j}H$  = Entalpia de interação para o par i-j.

$\frac{n^{FS}}{V^{FS}}$  = Densidade numérica da fase superior

$\frac{n^{FI}}{V^{FI}}$  = Densidade numérica da fase inferior

$\epsilon_{i-j}$  = Energia potencial do par efetivo i-j

**FS** = Fase superior

**FI** = Fase inferior

$\phi_i^\alpha$  = Fração volumétrica do componente i na fase  $\alpha$

$G_{sist}$  = Energia livre de Gibbs do sistema

**HPLC** = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**ITC** = Calorimetria de Titulação Isotérmica

**LA** = Linha de Amarração

$\langle M_{macr} \rangle$  = Massa molar média numérica da macromolécula

$M_{unimer}$  = Massa molar da unidade

$M_N$  = Peso molecular da norbixina  
 $m/m$  = Concentração em porcentagem massa/massa  
 $nm$  = nanômetro  
 $\mu$  = Potencial químico  
**OMS** = Organização Mundial de Saúde  
**PAN** = 1-(2-piridilazo)-2-naftol  
**PAR** = 4-(2-piridilazo)- resorcinol  
**PEG** = Poli(etilenoglicol)  
**PEO** = Poli(óxido de etileno)  
**PPO** = Poli(óxido de propileno)  
**PVP40** = Polivinilpirrolidona  
**PC** = Ponto Crítico  
**R** = Constante dos gases reais  
 $\rho$  = Densidade numérica total do sistema  
**SDS** = Dodecil sulfato de sódio  
**SAB** = Sistema Aquoso Bifásico  
**SuccNa** = Succinato de Sódio  
**T** = Temperatura absoluta  
**TartNa** = Tartarato de sódio  
**TAN** = 1-(tiazolilazo)-2-naftol  
**TAR** = 4-(2-tiazolilazo)-resorcinol  
**UV** = Ultravioleta  
 $v/v$  = Concentração em porcentagem volume/ volume  
 $W_{i-N}$  = Energia de formação do par potencial efetivo i com o soluto  
 $W_{i-j}$  = Energia de formação do par potencial efetivo i-j  
**Z** = Número de vizinhos

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Estrutura molecular da bixina:  $C_{25}H_{30}O_4$  (pm 394,51)

**Figura 2:** Estrutura molecular da norbixina:  $C_{24}H_{28}O_4$  (pm 380,48)

**Figura 3:** Estrutura química dos pigmentos do urucum

**Figura 4:** Esquema do secador do leite de jorro.

**Figura 5:** Esquema de extração com  $CO_2$  supercrítico.

**Figura 6:** Sequência das etapas do processamento para produção de extratos oleosos de urucum.

**Figura 7:** Reações químicas para obtenção do corante (norbixina) de urucum utilizando soluções alcalinas.

**Figura 8:** Diagrama de fase esquemático de um sistema aquoso bifásico

**Figura 9.** Fórmula estrutural da unidade repetitiva óxido de etileno,  $n$  é o grau de polimerização definido por,  $n \equiv \frac{\langle M_{\text{macr}} \rangle}{\langle M_{\text{unimer}} \rangle}$ , sendo  $M_{\text{macr}}$  a massa molar média numérica da macromolécula e  $M_{\text{unimer}}$  a massa molar da unidade monomérica.

**Figura 10:** Estrutura química dos apocarotenóides cis-bixina e cis-norbixina, os quais são os pigmentos principais no pericarpo das sementes de urucum.

**Figura 11:** Gráfico de Pareto das variáveis analisadas para a partição da norbixina no SAB PEO 1500+tartarato de sódio+ $H_2O$ .

**Figura 12:** Gráfico de Pareto das variáveis analisadas para a partição da norbixina no SAB PEO 1500+succinato de sódio+ $H_2O$ .

**Figura 13:** Gráfico de Pareto das variáveis analisadas para a partição da norbixina no SAB PPO 400+tartarato de sódio+ $H_2O$ .

**Figura 14:** Superfície de resposta prevista para o  $K_N$  no SAB PEO 1500+ tartNa+  $H_2O$  como função dos fatores concentração de PEO e concentração de tartNa, expresso nos níveis não-codificados.

**Figura 15:** Superfície de resposta prevista para o  $K_N$  no SAB PEO 1500+ succNa+ H<sub>2</sub>O como função dos fatores concentração de succNa e valor de pH, expresso nos níveis não-codificados.

**Figura 16:** Superfície de resposta prevista para o  $K_N$  no SAB PPO 400+ tartNa+ H<sub>2</sub>O como função dos fatores concentração de PEO e concentração de tartNa, expresso nos níveis não-codificados.

**Figura 17:** Variação do energia livre de Gibbs de transferência da norbixina em função do valor do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO 1500/tartNa/H<sub>2</sub>O; (□) PEO 1500/succNa/H<sub>2</sub>O; (○) PEO 4000/tartNa/H<sub>2</sub>O; (▲) PPO 400/tartNa/H<sub>2</sub>O; (◆) L35/tartNa/H<sub>2</sub>O, à 25 °C

**Figura 18:** Efeito da massa molar do polímero PEO no coeficiente de partição ( $K_N$ ) em função do valor do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO1500+tartNa+H<sub>2</sub>O and (Δ) PEO 4000+ tartNa+H<sub>2</sub>O.

**Figura 19:** Influência da natureza do eletrólito formador do SAB no coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ ) em função do valor do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO 1500+ tartNa +H<sub>2</sub>O and (○) PEO1500+succNa+ H<sub>2</sub>O.

**Figura 20:** Estruturas químicas dos ânions (A) tartarato e (B) succinato.

**Figura 21:** Efeito da hidrofobicidade no coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ ) como função do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO1500+tartNa+H<sub>2</sub>O; (●) PPO400+tartNa+H<sub>2</sub>O e (◆) L35+tartNa+H<sub>2</sub>O.

**Figura 22:** Modelo de interação cátion-PEO. Representação esquemática da saturação da cadeia polimérica. Legenda: (●) carbono, (●) oxigênio, (●) hidrogênio, (●) cátion do eletrólito formador do SAB e (●) ânion do eletrólito formador do SAB.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Dados referentes à produção brasileira de urucum no período de 2004 a 2008.

**Tabela 2:** Produção mundial de urucum

**Tabela 3:** Resultados da análise espectrofotométrico UV-Vis

**Tabela 4:** Nome e peso molecular dos pigmentos das sementes

**Tabela 5:** Alguns bioativos e os SAB nos quais foram particionados

**Tabela 6:** Valores codificados e não-codificados das variáveis para o SAB PEO 1500+tartNa+H<sub>2</sub>O

**Tabela 7:** Valores codificados e não-codificados das variáveis para o SAB PEO 1500+succNa+H<sub>2</sub>O

**Table 8:** Valores codificados e não-codificados das variáveis para o SAB PPO 400+ tartNa+H<sub>2</sub>O

**Tabela 9:** Matriz elaborada para estudo dos fatores propostos ( $X_i$ )

**Tabela 10:** Resposta obtida para os SAB nos diferentes níveis estudados

**Tabela 11:** Resultados ANOVA para o sistema PEO 1500+tartNa+H<sub>2</sub>O

**Tabela 12:** Resultados ANOVA para o sistema PEO 1500+succNa+H<sub>2</sub>O

**Tabela 13:** Resultados ANOVA para o sistema PPO 400+tartNa+H<sub>2</sub>O

**Tabela 14:** Modelos matemáticos ajustados para a relação dos fatores avaliados e o coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ )

**Tabela 15:** Parâmetros termodinâmicos obtidos para a transferência da norbixina em todos os SAB estudados.

**Tabela 16:** Diferença da concentração de H<sub>2</sub>O entre as fases inferior e superior dos SAB à 25 °C.

## RESUMO

SENRA, Tonimar Domiciano Arrighi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Termodinâmica e otimização da transferência de norbixina em sistemas aquosos bifásicos.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadores: Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Luis Antônio Minim.

Partição do corante natural norbixina ( $K_N$ ) foi estudado em sistemas aquosos bifásicos formados pela mistura de soluções de polímero ou copolímero com solução aquosa de sal (tartarato ou succinato de sódio). O coeficiente de partição do corante norbixina foi investigado como função do pH, massa molar do polímero, hidrofobicidade, comprimento da linha de amarração (CLA) do sistema e natureza do eletrólito. Através de planejamento composto de face centrada (CCF), determinou-se a otimização do processo de partição da norbixina, onde verificou-se que tal fenômeno é altamente dependente da natureza do eletrólito e hidrofobicidade do sistema, bem como do valor do CLA. Valores de  $K_N$  entre 8 e 130 foram encontrados, indicando a potencialidade dos SAB como método de pré-concentração/purificação do corante norbixina. Moléculas de norbixina se concentraram na fase rica em polímero indicando uma interação entálpica específica entre o soluto e o pseudo-polication, o qual é formado pela adsorção do cátion ao longo da cadeia polimérica. Os parâmetros termodinâmicos de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) indicam que a concentração preferencial da norbixina na fase superior é favorecida pelos fatores entálpicos e entrópicos, pois ambos contribuem para uma redução para a energia livre de Gibbs do sistema.

## ABSTRACT

SENRA, Tonimar Domiciano Arrighi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2010. **Thermodynamic and optimization of norbixin transferring in aqueous two-phase system.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-Advisers: Maria do Carmo Hespanhol da Silva and Luis Antonio Minim.

Partition of natural dye norbixin have been studied in aqueous biphasic systems formed by mixing solutions of polymer or copolymer with an aqueous solution of salt (sodium tartrate or succinate). The partition coefficient of dye norbixin,  $K_N$ , was investigated as a function of pH, polymer molecular weight, hydrophobicity, Tie-Line Length (TLL) of the system and nature of the electrolyte. Using a face-centered central composite design (CCF) it was determined the optimum conditions for the partitioning process of the norbixin, where it was found that this phenomenon is highly dependent on the nature of the electrolyte, polymer hydrophobicity and values of TLL. Values between 8 and 130 were found, indicating the potential of ATPS as a method of pre-concentration/purifying dye norbixin. The molecules of norbixin concentrated on polymer-rich phase indicating a specific interaction enthalpy between the solute and pseudo-polycation, which is formed by the cation adsorption along the polymer chain. Thermodynamic parameters of transfer ( $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) indicate that the preferential concentration of norbixin the top phase is favored by enthalpic and entropic factors, since both contribute to a reduction for the Gibbs free energy of the system.

## Capítulo 1

### Revisão de Literatura

#### 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As buscas por corantes de origem natural pelas indústrias alimentícia e têxtil vêm aumentando, principalmente após a restrição imposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS/FAO) ao uso de corantes sintéticos em alimentos e a crescente preocupação de tornar os processos industriais menos impactantes ao meio ambiente.

A cor está associada com muitos aspectos da nossa vida. Com relação aos alimentos e produtos industrializados, um dos principais fatores para avaliar a qualidade de um produto é a cor, pois se ela não for adequada a cada produto, os consumidores não desfrutarão do sabor ou da textura de qualquer produto. Na indústria alimentícia a cor também pode ser a chave para se classificar o alimento como seguro, com boas características estéticas e sensoriais: cores indesejáveis na carne, frutas e vegetais nos avisam sobre um perigo potencial ou pelo menos a ocorrência de alteração de sabores, entre outras reações.

O urucum é a fonte do corante natural mais utilizado no mundo. O corante do urucum apresenta características raras, como a possibilidade de obtenção de extratos hidrossolúveis ou lipossolúveis, além da estabilidade adquirida quando se liga a certas proteínas. Isso torna o urucum um dos principais corantes naturais para alimentos<sup>1</sup>. O urucum também é aplicado em vários outros segmentos, como no tingimento de tecidos, para dar cores aos vernizes, em rações para aves, na medicina<sup>2-6</sup>, produtos farmacológicos, cosméticos e aplicações tecnológicas<sup>7,8</sup>.

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de sementes de urucum que responde por aproximadamente 70% de todo o urucum produzido no mundo, porém o produto brasileiro no mercado internacional é considerado de baixa qualidade<sup>9</sup>. Os Estados Unidos, Reino Unido, França, Japão<sup>10</sup> são os maiores importadores deste corante.

O principal pigmento do urucum é o carotenóide bixina que representa mais de 80% dos carotenóides totais presentes na semente. Este composto apresenta a sua tonalidade variando entre o amarelo e o vermelho. A vantagem desse pigmento em relação aos corantes sintéticos do tipo azo utilizados na indústria alimentícia é a sua estabilidade em alimentos processados na presença de agentes redutores (dióxido de enxofre, ácidos ascórbicos e cítricos e alguns flavorizantes) e oxidantes (cloro e hipoclorito). Essa maior estabilidade faz com que os alimentos mantenham a sua coloração por mais tempo.

Normalmente são utilizados processos mecânicos ou extração com solvente para obter o corante urucum, sendo que os processos mecânicos envolvem atrição ou raspagem das sementes. Os extratos obtidos das sementes de urucum apresentam propriedades corantes diferentes dependendo do processo de extração empregado, uma vez que métodos diferentes levam a formação de produtos com diferentes tonalidades e solubilidades. A bixina apresenta instabilidade, sofrendo degradação quando exposta a certas condições de temperatura, luz e ar<sup>11-15</sup>. A temperatura do processo de extração dos pigmentos é a principal responsável pelo balanço vermelho/amarelo da coloração, pois este fator é o principal responsável pela degradação ou isomerização do pigmento principal. Uma vez que o

produto final é altamente dependente do processo usado, é necessário um incremento da tecnologia de processamento da semente de urucum<sup>16-19</sup> para obtenção de um extrato de maior qualidade, além de permitir um uso mais racional da matéria-prima.

Os processos de extração do corante atualmente existentes não garantem uma padronização do produto final nem a obtenção de um extrato com pureza elevada<sup>16</sup>.

Portanto é necessário o desenvolvimento de tecnologia<sup>16-19</sup> que conduza não só a extração do pigmento bruto, mas principalmente que leve à obtenção de bixina de elevada pureza, agregando assim valor ao produto final obtido. E nesse contexto o presente trabalho propõe a aplicação dos chamados sistemas aquosos bifásicos (SAB) como método para extração dos pigmentos do urucum. Nos SAB o componente principal nas duas fases é a água, assim esse sistema de extração líquido-líquido, pode ser utilizado como uma tecnologia de extração eliminando por completo a utilização de solventes orgânicos às vezes tóxicos, inflamáveis e voláteis.

O objetivo deste trabalho é realizar um estudo termodinâmico do comportamento de partição do extrato de urucum em diversos SAB formado pela mistura de polímeros ou copolímeros bloco, com sais orgânicos. Será avaliado a influência da massa molecular e hidrofobicidade do polímero, tipo do eletrólito, composição do sistema e pH do meio para obtenção de um produto de maior qualidade, e assim apresentar os SAB como uma técnica eficaz e ambientalmente correta para obtenção de corantes naturais.

## **1.1 – O Urucum**

O nome científico do urucum, *Bixa orellana* foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região na Amazônica Setentrional. Quando os conquistadores espanhóis chegaram ao Novo Mundo conheceram muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Astecas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América tropical era usado como extrato para tingir tecidos e pintar o corpo, além de ser utilizada junto à vanilina na formulação de uma bebida a base de cacau<sup>20</sup>. O urucum é uma planta da família das Bixáceas e é conhecido pelo seu nome botânico por *Bixa orellana* L. Esta planta recebe diferentes denominações populares ao redor do mundo: Urucu, urucum e açafroa (Brasil), atole, achiote e bija (Peru, Colômbia e Cuba), achiote, bija, onoto (Venezuela), urukú (Paraguai), rocou e rocoyer (República Dominicana e Guiana francesa), rocuyer (França), changuaricá, pumacué e Ku-zub, (México). Outras denominações encontradas na literatura são: uñañé, eroyá, chagerica, orelana, ranota, annatto e lipstick (USA)<sup>21,22</sup>.

A família da *Bixaceae* apresenta somente um gênero, *Bixa* L., com 6 espécies tropicais, onde somente a *B. orellana* (urucum) tem a capacidade de sintetizar no pericarpo da semente pigmentos naturais derivados dos carotenóides economicamente importantes como corantes, dentre eles bixina (90Z-6,60-diaopcaroteno-6,60-dioato), um apocarotenóide amplamente usado como corante na indústria de alimentos<sup>23,24</sup>.

O urucuzeiro pode viver até 50 anos, sendo de 30 a sua vida útil econômica<sup>25</sup>. São conhecidas, hoje, diversas variedades, entretanto, as mais comuns são: Focinho de rato, Cabeça de moleque, Peruana e Wagner. Esta última apresenta vantagens sobre as demais; além de possuir suas

cachopas indeiscentes (não se abrem ao secar no pé) são trivalentes, tendo em média 104 sementes de cachopa, ou seja, o dobro das demais variedades nativas conhecidas<sup>25</sup>.

### **1.1.1 – Mercado do Urucum**

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de urucum e seu plantio é realizado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, tendo se expandido nas últimas décadas a outras regiões como a Sudeste, destacando-se os estados de São Paulo e Minas Gerais<sup>26</sup>.

O trecho a seguir retirado do livro Pigmentos de urucum: extração, reações químicas, usos e aplicações do professor Paulo César Stringheta<sup>26</sup> traz a idéia de como está o mercado desta planta no Brasil.

*Além das indústrias de alimentos, de cosméticos, farmacêutica e têxtil vêm também aumentando, ano após ano, a procura pelos corantes de origem natural. A tendência pela substituição dos corantes sintéticos por outros de origem natural, tornou crescente a demanda do mercado internacional por corantes de urucum.*

*O mercado de urucum no Brasil, assim como qualquer outro mercado do gênero agrícola está suscetível as condições de preço, clima e demanda. Assim sendo, tem-se épocas mais favoráveis e outras nem tanto, o que faz com que pequenos produtores sofram mais fortemente essas oscilações de mercado do que os grandes produtores.*

*O urucum tem o seu preço no mercado internacional variando de acordo com a percentagem de bixina presente nas sementes. Existem diversas variedades de urucum, mas como o seu plantio vem sendo feito no país de forma empírica ainda não foram obtidos resultados de pesquisa significativos. Sabe-se que o teor de bixina na semente pode variar desde índices baixíssimos (0,2%) até taxas consideradas ideais (4 ou 5%). Estudos realizados pela EMBRAPA, mostraram que as regiões Norte e Nordeste são as que apresentam as maiores concentrações de bixina. Isso foi atribuído à maior intensidade de irradiação solar e à umidade ambiental de tais regiões. As sementes são consideradas de boa qualidade quando apresentam um teor mínimo de 2,5%<sup>26</sup>.*

*Tem-se conhecimento de aproximadamente 35 indústrias produtoras de corantes no território nacional. Desse total, 54,17% são de corantes naturais e 12,5% são de corantes artificiais. As principais aplicações dos corantes à base de urucum, na indústria alimentícia, são:*

*No setor de embutidos (salsichas), onde o consumo é de cerca de 1,5 milhão de litros por ano do corante líquido hidrossolúvel (norbixina);*

*Nas indústrias de massas, onde o consumo é de cerca de 500 mil litros por ano do corante lipossolúvel (bixina);*

*Nas indústrias de queijo (tipo prato), onde o consumo é de cerca de 200 mil litros por ano do corante líquido lipossolúvel;*

*Nas indústrias de sorvetes e confeitaria, onde o consumo é de cerca de 120 mil litros por ano do corante hidrossolúvel.*

*Estima-se que mais de 2,8 toneladas/ano de bixina e norbixina sejam consumidos em outros alimentos, como o iogurte, recheio de biscoitos, snacks, coloríficos, sobremesas em pó, bebidas lácteas, misturas em pó, confeitos, bebidas isotônicas, polpas, sucos de frutas e em outras aplicações não alimentícias (cosméticas, farmacêuticas e indústrias têxteis).<sup>26</sup>*

A grande maioria das indústrias de processamento de corante se localiza no estado de São Paulo, as quais se destinam quase majoritariamente à produção dos corantes naturais para atender a demanda do mercado.

A seguir tem-se algumas informações a respeito do mercado de urucum no Brasil, nos últimos anos<sup>27</sup>.

**Tabela 1:** Dados referentes à produção brasileira de urucum no período de 2004 a 2008.

<b>Urucum (semente)</b>	<b>2008</b>	<b>2007</b>	<b>2006</b>	<b>2005</b>	<b>2004</b>
<b>Valor</b> (mil reais)	28.341	33.684	23.164	30.741	23.070
<b>Preço médio</b> (R\$/Kg)	2,2093	2,4115	2,0874	2,2333	1,7170
<b>Quantidade Produzida</b> (toneladas)	12.828	13.968	11.097	13.765	13.436
<b>Área Plantada</b> (hectares)	12.413	11.581	10.382	11.674	11.995
<b>Área Colhida</b> (hectares)	12.148	11.358	10.375	11.622	11.892
<b>Rendimento</b> (quilograma/hectare)	1.055	1.229	1.069	1.184	1.129

Dados obtidos IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em:

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp>

?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1: Acesso em 12 junho 2010

Pela análise da tabela acima pode-se perceber que o preço de mercado do urucum tem se mantido estável desde 2005, o que levou ao crescente aumento da área plantada e colhida de tal cultivo, além de ser um mercado que movimenta internamente um valor mínimo de 30 milhões de reais. É significativo destacar que o mercado do urucum tem um potencial para gerar um valor favorável à balança comercial brasileira muito maior, uma vez que se pode agregar mais qualidade aos produtos oriundos do urucum, ao se realizar o processamento do mesmo, com conseqüente melhora do preço. Por isso a importância de dominar técnicas de extração/purificação eficientes.

Para reforçar o que foi dito acima tem-se os dados apresentados pelo pesquisador Camilo Flamarion de Oliveira (EMBRAPA-Paraíba) numa apresentação dada à EPAMIG em 2007 (Tabela 2),

**Tabela 2:** Produção mundial de urucum

<b>Produção de Urucum (semente)</b>					
	<b>Mundo</b>	<b>América Latina</b>	<b>África</b>	<b>Ásia</b>	<b>Brasil</b>
<b>t/ano</b>	17.500	15.000	1.400	1.100	12.000

Pode-se perceber a importância econômica para o Brasil da produção de urucum, uma vez que a produção brasileira correspondemos por quase 70% de todo o urucum produzido no mundo.

Assim a médio e a longo prazo não seria aconselhável a exportação da matéria-prima urucum in natura (sementes), ao invés do corante industrializado. São muitas as vantagens de exportar o corante processado ou semi-processado, principalmente na forma de pó, facilitando o manuseio, transporte, estocagem e a versatilidade de produtos em que poderia ser utilizado. Este fato deveria ser cuidadosamente observado, já que nos

últimos anos a demanda mundial de corantes de urucum vem crescendo significativamente, indicando, possivelmente, uma abertura neste mercado em que a inserção de novas indústrias seria potencialmente rentável<sup>26</sup>.

### 1.1.2 – Usos e Utilidades

O principal produto obtido do cultivo do urucuzeiro é a dos corantes bixina e norbixina. A bixina de coloração variando de vermelho a castanho avermelhado é lipossolúvel e a norbixina de coloração castanho-avermelhado a castanho, é hidrossolúvel<sup>28</sup>.

Nos últimos cem anos, os corantes de urucum eram utilizados em laticínios com alto teor de gordura como, por exemplo, manteiga e queijos. E atualmente a sua aplicação se estende para produtos como cereais, salgadinhos, sorvetes e temperos<sup>17</sup>.

Outras aplicações industriais são dadas sob a forma de<sup>25</sup>:

**Colorau** – obtido através da mistura do pó pigmentoso de urucum com fubá, este na proporção de 90%. É usado como condimento caseiro.

**Óleo** - produzido dos grãos, após a extração do pigmento e usado na composição de vários produtos industriais, um deles empregado no revestimento das laranjas, para lhe conferir melhor apresentação e conservação.

**Pasta, pó solúvel e oleosos** – na indústria, são usados para tingir tecidos, nas cores amarela, alaranjada e vermelha forte, e também para avivar e modificar certas tintas. São usados, ainda, para dar cores aos vernizes, às graxas animais – especialmente queijos, manteigas e salsichas – aos sorvetes, picolés e refrigerantes, bem como às bebidas alcoólicas e carnes em geral.

**Rações para aves em postura** - o grão triturado do urucum entra na proporção de 0,8% nas rações avícolas, pois o caroteno influencia a pigmentação da casca e da gema dos ovos.

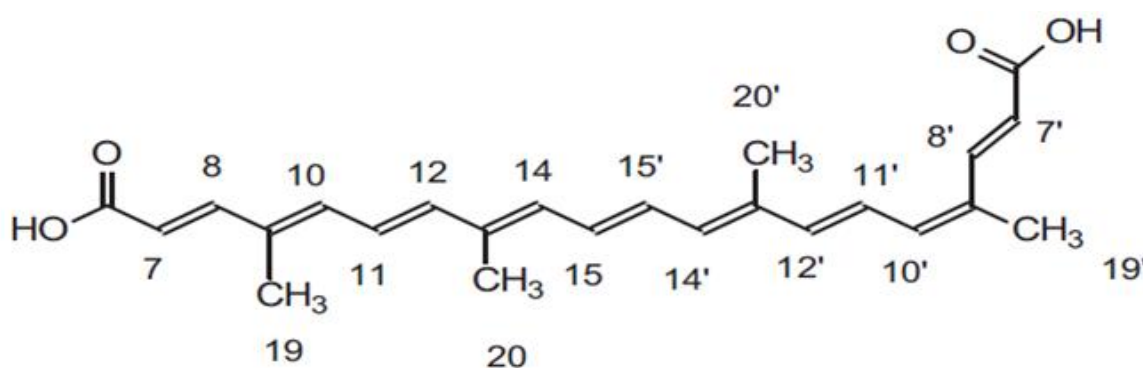
**Medicina** – como antidiarrético, antifebril. As sementes são reputadas como estomáticas e tonificantes do aparelho gastrointestinal. A massa do urucum é usada eficazmente nas queimaduras, evitando formação de bolhas. Além disso, dados recentes usando bixina em culturas de linfócitos humanos sugerem que este carotenóide pode atuar como um agente protetor dos efeitos clastogênicos de agente antitumorais<sup>29</sup>. A norbixina, o carotenóide descarboxilado solúvel em água encontrado também na semente do annatto, foi observado ter propriedades antígenotóxicas baseadas em sua proteção de células de *Escherichia Coli* contra indutores de danos ao DNA, a radiação UV, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e os ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), e apresentou também propriedades antimutagênicas<sup>30</sup>. Assim a síntese de derivados semi-sintéticos da bixina vem sendo pesquisada, com vistas a oferecer ao mercado uma nova geração de antioxidantes mais eficazes, como também fármacos, destinados a aplicações específicas, como por exemplo, na composição de drogas antitumorais, fotoprotetoras entre outras<sup>31</sup>. Também foi relatado recentemente atividade antimicrobiana<sup>32</sup>, antiinflamatória e analgésica na solução aquosa dos fruto de *Bixa orellana L.*<sup>33</sup>. Na medicina popular as sementes do urucuzeiro são largamente empregadas como expectorante, na forma de xarope; em decocto, são usadas para gargarejos, como laxativas, estomáticas, anti-hemorragias, cicatrizantes e contra dispepsia<sup>34</sup>. As sementes secas, em maceração ou decocção, também são usadas nos

males de fígado, tuberculose, afecções do coração, problemas na pele, antipirético e antiinflamatório<sup>35-40</sup>. As sementes servem ainda como antídoto para o ácido prússico que é aplicado nos casos de envenenamento com mandioca<sup>41</sup>, como antídoto para o ácido cianídrico, na terapia de bronquite e queimaduras<sup>42</sup>.

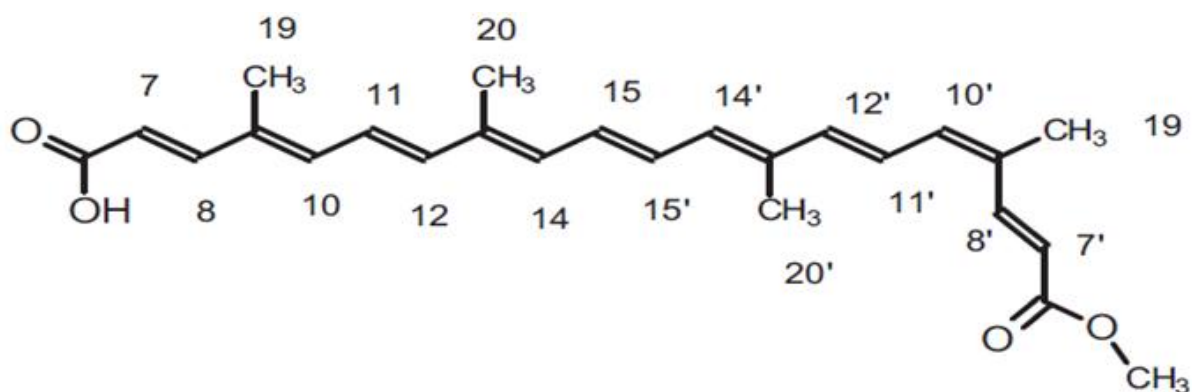
**Cosméticos** – na fabricação de pós faciais, esmaltes, batons e creme bronzeador da pele.

### 1.1.2.1 – Extrato de Urucum

O extrato de urucum é um dos mais antigos corantes<sup>43</sup>, utilizado desde a antiguidade para a coloração de alimentos, têxteis e cosméticos. Tem sido utilizado nos Estados Unidos e Europa por cerca de 100 anos como aditivo de cor a manteigas e queijos. O princípio ativo desse extrato se deve aos carotenóides bixina, quando em suspensão oleosa, e norbixina em solução alcalina<sup>44,45</sup>. Esses carotenóides apresentam a estrutura molecular demonstradas abaixo.



**Figura 1:** Estrutura molecular da bixina: C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> (pm 394,51)



**Figura 2:** Estrutura molecular da norbixina:  $C_{24}H_{28}O_4$  (pm 380,48)

É sugerido que a biossíntese da bixina provem de um carotenóide  $C_{40}$ , talvez o licopeno<sup>46</sup>.

A bixina foi o primeiro cis-carotenóide de ocorrência natural a ser isolado a partir de fontes naturais, em 1875<sup>43,47</sup>, porém a sua estereoquímica e estrutura completa foram elucidadas somente em 1961 através de estudos de ressonância magnética nuclear. A estereoquímica 9'-cis dada ao pigmento foi mais tarde confirmada através da síntese. O cromóforo da bixina é o sistema conjugado de duplas ligações que conferem a cor particular da bixina, mas estas ligações duplas conjugadas também são a fonte da susceptibilidade da bixina a alterações pelo oxigênio e esta é a principal causa da sua perda de cor, assim como em outros carotenóides<sup>43</sup>.

O extrato de urucum é vendido como: pó seco, emulsões de propilenoglicol/monoglicérides, soluções e suspensões de óleo e soluções aquosas alcalinas, as quais contém de 0,1 a 30% do corante ativo calculado como bixina ou norbixina. Dependendo da concentração e preparação tonalidades variam do amarelo manteiga ao pêssego<sup>48</sup>.

### 1.1.3 – Propriedades dos Pigmentos

A seguir é mostrado um resumo das propriedades dos extratos das sementes de urucum apresentadas por vários autores, comitês e organismos internacionais de controle de aditivos em alimentos e saúde <sup>14,49</sup>. As propriedades mais importantes são apresentadas a seguir.

**Propriedades da bixina:** lipossolúvel, solúvel em clorofórmio, acetona, éter etílico, etanol etc. e insolúvel em água; absorvância máxima a 439 nm, 470 nm e 501 nm em clorofórmio e a 526 nm, 491 nm e 457 nm e, dissulfeto de carbono; o coeficiente de extinção é  $E^{1\%}_{1\text{cm}}(470) = 28286$  em  $\text{CHCl}_3$ /10 mg bixina pura; ponto de fusão 198 °C; coloração amarela em extrato diluído e vermelha escura em extrato concentrado; instável a luz e a temperaturas acima de 125 °C.

**Propriedades da norbixina:** solúvel em água, insolúvel em acetona, clorofórmio, este, óleos e gorduras e moderadamente solúvel em álcool, e tem absorvância máxima a 454 e 482 nm para solução de 0,01% de NaOH.

Trabalhos realizados para quantificação dos pigmentos das sementes de urucum (cis e trans bixina e norbixina) por espectrofotometria e cromatografia já foram realizados<sup>24</sup>. Sendo encontrados semelhantes a outros já reportados na literatura<sup>50</sup>, como pode ser visto na Tabela 1. Dos métodos aplicados o mais preciso é o espectrofotométrico, onde a quantificação é feita através de padrões puros da bixina ou norbixina<sup>51</sup>.

Cerca de 80% dos carotenóides do urucum é a bixina, o qual apresenta uma cor laranja e é insolúvel em água. O aquecimento sofrido no processamento resulta na degradação térmica da forma cis na forma trans originando um produto amarelo <sup>17,52</sup>.

A caracterização dos produtos da degradação térmica da bixina<sup>53</sup>,

constatou que o produto principal é o ácido 4,8-dimetiltetradecaheptanoico (C<sub>17</sub>), este se isomeriza em solução originando vários análogos da bixina e norbixina. Em estudos posteriores<sup>54,55</sup>, foi relatado ainda a formação de m-xileno e tolueno, porém este último em menores quantidades, juntamente com o produto de degradação C<sub>17</sub>.

A tabela 3 e a tabela 4 mostram as fórmulas, respectivos pesos moleculares e estruturas químicas dos compostos de degradação do produto amarelo.

**Tabela 3-**Resultados da Análise Espectroscópicas UV-Vis

Composto	Solvente	Autor	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Coefficiente de Extinção ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ )
cis-bixina	CHCl <sub>3</sub>	A	501 e 470	2880 e 3230
cis-bixina	CHCl <sub>3</sub>	B	501 e 470	2773 e 3092
trans-bixina	CHCl <sub>3</sub>	A	507 e 476	2970 e 3240
trans-bixina	CHCl <sub>3</sub>	B	506 e 474	2853 e 3134
cis-norbixina	0,1 M NaOH	A	482 e 453	2550 e 2850
cis-norbixina	0,1 M NaOH	B	481 e 453	2503 e 2818
trans-norbixina	0,1 M NaOH	A	486 e 457	ND
trans-norbixina	0,1 M NaOH	B	487 e 456	ND

A = REITH e GIELEN (1971); B = SCOTTER et al. (1994); ND = não possível de determinar devido a baixa solubilidade.

**Tabela 4** – Nome e Peso Molecular dos Pigmentos das Sementes de Urucum

Nome	Fórmula molecular	Peso molecular
<b><math>\alpha</math>-bixina ou cis-bixina</b>	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	394
<b><math>\beta</math>-bixina ou trans-bixina</b>	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	394
<b><math>\alpha</math>-norbixina ou cis-norbixina</b>	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	380
<b><math>\beta</math>-norbixina ou trans-norbixina</b>	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	380
<b>Produto amarelo de degradação</b>	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	288

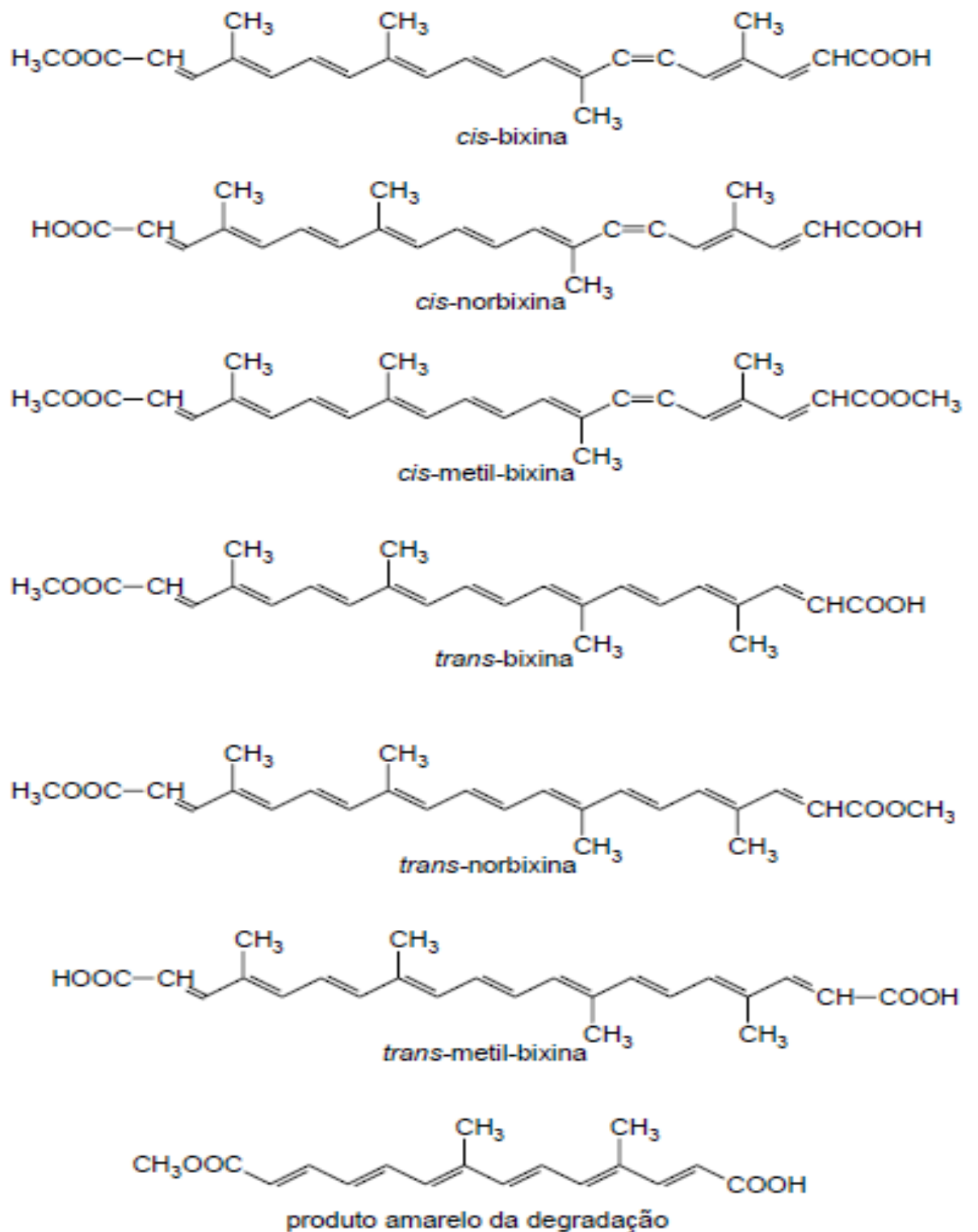


Figura 3: Estrutura Química dos Pigmentos do Urucum

A instabilidade dos pigmentos do urucum pela luz, calor e pela oxidação na presença de alguns solventes foram objetos de estudos de vários pesquisadores<sup>14,56</sup>. Estes estudos procuraram explicar o mecanismo da degradação e também tiveram como objetivo estabelecer faixas operacionais para o processamento destes pigmentos.

O extrato de urucum tem uma estabilidade considerável à oxidação pelo ar em meio anidro, mas uma resistência mais baixa aos efeitos da luz, os quais são proporcionais à intensidade desta. A persistência da cor sob forte iluminação pode ser aumentada pela adição de palmitato de ascorbil. A presença de radicais livres ou, qualquer promotor dessas espécies em extratos de urucum deve ser evitada, pois estudos indicam que pode ocorrer uma perda rápida de cor sempre que for promovida a formação de radicais livres<sup>15</sup>.

As diferenças nas propriedades corantes dos extratos de sementes de urucum resultam dos processos de extração, onde há, muitas vezes, a formação de produtos com diferentes tonalidades e solubilidades<sup>57</sup>.

#### **1.1.4 – Toxicologia**

Estudos sobre a toxicidade do extrato de urucum em ratos de ambos os sexos foram realizados<sup>56-58</sup>. Onde se verificou que em dose diárias aceitáveis (até 200 mg kg<sup>-1</sup> de massa corporal/dia) não induziu nenhum aumento na incidência de anomalias externas visíveis ou viscerais, além de não ter apresentado nenhuma atividade mutagênica nas células da medula dos mesmos.

Também foi realizado estudos sobre a atividade antimicrobiana de

extratos etanólicos das folhas e sementes de urucum<sup>32</sup>, os quais mostraram atividade contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas (*Baxillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli*) e ao fungo *Candida albicans*. Os resultados encontrados deram suporte ao uso do urucum na medicina tradicional, particularmente como gargarejo para dores de garganta e higiene oral.

## **1.2 – Processos de Obtenção de Corantes de Urucum**

Os pigmentos de urucum localizam-se no pericarpo das sementes, o que facilita a extração por não ser necessário triturar as sementes<sup>10</sup>. Estes podem ser extraídos por processos mecânicos (atrito ou raspagem das sementes), físico-químicos (solventes) ou ainda através de enzimas<sup>61</sup>. A extração com solventes pode ser realizada por três métodos básicos; extração alcalina (solução de NaOH ou KOH) resultando na conversão da bixina em norbixina; extração com óleo (soja, milho) e extração com solventes orgânicos (clorofórmio, etanol, acetona, propilenoglicol). Todas as técnicas de extração devem considerar a degradação destes pigmentos pela luz e calor excessivos, uma vez que o balanço vermelho/amarelo da coloração do extrato é influenciado pela temperatura e duração do processo de aquecimento<sup>17</sup>.

### **1.2.1 – Processos de Extração**

As principais vantagens da extração mecânica em relação à extração por solvente são: a obtenção do extrato de bixina sem a extração de outras

substâncias como os glicídios que agem como impurezas no concentrado de corante; a não utilização de solventes, evitando a combinação destes no extrato; a não necessidade de separar o solvente do extrato; e tampouco efetuar o processo de secagem do mesmo após a extração<sup>61</sup>. Estas técnicas mecânicas podem requerer um tratamento prévio das sementes, no qual estas são secas a uma temperatura baixa preservando a qualidade do pigmento<sup>57,62,63</sup>. Processos de extração mecânica no qual a secagem das sementes e extração do pigmento ocorriam simultaneamente já foram estudados<sup>9,64</sup>.

#### **1.2.1.1 – Atrito e secagem em leito de jorro**

Um equipamento em que as sementes de urucum são forçadas a atravessar um tubo em um extrator de leito de jorro devido a passagem de um fluxo de ar. Onde o impacto da partícula solta a camada superficial da semente e obtêm-se bixina em pó com bom rendimento<sup>26</sup>.

Trabalhos realizados provaram ser eficientes a utilização desse equipamento para realizar simultaneamente a etapa de secagem e extração do pigmento.

Shuhama et al<sup>65</sup>. Propuseram um novo método para a produção de corante de urucum em pó baseado na extração alcalina das sementes e uma posterior secagem do extrato em um secador de leito de jorro contendo partículas inertes (Figura 4). Neste trabalho eles obtiveram um corante em pó com elevado teor de pigmento. Porém em temperaturas superior à 80 °C houve redução brusca do teor de norbixina, devido principalmente a degradação térmica do composto.

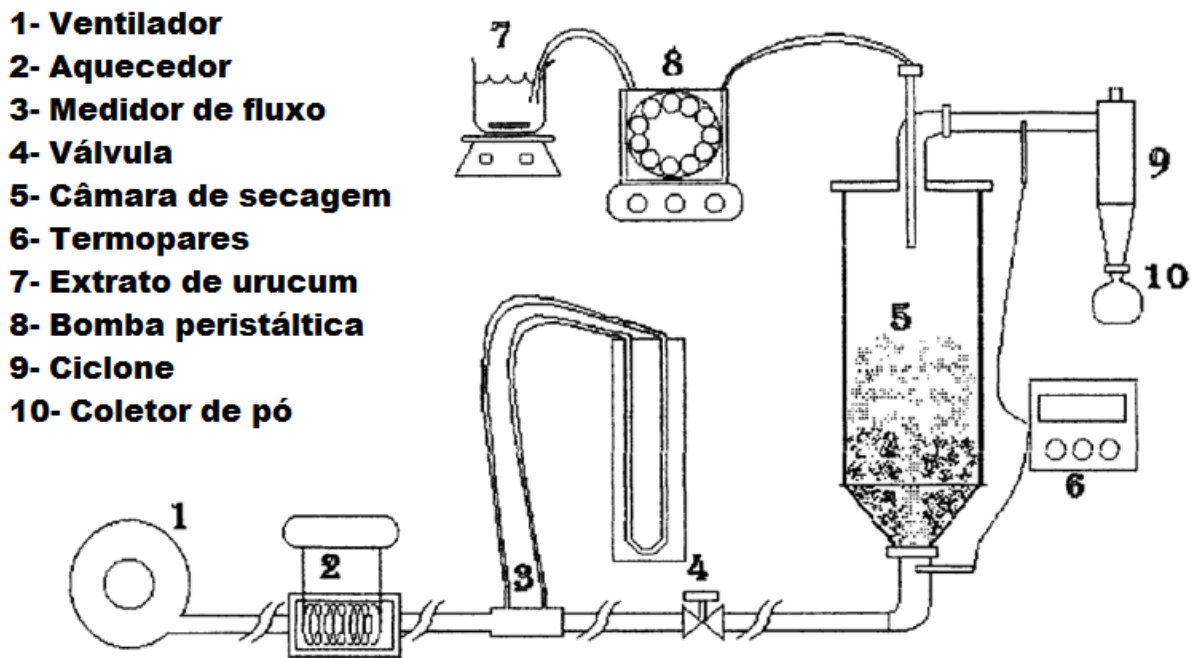


Figura 4: Esquema do secador do leito de jorro.

#### 1.2.1.2 – Raspagem e Peneiramento

São métodos rústicos para obtenção do corante, os quais proporcionam baixo rendimento, por isso não são utilizados em escala industrial. A raspagem pode ser feita com escovas de náilon, na superfície externa das sementes. E o peneiramento é feito proporcionando-se agitação às sementes em uma peneira, de forma que a camada externa das mesmas se desprendam e sejam separadas, originando uma “massa” corante<sup>26</sup>.

#### 1.2.1.3 – Lixiviação das sementes com água e agitação

É o método mais antigo de extração industrial, e ainda é utilizado pelos índios. Baseia-se na atritagem mecânica, que é fornecida pela agitação das sementes de urucum em água, que desaloja e separa a camada de pigmento. Obtendo-se uma suspensão corante, que pode ser filtrada ou centrifugada, e é submetida à secagem, originando uma pasta com

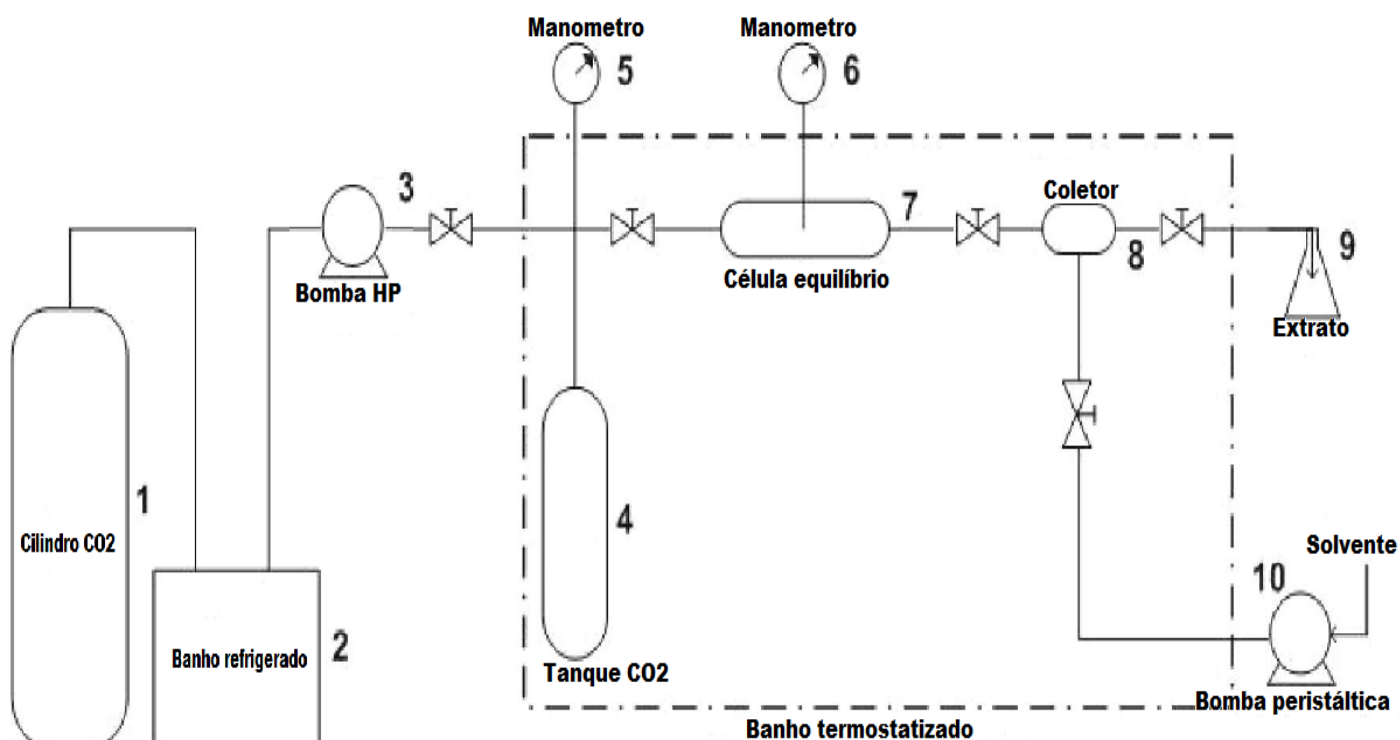
um conteúdo de cerca de 20% de bixina. Tal pasta pode ser diluída tanto em óleo vegetal quanto em solução alcalina, dependendo do fim a ser empregado. Um fato desfavorável é a presença de impurezas que são provenientes das sementes, que, são arrastadas juntamente com a bixina pela água<sup>26</sup>.

Alguns trabalhos foram realizados buscando otimizar tal método. E eles verificaram que o tempo de agitação tem influência na porcentagem de extração, tendo encontrado um teor médio do pigmento variando entre 31 e 46%<sup>26</sup>.

#### **1.2.1.4 – Extração com CO<sub>2</sub> Supercrítico**

Processo que utiliza tecnologia limpa, que não deixa resíduos, utiliza solventes não tóxicos, com preservação das propriedades das matérias-primas e a produção de produtos com alta qualidade são algumas das características interessantes do emprego de fluidos supercríticos na produção de bixina. Esses fatos caracterizam esse processo de extração com uma alternativa eficaz para buscar minimizar as limitações dos métodos comumente usados para a extração dos corantes de urucum<sup>26</sup>.

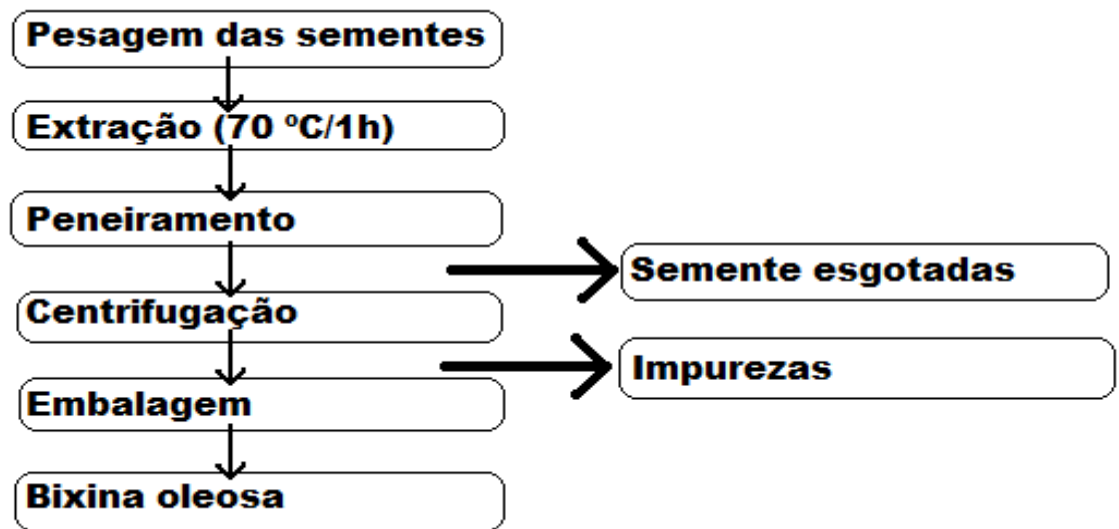
Nessa técnica um solvente que se encontra no estado termodinâmico supercrítico é usado, e isto possibilita um aumento drástico, da solubilidade de certos compostos. O que a torna atrativa e promissora para a separação de modo seletivo. A figura 5 apresenta um esquema básico de um extrator com CO<sub>2</sub> supercrítico.



**Figura 5:** Esquema de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

### 1.2.1.5 – Extração com Óleos Vegetais

Realizado pela imersão da semente em óleo vegetal comestível e refinado para produzir uma solução oleosa de bixina, que é então aquecida e filtrada. O filtrado é comercializado como um corante para alimentos rico em lipídios. Tal extrato apresenta em média 1,5% de bixina. Tal processo tem que considerar a relação entre tempo/temperatura, uma vez que o aquecimento pode gerar compostos de degradação da bixina, os quais normalmente tendem a aumentar a intensidade da cor amarela do extrato. O esquema abaixo descreve as etapas para a produção de extratos oleosos de urucum<sup>26</sup>.



**Figura 6:** Sequência das etapas do processamento para produção de extratos oleosos de urucum<sup>26</sup>.

#### 1.2.1.6 – Extração com Solventes

A bixina presente na semente de urucum pode ser extraída por meio de solventes orgânicos ou soluções alcalinas. Na literatura são encontrados vários processos de extração de corantes de urucum utilizando diferentes solventes orgânicos como etanol, acetona, cloreto de etila e outros<sup>52,61,66-68</sup>.

INGRAM e FRANCIS<sup>69</sup> aplicaram dois métodos para a extração dos pigmentos das sementes de urucum. O primeiro consiste na produção de uma massa através da extração por solvente orgânico seguida de purificação, precipitação e cristalização para obtenção da bixina pura; segundo refere-se à produção de um concentrado em bixina através da extração com óleo vegetal ou propilenoglicol a 125 °C.

BHALKAR e DUBASH<sup>70</sup> avaliaram diferentes métodos de extração, onde eram utilizados água, álcali e solventes orgânicos. Eles concluíram que a extração com solvente orgânico é a metodologia mais simples e eficiente.

CARVALHO<sup>66</sup> apresentou dois processos para extração dos pigmentos das sementes de urucum. O primeiro utiliza solventes orgânicos

que tenham propriedade de solubilizar a bixina. O segundo utiliza solventes alcalinos para obtenção da norbixina; estes processos permitiram obter um produto concentrado em até 50% em pigmentos do urucum.

SILVA et al.<sup>71</sup> estudaram a extração dos pigmentos das sementes de urucum em leito fixo com solventes nos estados líquido e vapor, sendo que o rendimento da extração foi maior usando solvente com temperatura acima do ponto de ebulição. Testaram vários solventes, sendo que os mais eficientes foram o clorofórmio, a acetona, o éter etílico e o etanol. Neste trabalho, constataram que abaixo de 80° C a degradação da bixina pelo calor é desprezível. Verificaram também que na extração dos pigmentos com as sementes trituradas o rendimento não aumentou, além do inconveniente do arraste de impurezas pelo solvente.

PIMENTEL<sup>72</sup> aplicou a precipitação ácida para purificar os extratos das sementes de urucum obtidos através de hidróxido do potássio 0,1N e hidróxido de amônia 0,52N em etanol a 58%. Os produtos purificados apresentaram maiores teores para a extração com hidróxido de amônia e etanol os quais foram obtidos na forma líquida, pasta ou pó.

ALVES<sup>61</sup> estudou a extração dos corantes utilizando água e etanol como solventes e com agitação mecânica. A extração mais eficiente se deu com etanol como solvente, alcançando extratos com teores de 32%, calculando como norbixina, e um rendimento de extração de 79%.

#### **1.2.1.7 - Extração com Soluções Alcalinas**

Processo industrial mais simples e mais usado para a produção de corantes de urucum. Considera o fato de que o pigmento (bixina) não é

solúvel em água, exceto quando em meio alcalino, onde pode ocorrer a saponificação do pigmento, levando a formação da norbixina que é o pigmento hidrossolúvel, devido a perda do grupo metila por hidrólise alcalina da bixina. Comumente, os hidróxidos de sódio ou potássio (NaOH ou KOH) são os mais utilizados, mas também podem ser aplicados o hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) e carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)<sup>26</sup>.

A reação de saponificação da bixina em norbixina ocorre em valores de pH acima de 10 e é dependente, em grande parte, da concentração e tipo da base utilizada, e em menor extensão, do tempo e da temperatura de extração. De modo geral quanto mais concentrada a base, mais completa será a reação de saponificação. Quanto ao tipo da base, algumas proporcionam uma reação completa, enquanto outras oferecem uma reação parcial. Normalmente, um maior tempo de extração provoca uma maior conversão da bixina, porém pode ocasionar degradação do composto. Com relação à elevação da temperatura, não tem grande influência na reação de conversão e leva a um aumento do rendimento de extração, o que percebe-se claramente com o aumento da temperatura de extração há uma maior conversão dos compostos da forma cis para a trans<sup>26</sup>.

Na extração e no processamento do pigmento de urucum, vários produtos de rearranjo ou degradação podem ser formados<sup>26</sup>. A hidrólise alcalina da bixina leva a formação do ácido dicarboxílico livre (norbixina), que, da mesma forma que a bixina, pode existir na forma cis ou trans. Todos esses compostos têm valor como corante para alimentos e podem estar presentes num extrato ou em formulação de urucum, dependendo de como ele tenha sido preparado. O método de obtenção empregado poderá

determinar os produtos alimentícios em que o corante poderá ser utilizado. Algumas dificuldades de aplicação desses corantes em sistemas alimentícios podem surgir quando tem-se um meio mais ácido, devido a reprotonação do norbixinato que leva a formação da norbixina, que é um ácido dicarboxílico de menor solubilidade em água, de modo a ter-se à precipitação do pigmento. Porém tal problema é normalmente contornado devido a utilização de emulsificantes<sup>26</sup>.

As reações químicas sofridas pela bixina na produção do corante urucum com soluções alcalinas são apresentadas abaixo.

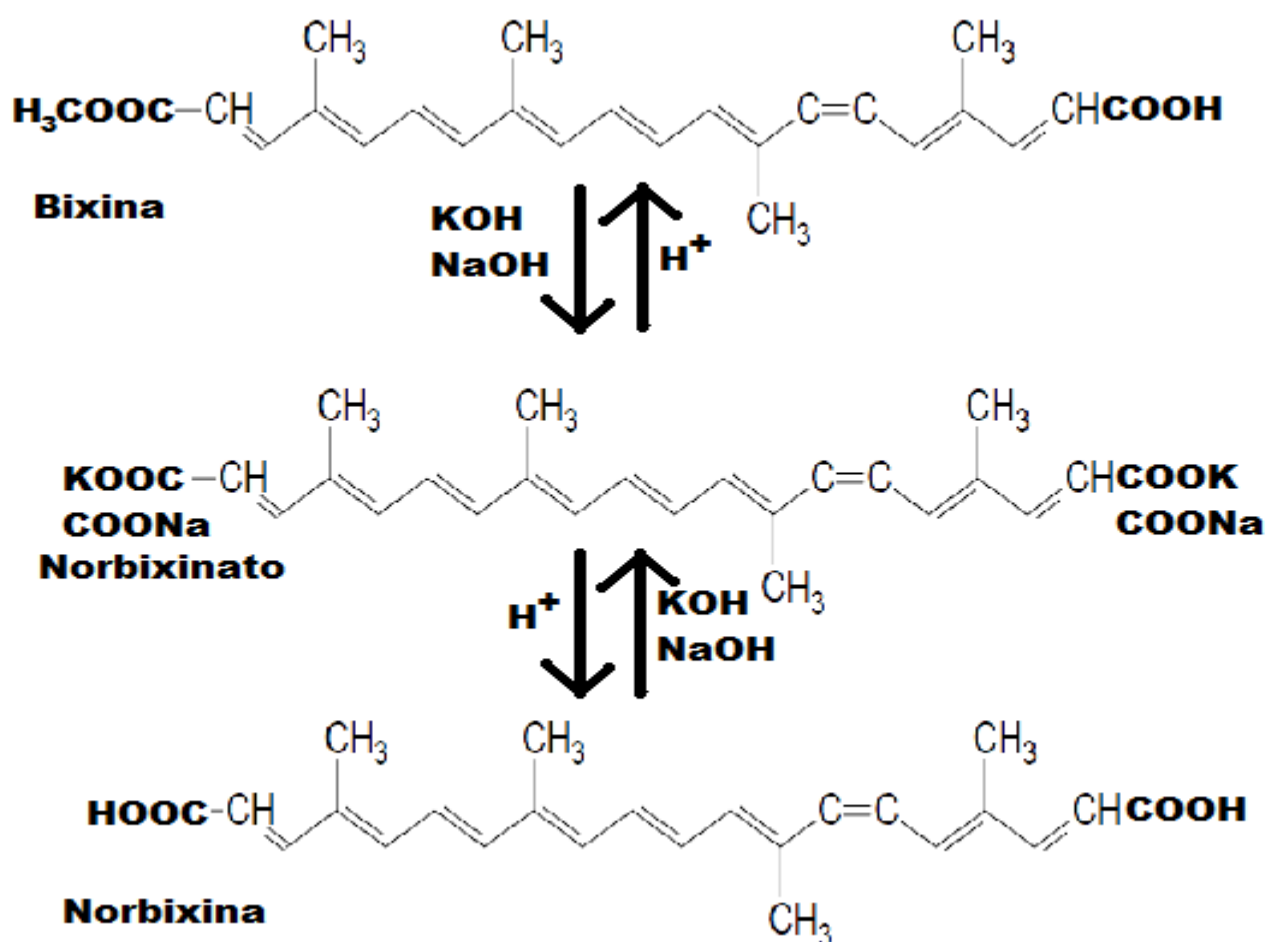


Figura 7: Reações químicas para obtenção do corante (norbixina) de urucum utilizando soluções alcalinas<sup>26</sup>.

#### **1.2.1.8 – Precipitação Ácida**

O extrato é acidificado como um ácido orgânico permitido pela legislação, para um valor de pH até aproximadamente 4,0, sendo posteriormente centrifugado. O extrato acidificado passará, então, por um filtro prensa ou por uma centrífuga, onde será recolhido o corante precipitado, descartando-se o sobrenadante. O corante precipitado deve ser submetido à secagem em estufa a vácuo e posteriormente homogeneizado, acondicionado em saco de polietileno de alta densidade e armazenado até a comercialização<sup>26</sup>.

Os métodos mais eficientes e econômicos de extração do corante de urucum, envolve a sua lixiviação com solução alcalina, seguida de neutralização e precipitação ácida do extrato. Onde a etapa de extração é realizada a quente com carbonato de sódio e, após a filtração, o extrato é centrifugado para a remoção dos sobrenadantes. Outro método para a obtenção da norbixina, consiste na agitação das sementes em meio alcalino (NaOH a 2%), seguida do ajuste do pH para 1,8 com HCl. Após a precipitação e centrifugação dos extratos de urucum, o pigmento é lavado e centrifugado novamente<sup>26</sup>.

#### **1.2.1.9 – Secagem por atomização em “Spray-dryer”**

Para tal método o extrato centrifugado contendo norbixinato de potássio, de sódio ou de amônio, de acordo com o solvente de extração utilizado, deve ter seu pH corrigido para 8,0 com adição de um ácido orgânico. Em seguida, pode ser adicionado de maltodextrina até se atingir

20% de sólido totais. Os extratos, antes de serem desidratados devem ser submetidos ao aquecimento até atingirem a temperatura de 40 °C, para facilitar a sua atomização no equipamento “spray-dryer”<sup>26</sup>.

Após secagem, os corantes na forma de pó contidos nos recipientes coletores do spray-dryer serão resfriados até a temperatura ambiente. Em seguida, serão homogeneizados, podendo ser acondicionados em sacos de polietileno de alta densidade, e armazenados até a comercialização.

É crescente a demanda pelo extrato do urucum hidrossolúvel na sua forma em pó, principalmente pela alta intensidade de cor, fácil manuseio e transporte e maior estabilidade durante a estocagem, além de serem úteis em produtos secos como em sopas desidratadas e misturas em pó. A secagem utilizando o equipamento “spray-dryer” se baseia na atomização ou pulverização da matéria-prima a ser desidratada em partículas diminutas, que caem dentro de uma câmara especial sob ação do ar a temperaturas elevadas, o que produz a evaporação da água presente no produto. O grande aumento da superfície de contato dado pela pulverização ou atomização possibilita a evaporação da parte líquida em questão de segundos, impedindo que o produto sofra alterações<sup>26</sup>. Este processo oferece condições de controle sobre a densidade do produto, sua capacidade de reconstituição, taxa de escoamento, temperatura e umidade do ar de secagem. O teor de umidade do produto final dependerá da taxa de evaporação e do teor de umidade inicial do extrato.

### **1.3 – Procedimentos Analíticos Utilizados na Análise da bixina/norbixina**

A quantificação do teor dos extratos de urucum comercial pode ser determinado a partir de alguns métodos analíticos de quantificação tais como: espectrofotometria UV-Vis, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em camada delgada e cromatografia em papel.

#### **1.3.1 – Métodos Espectrofotométricos**

A bixina e seus isômeros têm uma absorvância máxima à cerca de 500 nm e 470 nm em clorofórmio, enquanto que os pigmentos de degradação amarelos apresentam uma absorvância máxima à cerca de 404 nm e 428 nm (em clorofórmio) e não absorvem a 500 nm. Dessa forma análises do espectro a 500 nm e 404 nm podem determinar ambos o conteúdo total de pigmentos e o conteúdo de bixina do extrato<sup>50,73</sup>.

YABIKU e TAKAHASHI<sup>74</sup> descreveram métodos para a determinação de bixina e norbixina. Para a determinação de bixina, utilizaram clorofórmio como solvente, leitura a 470 nm e para o cálculo da concentração utilizaram o coeficiente de extinção  $E^{1\%}_{1\text{cm}}=2826$ . Já para a norbixina, utilizaram soluções de hidróxido de potássio a 5% e 0,5%, leitura a 423 nm e para o cálculo da concentração  $E^{1\%}_{1\text{cm}}= 3473$ .

KATO et al.<sup>75</sup> utilizaram um método para determinação de bixina/norbixina nas sementes que consiste na extração da norbixina em meio alcalino, utilizando uma solução 0,1N de hidróxido de sódio. Após a extração, filtração e centrifugação, foi feita uma diluição apropriada para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda correspondente a 480

nm e um coeficiente de extinção de 2870, para obtenção do percentual de norbixina. A este percentual foi multiplicado o fator de conversão igual a 1,037 para obtenção do percentual de bixina, o mesmo utilizado por YABIKU e TAKAHASHI.

### **1.3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A cromatografia líquida de alta eficiência permite algumas vantagens no que diz respeito à degradação da amostra durante a análise, evitando alguns problemas como a decomposição fotoquímica, oxidativa e térmica aos quais os pigmentos estão sujeitos na cromatografia de camada delgada<sup>76</sup>. A degradação térmica é evitada, pois a separação pode ser realizada a baixas temperaturas.

ROUSEFF<sup>73</sup> apresentou um método de separação por HPLC para determinação de pigmentos em corantes para alimentos, urucum e *turmeric*. ALVES<sup>61</sup> conseguiu reduzir o tempo de análise utilizando a mesma metodologia desenvolvida por ROUSEFF (1988) alterando apenas o tipo de coluna.

Os pigmentos no urucum e *turmeric* são razoavelmente hidrofóbicos pois são fortemente retidos em uma fase estacionária não polar tal como C<sub>18</sub><sup>76</sup>. Experimentos utilizando como solvente água:tetrahidrofurano forma os que produziram melhor resolução e forma do pico.

### **1.3.3 – Cromatografia em Camada Delgada**

Diversos métodos de cromatografia em camada delgada têm sido desenvolvidos. O método utilizado por PRESTON e RICKARD<sup>52</sup> foi

desenvolvido para isolar e identificar os principais componentes nas preparações comerciais de extrato de urucum e ajudar em estudos do destino metabólico dos pigmentos de urucum no rato e no homem.

ARIMA et al.<sup>77</sup> testaram dois tipos de placas: cromatoplasmas de sílica gel 60 (sem indicador fluorescente) e cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 com zona de concentração. Várias combinações de fase móvel foram testadas e as mais eficientes foram éter etílico 5% em éter de petróleo e éter etílico 50% em éter de petróleo.

#### **1.3.4 – Cromatografia em Papel**

McKEOWN<sup>78</sup> descreveu um método para a separação da bixina e compostos relacionados, utilizando a cromatografia em papel. Foram estudados a bixina lábil (forma cis), a norbixina lábil, a metilbixina lábil e seus correspondentes isômeros estáveis (forma trans). Impregnou-se a tira com uma solução de 50% (v/v) de N,N-dimetilformamida (DMF) em acetona, deixou-se secar ao ar por 10 minutos. Em seguida, gotejou rapidamente na linha previamente marcada, 2 microlitros de uma solução 0,2% de Oil Yellow AB (1-fenil-azo-2-naftilamina) em DMF para referência, e 2 microlitros de soluções de bixina as quais se quer analisar. Desenvolve-se o cromatograma por fluxo descendente, utilizando ciclohexano-clorofórmio-DMF-ácido acético na proporção 85:10:3:2 por cerca de três horas. Determina-se o fator de retenção das amostras de interesse.

#### 1.4 – Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

Sistemas contendo duas ou mais fases líquidas em equilíbrio termodinâmico são muito úteis para aplicações em extração e/ou purificação de compostos presentes em inúmeros processos tecnológicos<sup>79,80</sup>. Porém, para a aplicação desta técnica de extração líquido-líquido para obtenção de compostos com importância biotecnológica (proteínas, enzimas, células, vírus, organelas, etc.), faz-se necessária a utilização de sistemas em que as duas fases guardem semelhanças, em termos das propriedades físico-químicas, com o meio aquoso presente nos seres vivos<sup>81</sup>. Neste sentido, os sistemas denominados aquosos bifásicos (SAB ou, em inglês, ATPS) desempenham um papel estratégico pois, as duas fases são formadas predominantemente (60-95 %) por água<sup>82</sup>. Dessa forma, os SAB podem ser utilizados como uma nova tecnologia de extração líquido-líquido eliminando por completo a utilização de solventes orgânicos tóxicos, inflamáveis e voláteis. A eliminação destes compostos tem o potencial de revolucionar muitos processos industriais reduzindo drasticamente a poluição de rios e aumentando a segurança do processo.

Os SAB são sistemas líquidos bifásicos formados pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros quimicamente distintos, ou pela combinação de uma solução aquosa de um polímero e uma solução aquosa de certos tipos de eletrólitos<sup>83</sup>. Estes sistemas, em determinadas faixas de temperatura, pressão e composição, apresentam-se com duas fases, isto é, duas regiões com propriedades termodinâmicas intensivas distintas. A fase superior é enriquecida com polímero (FS) e a inferior (FI) com eletrólito, sendo a água, o componente presente em maior concentração nas duas

fases.

O estado termodinâmico de um sistema aquoso bifásico pode ser representado graficamente por um diagrama de fase como ilustrado na figura 8. As concentrações do polímero são representadas no eixo das ordenadas e as concentrações do sal no eixo das abcissas, e são representadas normalmente em % (m/m). A linha binodal (figura 8) é formada por pontos cujas coordenadas são as mínimas concentrações de sal e de polímero, nas quais o sistema apresenta-se como duas fases em equilíbrio termodinâmico. Abaixo da linha binodal tem-se a região onde o sistema se apresenta como monofásico, e acima, a região na qual tem-se 2 fases. Uma mistura com a composição global representada pelo ponto G, como mostrado na Figura 8, separa-se espontaneamente em duas fases, com composições representadas pelos pontos FS e FI, que expressam as composições das fases superior e inferior, respectivamente. A linha que une os pontos FS, G e FI, é conhecida como linha de amarração LA. Na figura 8 são mostrados três sistemas com composições globais diferentes P1, P2 e G, localizados em linhas de amarrações diferentes.



p constantes,  $dG = 0$  e o potencial químico de cada componente terá um único valor em ambas as fases e também na interface <sup>13</sup>.

$$\mu_{\text{pol}}^{\text{FS}} = \mu_{\text{pol}}^{\text{FI}} = \mu_{\text{pol}}^{\text{IF}}; \quad \mu_{\text{sal}}^{\text{FS}} = \mu_{\text{sal}}^{\text{FI}} = \mu_{\text{sal}}^{\text{IF}}; \quad \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{FS}} = \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{FI}} = \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{IF}} \quad (1)$$

em que,  $\mu_i^{\text{FS}}$ ,  $\mu_i^{\text{FI}}$  e  $\mu_i^{\text{IF}}$  são os potenciais químicos do componente “i” nas fases superior, inferior e na interface, respectivamente.

As propriedades termodinâmicas intensivas, de cada fase em equilíbrio, resultaram das contribuições de cada componente e de suas interações intermoleculares. Além disso, essas propriedades dependerão da pressão e da temperatura. Estas últimas estando fixas, as propriedades termodinâmicas intensivas dependerão apenas da atividade,  $a_i$ , dos componentes formadores de cada fase. O comprimento da linha de amarração (CLA) é um parâmetro que define a diferença entre as composições das fases inferior e superior e, portanto, expressam a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases. A equação 2 representa a definição matemática do CLA.

$$\text{CLA} \equiv \left[ \left( C_{\text{pol}}^{\text{FS}} - C_{\text{pol}}^{\text{FI}} \right)^2 + \left( C_{\text{sal}}^{\text{FS}} - C_{\text{sal}}^{\text{FI}} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

em que,  $C_{\text{pol}}$  e  $C_{\text{sal}}$  são as concentrações de polímero e sal nas fases superior e inferior, respectivamente.

Quando composições globais diferentes de um SAB pertencerem a uma mesma linha de amarração, as concentrações das fases superior e inferior, em equilíbrio termodinâmico, serão sempre iguais e o CLA não se altera. Quanto menor for o CLA, menor será a diferença entre as

propriedades intensivas das fases. No limite em que o CLA tende a zero, a composição das duas fases tende a um ponto, chamado de ponto crítico (PC), no qual existiriam, hipoteticamente, duas regiões distintas com propriedades termodinâmicas intensivas iguais.

Os sistemas aquosos bifásicos são conhecidos desde o final do século XIX. Sendo Beijerinck<sup>84,85</sup> em 1896 o primeiro a observar a formação de tais sistemas ao misturar soluções aquosas de ágar e gelatina e amido solúvel.

Estudos posteriores realizados por Ostwald e Hertel<sup>86,87</sup>, sobre esses sistemas mostraram a influência que alterações intermoleculares produzem sobre as composições das fases em equilíbrio.

Como citado anteriormente, uma das características mais destacáveis dos SAB é o fato de o componente majoritário em ambas as fases ser a água. Esta característica possibilitou a primeira aplicação real dos sistemas aquosos bifásicos feita pelo sueco Per-Åke Albertsson em 1956<sup>88</sup>. Este pesquisador visava desenvolver uma metodologia para extrair e concentrar biopartículas: proteínas, células, etc. Desde então ficou evidenciado a potencialidade dos SAB em extrair e concentrar biomateriais, como pode ser observado na tabela 5<sup>89</sup>. Este sucesso é devido ao fato da alta concentração de água em ambas as fases simular o ambiente natural dos materiais biológicos, impedindo assim, que suas propriedades sejam alteradas no processo de transferência entre as fases. A partir de 1950 os SAB foram continuamente aplicados para a extração e a purificação de inúmeros materiais biológicos. Sendo os SAB formados pela mistura de poli(óxido de etileno) + fosfato + água são os sistemas aquosos bifásicos do tipo

polímero/eletrólito mais utilizados. Já aqueles formados pela mistura de dois polímeros têm-se o exemplo do SAB formado por PEO + dextrana + água como sendo os mais aplicados. A vantagem do primeiro em relação ao segundo é o fato de ter uma menor viscosidade, um menor custo, e menor tempo de separação das fases <sup>90</sup>.

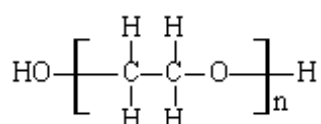
**Tabela 5:** Alguns biossolutos e os SAB nos quais foram particionados<sup>89</sup>.

Biossoluto	Sistema Aquoso Bifásico	
	Polímero 1	Polímero 2 (ou sal)
β-Ig, antripsina, caseína	PEO <sup>a</sup>	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ou MgSO <sub>4</sub>
Amiloglucosidase	PEO	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Albumina bovina	Dextrana	Ficoll, tampão fosfato
Albumina humana (HSA)	Dextrana	Ficoll
Insulina	PEO	Dextrana, tampão citrato-fosfato
Insulina	PEO-PPO-PEO <sup>b</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Cisteína, Fenilalanina, metionina e lisina	PEO	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Proteínas anticorpos	PEO	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Morfina	PEO	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Protease de <i>Bacillus Subtilis</i>	PEO	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Testosterona e Epitestosterona	[C4mim]Cl <sup>c</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , KOH, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e NaOH
Lisoenzima	PEO	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
β-glucosidae	PEO	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
α-Ig, β-Ig e α-I antripsina	PEO	Citrato de Sódio
Rotavírus	PEO	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<sup>a</sup>PEO (polióxido de etileno) / <sup>b</sup>(polióxido de etileno)-(polióxido de propileno)-(polióxido de etileno) / <sup>c</sup>Cloreto d 1-Butil-3-metilimidazólico

Devido à vasta utilização do polímero poli(óxido de etileno), PEO, em SAB, torna-se útil uma breve apresentação de sua estrutura e de seu

comportamento em solução aquosa. O PEO é formado pela repetição das unidades óxido de etileno (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-). A Figura 5 mostra a fórmula estrutural desta macromolécula. O poli(óxido de etileno) também pode ser chamado de poli(etilenoglicol), PEG, uma vez que o polímero pode ser produzido a partir do etilenoglicol. Não existe uma definição clara em relação ao emprego dos nomes poli(óxido de etileno) ou poli(etilenoglicol), assim o nome é dado de forma arbitrária. Geralmente o nome PEO é empregado para massas molares mais elevadas e PEG para menores.



**Figura 9.** Fórmula estrutural da unidade repetitiva óxido de etileno,  $n$  é o grau de polimerização definido por,  $n \equiv \frac{\langle M_{\text{macr}} \rangle}{\langle M_{\text{unimer}} \rangle}$ , sendo  $M_{\text{macr}}$  a massa molar média numérica da macromolécula e  $M_{\text{unimer}}$  a massa molar da unidade monomérica.

O oxigênio da cadeia do PEO age como um doador de elétrons, interagindo assim, fortemente com os átomos de hidrogênio das moléculas de água, fazendo com que as moléculas poliméricas sejam estabilizadas pelas moléculas de hidratação. As fortes interações intermoleculares entre os segmentos EO e as moléculas de água, fazem com que as macromoléculas não adquiram conformações, em solução, completamente aleatórias. Evidências experimentais, baseadas na solubilidade deste polímero em água e nos efeitos de hidratação, servem de suporte para esta proposta de forte interação<sup>91</sup>.

Modelos termodinâmicos têm sido propostos no sentido de prever os diagramas de fase em função dos seus constituintes (polímero ou polímeros formadores, e eletrólitos). Estas predições, no entanto, não suprem a demanda por novos SAB com propriedades extrativas que se apliquem aos mais variados solutos orgânicos e inorgânicos. Os modelos mais conhecidos e utilizados baseiam-se no modelo de expansão osmótica do viral fundamentados na teoria de McMillan-Mayer<sup>92,93</sup>, no modelo da teoria de rede aplicada à polímeros em solução tais como a teoria de Flory-Huggins<sup>94,95</sup> e modelos baseados na correlação do coeficiente de partição com parâmetros termodinâmicos de hidratação<sup>96</sup>.

#### **1.4.1. Aplicação dos SAB na purificação de corantes**

Existem na literatura poucos relatos sobre a utilização de SAB no estudo de partição/purificação de corantes seja de origem natural ou sintética. Com a descoberta de um novo sistema aquoso bifásico formado por misturas de surfactantes catiônicos e aniônicos por Zhao e Xiao em 1996<sup>97</sup>, alguns trabalhos foram conduzidos no sentido de estudar processos de purificação de corantes e de compostos porfirínicos. Tong Li e Akama em 1996<sup>98,99</sup> estudaram a propriedade extratora de SAB formados por surfactante catiônico (brometo de dodeciltrietilamônio, C<sub>12</sub>NE) e surfactante aniônico (dodecil sulfato de sódio, SDS), ao particionar porfirinas e metaloporfirinas(84), bem como tripsina e corante orgânicos. Os resultados mostraram que os compostos carregados (clorofila; violeta de metila e laranja de metila, pH>7) foram extraídos de forma eficiente na fase superior, enquanto que o laranja de metila (pH<3) na sua forma anfótera se distribuiu

uniformemente entre as duas fases. Os autores concluíram que, exceto pela força hidrofóbica, as interações de carga entre soluto e surfactantes exercem um papel importante nos processos de extração.

Outro sistema aquoso bifásico formado por perfluorooctanoato de sódio (SPFO do inglês) e brometo de dodeciltrietilamônio ( $C_{12}NE$ ) foi relatado por Tong et. al. em 1999<sup>100</sup> e utilizado para particionar corantes e compostos porfirínicos. As moléculas com características hidrofóbicas foram extraídas na fase inferior do sistema rica em surfactante em alta eficiência. As porfirinas positivamente carregadas foram extraídas também na fase inferior com maior eficiência de extração do que aquelas com carga residual negativa.

Visser et. al.<sup>101</sup> usaram quatro corantes baseados em naftol ou resorcinol; 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), 1-(tiazolilazo)-2-naftol (TAN), 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR) e 4-(2-tiazolilazo)-resorcinol (TAR), cada qual incorporando um naftol ou resorcinol com um grupo funcional orto azo, para atuarem como extractantes de íons metálicos em SAB como uma função do pH. Fernandez e Hatti-Kaul<sup>102</sup> investigaram a afinidade de extração de corantes e de proteínas ligadas a íons metálicos, respectivamente, em SAB formado por polivinilpirrolidona (PVP40)-Reppal PES 100.

Recentemente, Mageste et al.<sup>103</sup> estudou o comportamento de partição do corante natural Carmine nos SAB preparados pela mistura de polímero ou copolímero com soluções de  $Na_2SO_4$  e  $Li_2SO_4$ , sendo investigado o efeito do pH, massa molar do polímero, hidrofobicidade, comprimento da linha de amarração (CLA) e natureza do eletrólito, sobre a distribuição do corante entre as fases do sistema. No estudo foi verificado a

distribuição preferencial do corante para a fase superior em todos os casos, ocorrendo uma maior concentração quando o íon  $\text{Li}^+$  era o cátion formador do SAB.

## **2. JUSTIFICATIVA**

É crescente a demanda em diversos setores industriais por corantes de origem natural para substituir aqueles de origem sintéticas, visto que os primeiros apresentam uma maior aceitação pelos consumidores e órgãos regularizadores em detrimento ao último. Dentro desse cenário os corantes provenientes do urucum destacam-se devido principalmente a sua ampla gama de aplicações e versatilidade, tornando o urucum o corante mais utilizado no mundo. E neste cenário o Brasil aparece como o maior produtor de urucum correspondendo por aproximadamente 70% de todo urucum produzido no mundo.

Os métodos rudimentares aplicados para obtenção dos pigmentos do urucum tendem a ser substituídos por processos mais elaborados visando, não só reduzir os custos de processamento, mas também para agregar valor ao produto final<sup>16</sup>. As técnicas de extração em sua maioria geram um concentrado bruto no qual a bixina/ norbixina encontra-se em baixa concentração tornando necessárias a elaboração e otimização de novas técnicas de extração que permitam obter um produto final de melhor qualidade. Disponibilizar no mercado tais corantes com elevada pureza, é de suma importância para uma expansão comercial, uma vez que isso possibilita atender aos segmentos industriais de maior tecnologia.

Os processos atuais em uso no Brasil baseiam-se na extração mecânica e/ou empregando solventes (óleos vegetais, solução alcalina,

acetona, hexano, etanol, propilenoglicol), porém em alguns extratos, a bixina/norbixina encontra-se misturada a outros componentes extraídos da semente. Neste contexto torna-se necessário a utilização de técnicas que sejam mais específicas, e os sistemas aquosos bifásicos (SAB) surgem como uma nova tecnologia de extração líquido-líquido<sup>36</sup> eliminando desvantagens apresentadas pelas técnicas de extração líquido-líquido tradicionais. Tal potencialidade pode ser visto nos diversos trabalhos que utilizam os SAB para separação/purificação dos mais diversos tipos de materiais (moléculas simples, metais pesados, proteínas, células, corantes naturais, etc.)<sup>103</sup>.

Dessa forma o presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo termodinâmico do comportamento de partição do extrato de urucum em diversos SAB. Onde será avaliado a influência de algumas características intrínsecas de seus componentes (massa molecular e hidrofobicidade do polímero, tipo do ânion, composição do sistema e pH do meio) sobre a distribuição da norbixina entre as fases dos sistemas, para proporcionar um melhor entendimento desse fenômeno e apresentar os SAB como um técnica eficaz e ambientalmente correta para obtenção de corantes naturais.

## REFERÊNCIAS

1. S. Zarringhalami, M.A. Sahari, Z. Hamidi-Esfehani; *Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage*; Meat Science **81** (2009) 281–284;
2. F. Zsila, P. Molnár, J. Deli, S. F. Lockwood, *Circular dichroism and absorption spectroscopic data reveal binding of the natural cis-carotenoid bixin to human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein.*, Bioorganic Chemistry **33** (2005) 298-309;
3. M. D. Méndez-Robles, H. H. Permady, M. E. Jaramillo-Flores, E. C. Lugo-Cervantes, A. Cardador-Martinez, A. A. Canales-Aguirre, F. López-Dellamary, C. M. Cerda-Garcia-Rojas, and J. Tamariz; *C-26 and C-30 Apocarotenoids from Seeds of *Ditaxisheterantha* with Antioxidant Activity and Protections against DNA Oxidative Damage*; J. Nat. Prod.; **69**, (2006) 1140-1144;
4. V. Galindo-Cuspinera and S. A. Rankin; *Bioautography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts*; J. Agr. Food Chem.; **53** (2005) 2524-2529;
5. G.R. M. Barcelos, J. P. F. Angeli, J. M. Serpeloni, B. A. Rocha, M. S. Mantovani, L. M. G. Antunes, *Effect of Annatto on Micronuclei Induction by Direct and Indirect Mutagens in HepG2 Cells*; Environmental and Molecular Mutagenesis, **50** (2009); 808-814;
6. N. Takahashi, T. Goto, A. Taimatsu, K. Egawa, S. Katoh, T. Kusudo, T. Sakamoto, C. Ohyane, Joo-Young Lee, Young-il Kim, T. Uemura, S. Hirai, T. Kawada; *Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L adipocytes through PPAR gamma activation*; Biochemical and Biophysical Research Communications; **390** (2009) 1372-1376;
7. R. Parimalan, P. Giridha, T. Rajasekaran, and G. A. Ravishankar; *Annatto Fruit Pericarp: Newer Source as a Potencial Fuel*; Energy & Fuels; **21** (2007) 1181-1182;
8. N.M. Gómez-Ortiz, I. A. Vázquez-Maldonado, A. R. Pérez-Espadas, G. J. Mena-Rejón, J. A. Azamar-Barrios, G. Oskam; *Dye-sensitized*

- solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds; *Solar Energy Materials and Solar Cells*; **94** (2010) 40-44;
9. L. J. G. Faria and S. C. S. Rocha, *Optimization of Annatto (Bixa Orellana L.) Drying in Fixed Bed*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **17** (2000) 483-495;
  10. G. F. Silva, *Extração de Pigmentos do Urucum com CO<sub>2</sub> Supercrítico. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos*, Engenharia de Alimentos/FEA/ UNICAMP, Campinas (1999);
  11. C. Bittencourt, M. P. Felicissimo, J. J. Pireaux, and L. Houssau; *ToF-SIMS Characterization of Thermal Modifications of Bixin from Bixa orellana Fruit*, *J. Agric. Food Chem.*; **53** (2005) 6195-6200;
  12. K. Balaswamy, P. G. Prabhakara Rao, A. Satyanarayana, D. G. Rao; *Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage*; *LWT*; **39** (2006) 952-956;
  13. G. Silva, A. Souza, J. Botelho, M. Silva, T. Silva; *Kinetics study of norbixin's first stage thermal decomposition, using dynamic method*; *J. Thermal Analysis and Calorimetry*; **87** (2007) 871-874;
  14. L. J. G. Faria, *Análise Experimental do Processo de Secagem de Urucum (Bixa Orellana L.) em Leito Fixo. Tese de Doutorado em Engenharia Química*, FEA/UNICAMP, Campinas, (1998);
  15. S. V. Najar, F. O. BOBBIO, and P. A. BOBBIO, *Effects of light, Air, Anti-oxidants and Pro-Oxidants on Annatto Extracts (Bixa Orellana)*. *Food Chemistry*, **29** (1988) 283-289;
  16. R. W. Alves, A. A. U. de Souza, S. M. A. G. U. de Souza, P. Jauregi; *Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas apheresis (CGAs)*; *Separation and Purification Technology*; **48** (2006) 208-213;
  17. F. E. Lancaster; J. F. Lawrence; *High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid,  $\alpha$ -e- $\beta$ -bixina, e  $\alpha$ -e- $\beta$ -norbixina, and the determination of carminic acid in foods*, **732** (1996) 394-398.
  18. C. R. Cardarelli, M. T. Benassi, A. Z. Mercadante; *Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties*; *LWT*; **41** (2008) 1689-1693;

19. S. A. B. Vieira de Melo, G. M. N. Costa, A.C.C. Viana, F. L.P. Pessoa; *Solid pure component property effects on modeling upper crossover pressure for supercritical fluid process synthesis: A case study for the separation of Annatto pigments using SC-CO<sub>2</sub>*; *Journal of Supercritical Fluids*; **49** (2009) 1-8;
20. G. Giuliano, C. Rosati, and P. M. Bramley P. M.; *To Dye or Not to Dye: Biochemistry of Annatto Unveiled, Trends in Biotechnology*, **21**(2003) 513-516;
21. M. P. Sandi, Cuen, Bacerra, Rosalba, *Biodiversitas, El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ano 7, nº 46, 7-11, enero 2003.*
22. Catálogo rural:  
www.agrov.com/vegetais/fru/aromáticas\_medicinais.htm
23. K. Aparnathi, R. Lata, R. Sharma, *Annatto (Bixa orellana L.): its cultivation preparation and usage. Int. J. Trop. Agric.* **8**( 1990) 80–88;
24. M. J. Scotter, S. A. Thorpe, S. L. Reynolds, L.A. Wilson, and P. R. Strutt; *Characterization of the Principal Colouring Components of Annatto Using High Performance Liquid Chromatography with Photodiode-Array Detection*; *Food Additives and Contaminants*, **11** (1994) 301;
25. A. BALIANE, *Cultura do urucueiro. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, 5-16, 1982.*
26. P.C. Stringheta, P.I. Silva; *Pigmentos de Urucum: Extração, Reações Químicas, Usos e Aplicações*; 1ª Ed. Gráfica e Editora Suprema Ltda; Viçosa-MG, 2008.
27. IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em:<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>: Acesso em 12 junho 2010.
28. I. C. FALESI, *Urucuzeiro: Recomendações básicas para seu cultivo. UEPAE, Belém, 1987.*
29. L. M. Antunes, L. M. Pascoal, L. M. P. Bianchi, F. L. Dias, *Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of thecarotenoid bixin in human lymphocyte cultures. Mutat. Res.* **585**,(2005) 113–119;

30. A. C. T. S. Júnior, L. M. B. O. Asad, E. B. de Oliveira, K. Kovary, R. Nasser, N, R. Asad, I. Felzenszwalb; *Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment(norbixin against oxidative stress*. Gen. Mol. Res. **4**(2005) 94–99;
31. J. S. Oliveira; *Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de Compostos de Urucum (Bixa orellana L.)*. Tese de doutorado em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, fevereiro, 2005.
32. T. C. Fleischer; E. P. K. Ameade, M. L. K. Mensah, I. K. Sawyer; *Antimicrobial activity of the leaves and seeds of Bixa orellana*. Fitoterapia **74** (2003), 136.
33. S. F. L. C. Nunes; *Monografia de Especialização*, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, 2001.
34. M. T. L. A. Camargo; *Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros*, Almed: São Paulo, 1988.
35. O. Masucci; *As plantas como remédio na cura de doenças*, Brasilivros: São Paulo, 1982.
36. L. A. Rodrigues; *Resumos do Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, São Paulo, Brasil, 1988;
37. A. Balbach; *As Plantas Curam*, 2a ed, Vida Plena: São Paulo, 1993.
38. B. Y. Weniger; *Planta Med.* 1993, 59, 680.
39. T. J. A. Rêgo; *Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão*, 2a ed. Ed. UFMA: São Luis, 1995.
40. J. A. Shilpi, Md.; Taufiq-Ur-Rahman; S. J. Uddin; Md. S. Alam; S. K. Sadhu; V. Seidel; *Preliminary pharmacological screening of Bixa orellana L. leaves*. Journal of Ethnopharmacology **108** (2006) 264–271.
41. A. B. Cravo; *Frutas e ervas que curam: panacéia vegetal*, 2a ed., Hemus:São Paulo, 1990.
42. G. L. Cruz; *Dicionário de plantas do Brasil*, 5a ed., Bertrand Brasil: Rio de Janeiro, 1995.
43. P. Collins; *The Role of Annatto in Food Colouring*. Food Ingredients & Processing International, (1992) 23-27;

44. WHO/FAO, *Specifications for the Identity and Purity of some Food Colours, Flavour Enhancers, Thickening Agents, and Certain Food Additives*, WHO Food Additives Series, **7** (1976) 3-10.
45. P. Karrer, and E. Jucker; Carotenoids. **Elsevier Publishing Company, Inc.**, 384 p.,1950.
46. F. Bouvier, O. Dogbo, and B. Camara. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). **Science**, Vol. 300, 2089-2901, 2003.
47. I. J. O. Jondiko, and G. Pattenden; *Terpenoids and an Apocarotenoid from Seeds of Bixa Orellana*. *Phytochemistry*, **28**, (1989) 3159-3162;
48. D. M. Marmion; *Handbook of U.S. Colorants: Foods, Drug, Cosmetics, and Medical Devices*. Third Edition, **USA**, 120-122, 1991.
49. M. S. CASTRO; *Influência das Variáveis Operacionais no Processo de Secagem de Urucum*. **Monografia DEQ/UFPA**, Belém, p.90, 1992
50. J. F. Reith and J. W. Gielen; *Properties of Bixin and Norbixin and the Composition of Annatto Extracts*; *Journal of Food Science*; **36** (1971).
51. V. C. Wilberg and D. B. Rodriguez-Amaya; *Quantificação dos Carotenóides de Sementes do Urucum (Bixa Orellana L.) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, **1**(1992) 145-152;
52. H. D. Preston, and M. D. Rickard; *Extraction and Chemistry of Annatto*. *Food Chemistry*, **5** (1980) 47-56;
53. M. J. Scotter; *Characterization of the Coloured Thermal Degradation Products of Bixin from Annatto and a Review Mechanism for their Formation*. *Food Chemistry*, **53** (1995) 177-185;
54. M. J. Scotter, L. A. Wilson, G. P. Appleton and L. Castle; *Analysis of Annatto (Bixa orellana) Food Colouring Formulations. 2. Determination of Aromatic Hydrocarbon Thermal Degradation Products by Gas Chromatography*. *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000) 484-488;
55. M. J. Scotter, L. Castle and G. P. Appleton; *Kinetics and Yields for the Formation of Coloured and Aromatic Thermal Degradation Products of Annatto in Foods*. *Food Chemistry*, **74** (2001) 365-375;
56. M. L. Passos, L. S. Oliveira, A. S. Franca, M. E. A. Freitas, G. Massarani and M. A. S. Barrozo; *Spouted Bed Units for Annatto*

- Powder Production*. The Inter-American Drying Conference (IADC), Itu-SP, 181-188, 1997.
57. P. R. N. Carvalho and M. Hein; *Urucum – Uma Fonte de Corante Natural*. Coletânea ITAL, Campinas, **19**(1), 25-33, 1989.
  58. F. J. R. Paumgarten, R. R. de Carvalho, I. B. Araujo, F. M. Pinto, O. O. Borges, C. A. M. Souza and S. N. Kuriyama;. *Evaluation of the Developmental Toxicity of Annatto in the Rat*. Food and Chemical Toxicology, **40** (2002) 1595-1601;
  59. R. O. A. de Lima, L. Azevedo, L. R. Ribeiro and D. M. F. Salvadori; *Study on the Mutagenicity and Antimutagenicity of a Natural Food Colour (Annatto) in Mouse boné Marrow Cells*. Food and Chemical Toxicology, **41**, (2003) 189-192;
  60. A. Hagiwara, N. Imai, T. Ichihara, M. Sano, S. Tamano, H. Aoki, K. Yasuhara, T. Koda, M. Nakamura and T. Shirai; *A Thirteen-week Oral Toxicity Study of Annatto Extract (Norbixin), a Natural Food Color Extraxted from the Seed coat of Annatto (Bixa Orellana L.), in Sprague-Dawley Rats*. Food and Chemical Toxicology, **41**; (2003) 1157-1164;
  61. R. W. Alves; *Extração e Purificação de Corantes de Urucum. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química*, Engenharia Química/UFSC, Florianópolis, 2001.
  62. G. Massarani, M. L. Passos and D. W. Barreto; *Production of Annatto Concentrates in Spouted Beds*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, **70** (1992) 954-959;
  63. F. Baroncelli, L. S. Oliveira, A. S. Franca and M. L. Passos; *Evaluation of Bixin Thermal Degradation during Drying of Annatto Powder in Spouted Beds*.The Inter-American Drying Conference (IADC), Itu-SP, 158-164, 1997.
  64. I. S. Guimarães, A. L. S. Barbosa and G. Massarani; *Nota sobre a Produção de Concentrados de bixina em Leito de Jorro*. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, **12**(2), 22-23, Abril, 1989.
  65. I.K. Shuhama; M.L. Aguiar, W.P. Oliveira, L.A.P. Freitas; *Experimental Production of Annatto Powders in Spouted Bed Dryer*; Journal of Food Engineering; **59** (2003) 93-97.

66. P. R. N. Carvalho; Extração e Utilização do Corante de Urucum. **UESBA**, Vitória da Conquista, 69-76, 1990.
67. C. Prentice-Hernandez and O. Rusig; Extrato de Urucum (Bixa Orellana L.) obtido Utilizando Álcool Etílico como solvente. **Arq. Biol. Tecnol.**, Campinas, 63-74, março, 1992.
68. K. I. Simpson, I. S. Guimarães, and V. C. Wilberg; Isolation and Purification of Bixin on a C-18 Reverse Phase Column. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Vol. **13**, No. 2, 164-167, 1993.
69. J. S. Ingram and B. J. Francis; The Annatto Tree (Bixa Orellana L.) – A Guide to its Occurrence, Cultivation, Preparation and Uses. **Tropical Science**, Vol. XI, No. 2, 97-102, 1969.
70. S. V. Bhalkar and P. J. Dubash; Methods of Extraction of Annatto from the Seeds of Bixa Orellana. **Indian j, Dairy Sci.**, 36,2, 157-161, 1983.
71. G. F. Silva, S. A. Cavalcanti and M. C. Sobral; Extração de Corantes do Urucum II. **Anais da Associação Brasileira de Química**, 43(1-2), 58-64, 1994.
72. F. A. Pimentel; Avaliação de Métodos de Obtenção e da Estabilidade de Pigmentos de Sementes de Urucum (Bixa Orellana I.) **Tese de Mestrado** em Engenharia de Alimentos, DTS/UFV, Viçosa, 1995.
73. G. G. McKeown and E. Mark; The Composition of Oil-Soluble Annatto Food Colours. **Journal of the A. O. A. C.**, Vol. 45, 761, 1962.
74. H. Y. Yabiku and M. Y. Takahashi; Determinação de bixina em Sementes de Urucum: Estudo Colaborativo. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**, 52 (1/2), 31-36, 1992.
75. O. R. Kato, F. J. C. Figueirêdo, A. J. L. Belfort, O. L. Nogueira and W. C. Barbosa; Época de Colheita de Sementes de Urucum: Emergência e Teors de Corantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **27**(9), 1291-1302, setembro, 1992.
76. R. L. Rouseff; High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the Pigments in Turmeric and Annatto. **Journal of Food Science**, Vol. **53**, No. 6, 1823-1826, 1988.
77. H. K. Arima, E. Angelucci and S. V. M. Mattos; Urucum II – Comparação de Métodos Cromatográficos para Separação dos Carotenóides. **Col ITAL**, **11**, 97-106, 1980.

78. G. G. Mckeown; *Paper Chromatography of Bixin and Related Compunds*. Journal of the A. O. A. C., **44** (1961) 347-351;
79. M. E. Silva, T. T. Franco; *Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - A review paper*. Braz. J. Chem. Eng. 2000, **17**, 1.
80. A. Pessoa, B. V. Kolikian; *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, Manole: São Paulo, 2005.
81. K. Selber, F. Tjerneld, A. Collen, T. Hyytia, T. Nakari-Setala, M. Bailey, R. Fagerstrom, J. Kan, J. van der Laan, M. Penttila, M. R. Kula; *Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems*; Process Biochem. **39**, (2004) 889-896
82. L. H. M. da Silva, W. Loh; *Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações para Partição/Purificação de Proteínas*. *Quim. Nova*, Vol. **29**, No. 6, 1345-1351, 2006.
83. N. P. Marhual, N. Pradhan, R. N. Kar, L. B. Sukla, B. K. Mishra; *Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample*; Bioresource Technology **99** (2008) 8331-8336.
84. A. Sandhibigraha, P. V. R. B. Sarma; *Co-extraction and seletive stripping of copper and nickel using LIX87QN*; Hydrometallurgy **45** (1997) 211-219.
85. F. J. Alguacil, M. Alonso; *Recovery of copper from ammoniacal/ammonium sulfata medium by LIX 54*; J. Chem. Technol. Biotechnol. **74** (1999) 1171-1175.
86. F. J. Alguacil, A. Cobo; *Extraction of zinc from ammoniacal/ammonium sulphate solutions by LIX 54*; J. Chem. Technol. Biotechnol. **71** (1998) 162-166.
87. F. J. Alguacil, A. Cobo; *Solvent extraction with LIX 973N for the selective separation of copper and nickel*; J. Chem. Technol. Biotechnol. **74** (1999) 467-471.
88. E. R. San Miguel, J. C. Aguilar, J. P. Bernal, M. L. Ballinas, M. T. J. Rodriguez, J. Gyves, K. Chimmel; *Extraction of Cu(II), Fe(III), Ga(III)*

*Ni(II), In(III), Co(II), Zn(II) and Pb(II) with LIX 984 dissolved in n-heptane; Hydrometallurgy* **47** (1997) 19-30.

- 89.** M. V. C. Cardoso; Efeito do centro metálico nas interações intermoleculares dos complexos  $[M(CN)_5NO]^{X-}$  com o poli(óxido de etileno) em sistemas aquosos bifásicos. Tese de mestrado em Agroquímica do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.
- 90.** C.-H. Lee, C.-T. Chang, K.-S. Fan, T.-C. Chang; *An overview of recycling and treatment of scrap computers; Journal Hazardous Materials B* **114** (2004) 93-100.
- 91.** J. Cui, L. Zhang; *Metallurgical recovery metals from electronic waste: A review; Journal of Hazardous Materials* **158** (2008) 228–256
- 92.** J. B. Legarth; *Environmental decision making for recycling options; Resources, Conservation and Recycling*, **19** (1997) 109-135.
- 93.** J. Rydberg, C. Musikas, G. R. Choppin, (Eds.), *Principles and Practices of Solvent Extraction*, Marcel Dekker, New York, 1992.
- 94.** B. S. Pedersen, K. E. Rasmussen, T. G. Halvorsen; *Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis; J. Chromatogr., A* **902**, (2000) 91-105.
- 95.** M. C. H. da Silva, L. H. M. da Silva, F. J. Paggioli; *A Novel Micellar Medium Using Triblock Copolymer for Cobalt Determination; Anal. Sci.* **21** (2005) 933-937.
- 96.** G. D. Rodrigues, M. C. H. da Silva, L. H. M. da Silva, F. J. Paggioli, L. A. Minim, J. S. R. Coimbra; *Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent; Separ. Purif. Tech.* **62** (2008) 687-693.
- 97.** G. X. Zhao, J. X. Xiao; *Microemulsion formation and phase behavior of anionic and cationic surfactants with sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide. J. Colloid Interface Sci.* **177** (1996) 513.
- 98.** A. J. Tong, Y. Wu, L. D. Li, Y. Akama, S. Tanaka; *Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins. Anal. Chim. Acta* **369** (1998) 11.
- 99.** Y. Akama, A. Tong, M. Ito, S. Tanaka; *The study of the partitioning*

- mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system.* Talanta **48** (1999) 1133–1137.
- 100.** A. J. Tong, J. J. Dong, L. D. Li; *Aqueous two-phases extraction system of sodium perfluorooctanoate and dodecyltriethylammonium bromide and its application to porphyrins and dyes.* Analytica Chimica Acta, **390** (1999) 125-131.
- 101.** A. E. Visser, S. T. Griffin, D. H. Hartman, R. D. Rogers; *Naphthol- and resorcinol-based azo dyes as metal ion complexants in aqueous biphasic systems.* Journal of Chromatography B, **743** (2000) 107–114.
- 102.** S. Fernandes, H. S. Kim, R. Hatti-Kaul; *Affinity Extraction of Dye- and Metal Ion-Binding Proteins in Polyvinylpyrrolidone-Based Aqueous Two-Phase System.* Protein Expression and Purification **24**, 460–469 (2002).
- 103.** A. B. Mageste, L. R. de Lemos, G. M. D. Ferreira, M. C. H. da Silva, L. H. M. da Silva, R. C. F. Bonomo, L. A. Minin.; *Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine;* Journal of Chromatography A; **1216** (2009) 7623-7629.

## Capítulo 2

### Termodinâmica e otimização da transferência de norbixina em sistemas aquosos bifásicos

#### RESUMO

Partição do corante natural norbixina ( $K_N$ ) foi estudado em sistemas aquosos bifásicos formados pela mistura de soluções de polímero ou copolímero com solução aquosa de sal (tartarato ou succinato de sódio). O coeficiente de partição do corante norbixina foi investigado como função do pH, massa molar do polímero, hidrofobicidade, comprimento da linha de amarração (CLA) do sistema e natureza do eletrólito. Através de planejamento composto de face centrada (CCF), a partição da norbixina foi otimizada em termos das variáveis concentração do polímero, concentração do sal e pH. Verificou-se que tal fenômeno é altamente dependente da natureza do eletrólito e hidrofobicidade do sistema, bem como do valor do CLA. Valores de  $K_N$  entre 8 e 130 foram encontrados, indicando a potencialidade dos SAB como método de pré-concentração/purificação do corante norbixina. Moléculas de norbixina se concentraram na fase rica em polímero indicando uma interação entálpica específica entre o soluto e o pseudo-policátion, o qual é formado pela adsorção do cátion ao longo da cadeia polimérica. Os parâmetros termodinâmicos de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) indicam que a concentração preferencial da norbixina na fase superior é favorecida pelos fatores entálpicos e entrópicos, pois ambos contribuem para uma redução para a energia livre de Gibbs do sistema.

#### Palavras Chaves:

Sistemas aquosos bifásicos, norbixina, purificação, partição, Química Verde

### **Abstract:**

Partition of natural dye norbixin have been studied in aqueous biphasic systems formed by mixing solutions of polymer or copolymer with an aqueous solution of salt (sodium tartrate or succinate). The partition coefficient of dye norbixin,  $K_N$ , was investigated as a function of pH, polymer molecular weight, hydrophobicity, Tie-Line Length (TLL) of the system and nature of the electrolyte. Using a face-centered central composite design (CCF) it was determined the optimum conditions for the partitioning process of the norbixin, where it was found that this phenomenon is highly dependent on the nature of the electrolyte, polymer hydrophobicity and values of TLL. Values between 8 and 130 were found, indicating the potential of ATPS as a method of pre-concentration/purifying dye norbixin. Molecules norbixin focused on polymer-rich phase indicating a specific interaction enthalpy between the solute and pseudo-polycation, which is formed by the cation adsorption along the polymer chain. Thermodynamic parameters of transfer ( $\Delta_{tr}G, \Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) indicate that the preferential concentration of norbixin the top phase is favored by enthalpic and entropic factors, since both contribute to a reduction for the Gibbs free energy of the system.

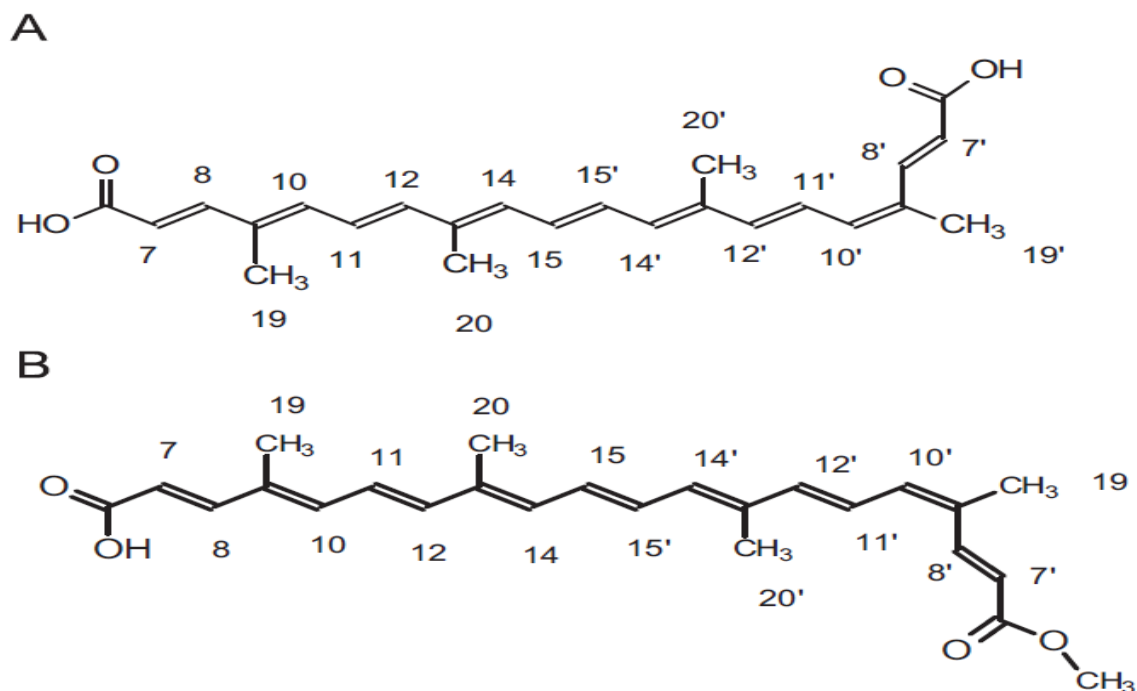
### **Keywords:**

Aqueous two-phases systems, norbixin, purification, partition, Green Chemistry

## 1 - Introdução

Urucum é um corante natural obtido do pericarpo das sementes da *Bixa orellana* L. uma árvore tropical e nativa das florestas das Américas Central e Sul, amplamente usado em diversos setores industriais<sup>1-3</sup>. Pode ser encontrado também como componente de células fotoelétricas (DSC)<sup>4</sup>, e alguns experimentos relatam sua atividade biológica contra certos microorganismos que atuam na fermentação de produtos industrializados<sup>2</sup> e a possibilidade da utilização do subproduto do seu cultivo como fonte de biomassa<sup>5</sup>. Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de sementes de urucum onde responde por aproximadamente 70% de todo o urucum produzido no mundo.

Os principais pigmentos extraídos das sementes de urucum são os carotenóides *cis*-bixina e *cis*-norbixina [Fig.10]. O primeiro é um composto lipossolúvel, sendo o componente majoritário nos extratos obtidos sobre as formas de suspensões oleosas ou com solvente orgânicos. Já a *cis*-norbixina é um composto hidrossolúvel e por isso encontrado majoritariamente nos extratos sobre a forma de soluções alcalinas<sup>2</sup>.



**Figura 10:** Estrutura química dos apocarotenóides *cis-bixina* (A) e *cis-norbixina* (B), os quais são os pigmentos principais do pericarpo das sementes de urucum.

A extração do pigmento do urucum é realizado por processos mecânicos (e.g., leito de jorro) ou extração com solvente<sup>6,7</sup>. Porém tais processos não garantem uma padronização do produto final nem a obtenção de um extrato com pureza elevada, por isso novas técnicas para a extração/purificação do urucum têm sido pesquisadas. Tal tendência tem sido observada para diversos corantes de origem natural, onde é crescente a busca por técnicas alternativas, as quais proporcionem melhora na eficiência, além de serem ambientalmente mais seguras<sup>6,8-13</sup>.

Técnicas de extração líquido-líquido, principalmente com a utilização de solventes, são eficientes para separar e pré-concentrar compostos de interesse<sup>11</sup>. Porém apresentam como grande desvantagem a utilização de alguns solventes orgânicos que podem causar problemas ambientais e à saúde por serem tóxicos, inflamáveis e carcinogênicos. Assim é crescente a

busca por processos de separação líquido-líquido alternativos. Ultimamente os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) começaram a ser usados para tal propósito<sup>8,11,13-15</sup>. Os SAB são sistemas líquidos bifásicos formados pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros quimicamente distintos, ou pela combinação de uma solução aquosa de um polímero e uma solução aquosa de certos tipos de eletrólitos<sup>16</sup>.

São recentes os estudos sobre a utilização dos SAB para extração/purificação de corantes naturais<sup>8,17-21</sup>. Devido aos poucos estudos realizados sobre o comportamento de partição de corantes naturais nos SAB, este trabalho vem realizar um estudo termodinâmico do comportamento de partição da norbixina em diversos SAB e a otimização do processo de partição em função dos fatores concentração de polímero, concentração de sal e pH do sistema. Tal trabalho irá proporcionar um melhor entendimento dos fatores que regem o fenômeno de partição deste corante e assim sermos capazes de elucidar qual a melhor combinação dos componentes que irão gerar um SAB mais eficiente para o processo de extração/purificação do corante em questão.

## **2. Seção Experimental**

### **2.1. Materiais**

Poli(óxido de etileno), PEO, de massa molar 1500 e 4000 g.mol<sup>-1</sup>, Poli(óxido de propileno), PPO, de massa molar 400 g.mol<sup>-1</sup>, foram obtidos da Isofar (Duque de Caxias, Brasil) e Sigma (St. Louis, MO, USA), respectivamente. O copolímero tribloco L35 foi comprado da Aldrich (St. Louis, MO, USA) com uma massa molar média de 1900 g.mol<sup>-1</sup>. Este

copolímero tem a seguinte composição nominal:  $(EO)_{11}(PO)_{16}(EO)_{11}$ . Todos compostos macromoleculares foram usados como adquiridos. Os sais orgânicos utilizados tartarato de sódio (TartNa) /  $C_4H_4O_6Na_2 \cdot 2H_2O$  (99%) e succinato de sódio (SuccNa) /  $C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6H_2O$  (99%) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os sais apresentam grau analítico e foram usados sem purificação prévia. Água destilada foi utilizada em todos os experimentos. Solução alcalina de urucum foi cedida pela Chr. Hansen Ind. Com. Ltd (Valinhos/SP, Brasil).

## 2.2. Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Soluções concentradas de polímero/copolímero (PEO 1500, PEO 4000, PPO 400, L35) e sal (tartarato de sódio ou succinato de Sódio) são preparadas de modo a proporcionar a obtenção de pontos globais baseados nos dados da literatura<sup>22,23</sup>. A concentração das soluções foi escolhida de tal modo que, ao se utilizar quantidades diferentes de cada uma, os pontos globais desejados são obtidos, tendo a formação de um sistema com massa final de aproximadamente 40 g, posteriormente é adicionado 0,080 g de solução de NaOH  $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$  para garantir que o pH do sistema esteja num valor que possibilite a quantificação do extrato de urucum nas duas fases. O sistema é deixado em repouso para atingir o equilíbrio termodinâmico. Após esse tempo alíquotas das fases superior e inferior são recolhidas para montagem de sistemas com menor massa, nesses SAB menores são realizados os experimentos de partição da norbixina.

Os sistemas menores são formados pela adição a um tubo de ensaio de 3,0 g de FI, seguida pela adição de 3,0 g da solução de FS e 0,030 g do

extrato alcalino de urucum da Chr. Hansen, para cada ponto global desejado quatro sistemas (SAB sem corante + SAB com corante em triplicata) são preparados. Após essas etapas o sistema montado é então agitado e deixado novamente em repouso para atingir o estado de equilíbrio termodinâmico.

### 2.3. Coleta e Diluição das Fases

Após 24 h alíquotas das fases superior e inferior foram coletadas e, posteriormente, diluídas com água destilada de 20 e 1,2 vezes, respectivamente, para quantificação espectrofotométrica a 482 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis2500 da Shimadzu, com uma cubeta de 1,0 cm de caminho óptico.

### 2.4. Quantificação do coeficiente de partição do extrato de urucum

Para cada fase recolhida foi realizado a leitura da absorbância no valor de comprimento de onda em 482 nm, pois dentre o tripleto apresentado no espectro de absorbância do urucum na região do visível, este foi o comprimento de onda no qual obteve-se melhor sensibilidade. O coeficiente de partição do urucum ( $K_N$ ) foi determinado conforme equação 1.

$$K_N = \frac{(Abs_{482nm}^{FS}) \cdot (fd^{FS})}{(Abs_{482nm}^{FI}) \cdot (fd^{FI})} \quad (1)$$

onde  $Abs_{482nm}^{FS}$  e  $Abs_{482nm}^{FI}$  são os valores de absorbância da fase superior e inferior obtido no comprimento de onda especificado e  $fd^{FS}$  e  $fd^{FI}$  os fatores de diluição das fases, respectivamente.

## 2.5. Estudo dos fatores que afetam a partição do extrato de urucum nos SAB

Para otimização da partição da norbixina nos SAB, formados por PEO 1500/ tartarato de sódio/ H<sub>2</sub>O, PEO 1500/ succinato de sódio/ H<sub>2</sub>O e PPO 400/ tartarato de sódio/ H<sub>2</sub>O, foi usado a metodologia da superfície de resposta (RSM). Foi aplicado um planejamento composto de face centrada (CCF) de modo a verificar a influência dos fatores (concentração de eletrólito, concentração de polímero e pH do sistema) sobre a distribuição da norbixina nos SAB. Os valores foram codificados de acordo com o planejamento CCF escolhido. Os valores codificados para as variáveis independentes foram -1 (nível mais baixo), 0 e +1 (nível mais alto). As tabelas 6, 7 e 8 mostram as condições experimentais para cada sistema estudado. O planejamento completo consiste de 18 pontos experimentais dos quais inclui quatro replicatas no ponto central para cada sistema aquoso polímero/ sal estudado. As 18 amostras foram preparadas em ordem aleatórias. Em cada experimento, o parâmetro coeficiente de partição para a norbixina ( $K_N$ ) foi calculado.

As bases do RSM para formar um planejamento experimental e o CCF tem sido usado para predizer e verificar modelos de equações bem como otimização da resposta como função de parâmetros independentes<sup>24-27</sup>. Comparado aos procedimentos clássicos, esta técnica é aplicável para determinar os efeitos de interação das variáveis, além de gerar uma boa estimativa dos erros<sup>28</sup>. Planejamento experimental composto de face centrada é representado por um modelo matemático obtido por regressões

múltiplas e ajustado com um polinômio de segunda ordem (equação 2), onde K é a matriz das respostas.

$$K = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

onde  $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  representam o efeito constante do processo, efeito linear, quadrático de  $X_i$  e o efeito de interação entre  $X_i$  e  $X_j$  no coeficiente de partição, respectivamente. Análise de variância (ANOVA) e testes de significância foram realizados usando os procedimentos PROC GLM e PROC REG do software estatístico SAS. Variáveis com um nível de confiança maior que 95 % ( $P < 0,05$ ) foram consideradas como significantes.

**Tabela 6.** Valores das variáveis não-codificadas e codificadas do SAB PEO 1500+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O.

Variáveis	Nível e Faixa	
	-1	+1
Concentração tartarato de sódio (X <sub>1</sub> , %)	11,43	13,93
Concentração de PEO (X <sub>2</sub> , %)	18,25	24,68
pH (X <sub>3</sub> )	10,50	12,00

**Tabela 7.** Valores das variáveis não-codificadas e codificadas do SAB PEO 1500+succinato de sódio+H<sub>2</sub>O.

Variáveis	Nível e Faixa	
	-1	+1
Concentração succinato de sódio(X <sub>1</sub> , %)	12,91	13,78
Concentração de PEO(X <sub>2</sub> , %)	23,35	25,27
pH (X <sub>3</sub> )	10,50	12,00

**Tabela 8.** Valores das variáveis não-codificadas e codificadas do SAB PPO 400+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O

Variáveis	Nível e Faixa	
	-1	+1
Concentração de tartarato de sódio(X <sub>1</sub> , %)	6,74	8,81
Concentração de PPO(X <sub>2</sub> , %)	27,22	42,01
pH (X <sub>3</sub> )	10,50	12,00

**Tabela 9:** Matriz elaborada para estudo dos fatores propostos (X<sub>i</sub>).

Ensaio	Tratamento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	1	-1	-1	-1
2	2	-1	-1	1
3	3	-1	1	-1
4	4	-1	1	1
5	5	1	-1	-1
6	6	1	-1	1
7	7	1	1	-1
8	8	1	1	1
9	9	-1	0	0
10	10	1	0	0
11	11	0	-1	0
12	12	0	1	0
13	13	0	0	-1
14	14	0	0	1
15	15	0	0	0
16	15	0	0	0
17	15	0	0	0
18	15	0	0	0

## 2.6 - Parâmetros termodinâmicos de partição da norbixina

### 2.6.1 – Variação da Energia Livre de Gibbs de transferência da norbixina ( $\Delta_{tr}G$ )

O parâmetro termodinâmico  $\Delta_{tr}G$  foi calculado através dos valores do coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ ) obtidos para todos os pontos globais dos SAB estudados, através da relação termodinâmica:

$$\Delta_{tr}G = -TR \ln K_N \quad \text{Equação (3)}$$

### 2.6.2 – Variação da Entalpia de transferência da norbixina ( $\Delta_{tr}H$ )

As medidas da transferência de energia na forma de calor devido à passagem de moléculas de norbixina da fase inferior para a superior à 25 °C foram realizadas através de titulações calorimétricas isotérmicas (ITC) num microcalorímetro CSC-4200 (Calorimeter Science Corp.), controlada pelo programa ItcRun. Para cada SAB as composições referentes ao menor e maior valores de CLA foram novamente preparados, onde alíquotas das fases superior e inferior foram recolhidas. A fase inferior foi ainda utilizada para preparar uma solução de 100:1 em relação ao extrato de urucum obtido comercialmente da Chr. Hansen.

O procedimento experimental consistiu em acrescentar às células de referencia e amostra do microcalorímetro um volume de 1,8 mL (0,90 mL de fase inferior e 0,90 mL de fase superior). Em seguida 2 adições de alíquotas de 100  $\mu$ L da mistura de FI e extrato foram realizadas à cela de amostra, sempre com agitação constante. O fluxo de energia foi registrado durante todo o processo, e a integral em função do tempo foi calculada através do

programa presente no aparelho. Tal cálculo nos fornece o valor numérico correspondente à variação da entalpia devido o processo de transferência de moléculas de norbixina da fase inferior para a superior.

$$\int_{U_i}^{U_f} dU = \int dq + \int_{V_i}^{V_f} PdV \quad \text{Equação (4)}$$

$$\Delta U = q - P(V_f - V_i) \quad \text{Equação (5)}$$

$$U_f - U_i = q - P_{int}(V_f - V_i) \quad \text{Equação (6)}$$

$$(U_f + PV_f) - (U_i + PV_i) = q \quad \text{Equação (7)}$$

$$H_f - H_i = q \quad \text{Equação (8)}$$

$$\Delta H = q \quad \text{Equação (9)}$$

### 2.6.3 – Variação da Entropia de transferência da norbixina ( $\Delta_{tr}S$ )

O parâmetro termodinâmico variação de entropia devido a transferência de moléculas de norbixina da fase inferior para a superior foi determinado a partir da relação clássica da termodinâmica

$$\Delta_{tr}G = \Delta_{tr}H - T\Delta_{tr}S \quad \text{Equação (10)}$$

Da equação 10, podemos determinar o parâmetro  $\Delta_{tr}S$  a partir dos valores variação de entalpia ( $\Delta_{tr}H$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta_{tr}G$ ) previamente determinados.

$$\Delta_{tr}S = \frac{\Delta_{tr}H - \Delta_{tr}G}{T} \quad \text{Equação (11)}$$

### 3. Resultados e discussões

#### 3.1. Otimização do coeficiente de partição da norbixina

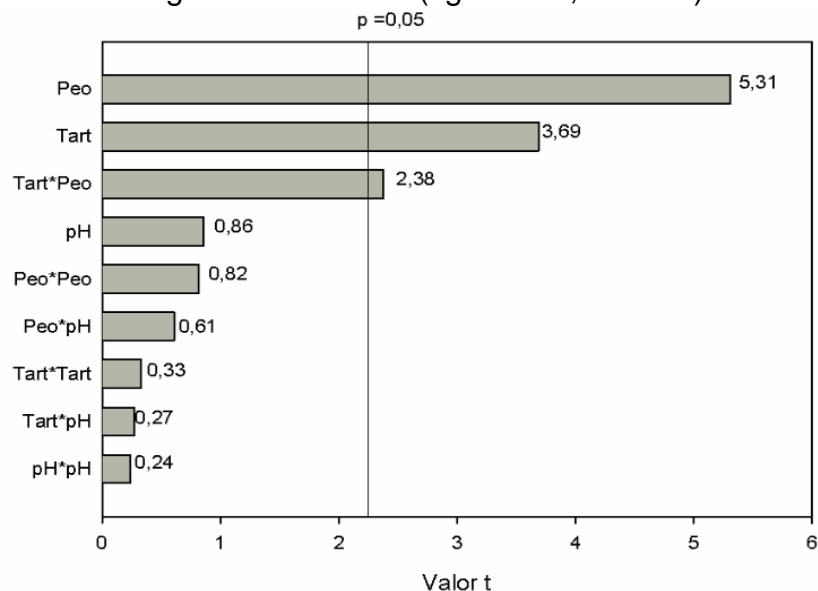
Os pontos experimentais para os sistemas PEO 1500+ tartarato de sódio, PEO 1500+ succinato de sódio e PPO 400+ tartarato de sódio, em valores codificados, e valores de respostas são representados na tabela 10.

Uma análise desses resultados mostram que o aumento da concentração de eletrólito promove um aumento do  $K_N$  para os SAB PEO 1500+tartarato de sódio e PPO 400+tartarato de sódio (ensaios 1 e 5) e redução do  $K_N$  para o SAB PEO 1500+tartarato de sódio, onde os valores do coeficiente de partição mudaram de 25,8, 7,88 e 36,1 para 123, 17,0 e 32,0, respectivamente. O efeito da concentração do polímero sobre  $K_N$  pode ser visto nos ensaios 1 e 3, onde novamente ocorreu aumento dos valores de  $K_N$  para os SAB PEO 1500+ tartarato de sódio e PPO 400+ tartarato de sódio e redução para o SAB PEO 1500+ succinato de sódio, sendo que os valores de  $K_N$  foram 25,8, 7,88 e 36,1 passando para 164, 20,3 e 31,4. Já a influência do pH do sistema sobre a partição da norbixina pode ser visto através dos ensaios 1 e 2, tal variável afetou negativamente o  $K_N$  do SAB PEO 1500+ tartarato de sódio e positivamente os SAB PPO 400+tartarato de sódio e PEO 1500+ succinato de sódio, uma vez que os valores do  $K_N$  variaram de 25,8, 7,88 e 36,1 para 12,4, 10,8 e 93,4.

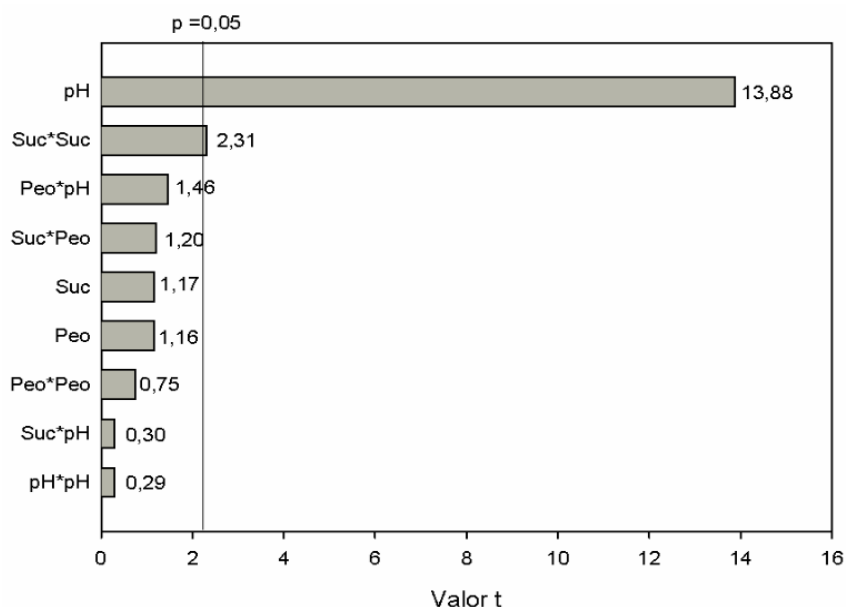
**Tabela 10:** Resposta obtida para os SAB nos diferentes níveis estudados.

Ensaio	Tratamento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	PEO/ tartNa	PEO/ succNa	PPO/ tartNa
					K <sub>N</sub>	K <sub>N</sub>	K <sub>N</sub>
1	1	-1	-1	-1	25,780	36,129	7,883
2	2	-1	-1	1	12,398	93,417	10,759
3	3	-1	1	-1	164,885	31,409	20,299
4	4	-1	1	1	143,365	96,523	18,409
5	5	1	-1	-1	123,615	32,044	16,987
6	6	1	-1	1	134,966	85,298	15,995
7	7	1	1	-1	188,793	32,450	23,254
8	8	1	1	1	162,737	107,636	20,197
9	9	-1	0	0	111,640	81,569	13,928
10	10	1	0	0	155,499	55,007	17,879
11	11	0	-1	0	86,050	54,002	12,376
12	12	0	1	0	165,420	59,325	15,292
13	13	0	0	-1	153,998	28,505	11,416
14	14	0	0	1	131,549	93,910	19,719
15	15	0	0	0	73,613	57,760	14,000
16	15	0	0	0	131,821	51,583	16,359
17	15	0	0	0	153,919	63,648	18,713
18	15	0	0	0	165,423	54,422	19,552

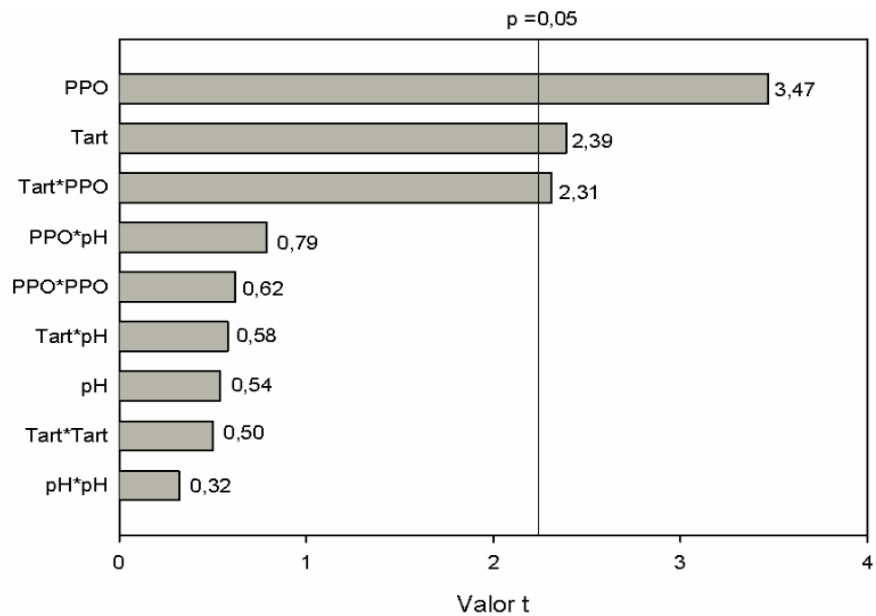
Uma análise estatística dos resultados da tabela 10 mostrou qual são as variáveis e efeitos de interação que mais influenciam a distribuição da norbixina entre as fases dos SAB estudados. Tais resultados são apresentados através do gráfico de Pareto (figuras 11, 12 e 13).



**Figura 11:** Gráfico de Pareto das variáveis analisadas para a partição da norbixina no SAB PEO 1500+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O.



**Figura 12:** Gráfico de Pareto das variáveis analisadas para a partição da norbixina no SAB PEO 1500+ succinato de sódio+ H<sub>2</sub>O.



**Figura 13:** Gráfico de Pareto das variáveis analisadas para a partição da norbixina no SAB PPO 400+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O.

Pela análise do gráfico de Pareto fica claro que o comportamento de partição da norbixina nos SAB PEO 1500+ tartarato de sódio e PPO 400+ tartarato de sódio é influenciado pela concentração do polímero, do eletrólito e por um efeito de interação entre essas mesmas variáveis (figuras 11 e 13). Já no SAB PEO 1500+ succinato de sódio o comportamento de partição da norbixina é afetado pelo pH do sistema e pelo quadrado da concentração do eletrólito (figura 12).

Com base nas informações retiradas do gráfico de Pareto de cada sistema, um modelo matemático linear reduzido foi elaborado. A significância estatística de cada fator do modelo foi avaliada por uma análise de variância (ANOVA) usando o teste estatístico de Fisher. As tabelas 11 a 13 mostram os resultados da ANOVA para cada modelo. Os modelos para todos os sistemas são estatisticamente válidos, com o valor-p menor que 0,05. Um teste de falta de ajuste foi também avaliado e nos casos, valores-p maiores que 0,05 foram obtidos para todos os modelos, indicando falta de ajuste não significativo.

**Tabela 11.** Resultados da ANOVA para o SAB PEO 1500+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O.

Fonte	Graus de Liberdade	Varição (soma dos desvios quadráticos)	Desvio Quadrático Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Modelo	14	32951,000	10984,000	20,99	< 0,0001
Erro	3	7326,992	523,357		
Falta de ajuste	11	2322,912	211,174	0,13	0,9956
Erro Residual	3	5004,079	1668,027		
Total	17	40277,673			

**Tabela 12.** Resultados da ANOVA para o SAB PEO 1500+succinato de sódio+H<sub>2</sub>O.

Fonte	Graus de Liberdade	Varição (soma dos desvios quadráticos)	Desvio Quadrático Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Modelo	14	10306,000	3435,262	68,33	< 0,0001
Erro	3	703,813	50,272		
Falta de ajuste	11	623,128	56,648	2,11	0,294
Erro Residual	3	80,686	26,895		
Total	17	11009,599			

**Tabela 13.** Resultados da ANOVA para o SAB PPO 400+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O.

Fonte	Graus de Liberdade	Varição (soma dos desvios quadráticos)	Desvio Quadrático Médio	F <sub>calc</sub>	p-valor
Modelo	14	176,462	58,821	9,01	0,0014
Erro	3	91,404	6,529		
Falta de ajuste	11	72,645	6,604	1,06	0,54
Erro Residual	3	18,759	6,253		
Total	17	267,865			

As equações geradas que se ajustaram aos dados experimentais são mostrados na tabela 14. Os modelos reduzidos, em termos dos fatores não-codificados, são descritos pelas equações (12)-(14). De acordo com Azevedo et al. (2007)<sup>25</sup>, a proporção da variação total atribuída para cada ajuste pode ser avaliado pelo valor do coeficiente de determinação  $R^2$ . O coeficiente de determinação foi 0,818, 0,936 e 0,659, para o modelo dos sistemas PEO 1500+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O, PEO 1500+ succinato de sódio+ H<sub>2</sub>O e PPO 400+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O, respectivamente. Isto demonstra que há boa concordância de correlação entre os dados reais e previstos para os dois primeiros sistemas. Um baixo valor ( $R^2 = 65,9\%$ ) foi obtido para sistema PPO 400+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O, indicando um ajuste não tão bom.

**Tabela 14:** Modelos matemáticos ajustados em relação aos fatores avaliados e o coeficiente de partição da norbixina ( $K_M$ ).

$$K_{PEO/TAT} = -1979.85715 + 142.86000X_1 + 83.61790X_2 - 5.50928X_1X_2 \quad (12)$$

$$K_{PEO/SUC} = 6492.13256 - 1029.26712X_1 + 42.16603X_3 + 38.33456X_1X_1 \quad (13)$$

$$K_{PPO/TAT} = -58.86750 + 7.65124X_1 + 1.67108X_2 - 0.15675X_1X_2 \quad (14)$$

onde  $X_1$ : concentração de tartNa (% m/m);  $X_2$ : concentração PEO (%m/m),  $K_{PEO/Tart}$ ,  $X_3$ : pH;  $K_{PEO/Succ}$ ,  $K_{PPO/Tart}$ : coeficiente de partição da norbixina nos sistemas aquosos PEO 1500+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O; PEO 1500+ succinato de sódio+ H<sub>2</sub>O e PPO 400+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O, respectivamente.

### 3.1.1 – Gráfico da Superfície de Resposta

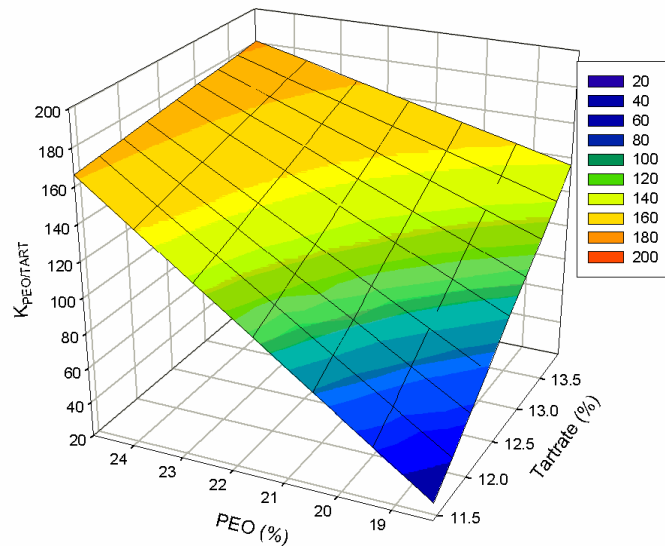
Fatores que influenciam a partição da norbixina são mostrados nas figuras 14, 15 e 16 como gráficos de superfícies de resposta, para os SAB PEO 1500+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O, PEO 1500+ succinato de sódio+ H<sub>2</sub>O e PPO 400+ tartarato de sódio+ H<sub>2</sub>O, respectivamente. Esta projeção provém um método para visualizar a relação entre as respostas e os níveis experimentais de cada variável e tipo de interações entre duas variáveis testadas<sup>29</sup>. Através da superfície de resposta, as interações entre duas variáveis e sua região ótima podem ser melhor entendida<sup>30</sup>.

Da figura 14 pode ser observado que o coeficiente de partição aumenta com elevação das concentrações de PEO 1500 e tartarato de sódio, onde valor de  $K_N$  igual a 23,8 foi encontrado quando tem-se a menor concentração de PEO 1500 e tartarato de sódio. Já quando concentrações maiores dos dois componentes são usadas um  $K_N$  de até 188,8 pode ser obtido. Uma análise mais detalhada da figura 14 indica que o coeficiente de partição da norbixina no SAB PEO 1500+ tartarato de sódio pode ser melhorado, pois tem-se a tendência de aumentar ainda mais o  $K_N$  com aumento das concentrações do polímero e do sal, porém questões práticas impedem de atingir a região de ótimo para esse processo, uma vez que os sistemas não se formam para valores de composição global maiores, e assim temos que o ponto de composição global 25,0 % em massa de polímero de 14,0 % em massa de tartarato representa a composição global ótima para a partição da norbixina nesse tipo de sistema.

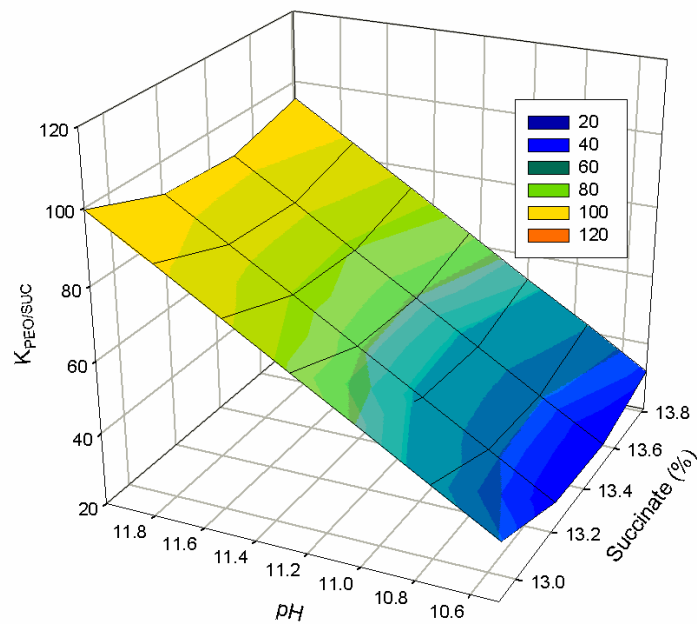
Comportamento idêntico pode ser visto para o sistema PPO 400 e tartarato de sódio (figura 16), onde o valor de  $K_N$  foi igual a 7,8 quando o

SAB foi formado com as menores concentrações possíveis do polímero e do sal e uma aumento praticamente linear do  $K_N$  foi observado ao se elevar simultaneamente as concentrações do PPO 400 e tartarato de sódio, encontrando nesse ponto um valor de  $K_N$  próximo a 23,3. Mas novamente inviabilidades práticas impedem a obtenção de um coeficiente de partição da norbixina maior para tal tipo de SAB uma vez que o sistema não se forma em concentrações maiores de PPO 400 e tartarato de sódio, e assim o ponto de ótimo para tal SAB foi encontrado na composição global de 42,0 % em massa de PPO 400 e 8,7 % em massa de tartarato de sódio.

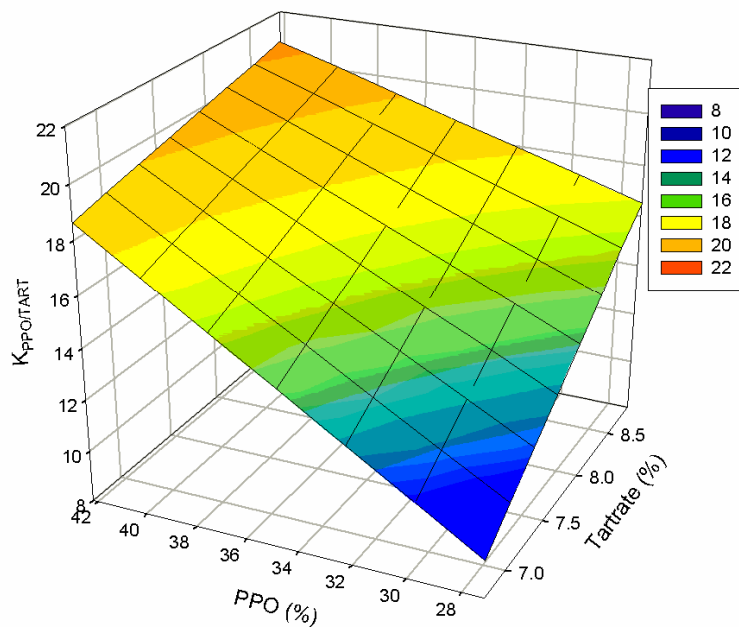
Já a superfície de resposta na figura 15 mostra o efeito do pH e concentração de succinato de sódio na partição da norbixina com a concentração de PEO 1500 fixada em 23,35 % em massa. Da figura pode-se ver que quanto maior o pH do sistema maior será o  $K_N$ , e tem-se que as concentrações de succinato de sódio que propiciam os maiores coeficiente de partição são 12,8 % e 13,8 %, as quais correspondem à menor e maior concentração de sal composições globais dos sistemas preparados, respectivamente. Assim quando se tem concentração de sal igual a 12,8 % e pH igual a 10,5 um valor de  $K_N$  36,1 é encontrado, já quando o pH é elevado para o valor máximo trabalho (12,5) tem-se um aumento do  $K_N$  para 93,4 mantendo a mesma concentração de sal. Desse modo temos que o ponto de ótimo para a partição da norbixina nesse tipo de SAB pode ainda ser melhorado com o aumento do pH, uma vez que esse fator não interfere tanto na formação de tais tipos de sistema.



**Figura 14:** Superfície de resposta para o  $K_N$  no SAB PEO 1500+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O como função dos fatores concentração de PEO 1500 e concentração do sal expresso em níveis não-codificados.



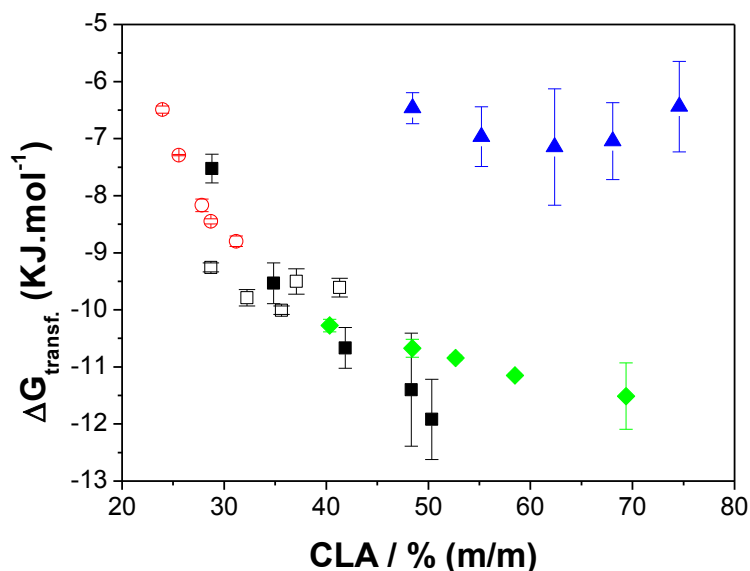
**Figura 15:** Superfície de resposta para o  $K_N$  no SAB PEO 1500+succinato de sódio+H<sub>2</sub>O como função dos fatores pH e concentração do sal, expresso em níveis não-codificados.



**Figura 16:** Superfície de resposta para o  $K_N$  no SAB PPO 400+tartarato de sódio+ $H_2O$  como função dos fatores concentração de PPO e concentração do sal, expresso em níveis não-codificados.

### 3.2 – Parâmetros Termodinâmicos da Transferência da norbixina

A figura 17 mostra os valores do parâmetro  $\Delta G_{Tr}$  do soluto norbixina em função do CLA para todos os SAB estudados, a 25 °C.



**Figura 17:** Variação da energia livre de Gibbs de transferência da norbixina em função do valor do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO 1500+tartNa+H<sub>2</sub>O; (□) PEO 1500+succNa+H<sub>2</sub>O; (○) PEO 4000+tartNa+H<sub>2</sub>O; (▲) PPO 400+tartNa+H<sub>2</sub>O; (◆) L35+tartNa+H<sub>2</sub>O, à 25 °C.

Os resultados indicam uma redução linear do valor do  $\Delta_{tr}G$  com o aumento do CLA, para os SAB formados pelo eletrólito tartarato de sódio e o polímero (PEO 1500, PEO 4000 ou L35), ou seja, a partição do soluto aumenta à medida em que aumenta a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases. Já nos SAB formados por PPO 400 ou que apresente o ânion succinato, tem um valor a partir do qual o aumento das diferenças intensivas das fases torna o processo de transferência menos favorecido. Ainda pela figura 17 percebemos que o tamanho da cadeia do

polímero PEO não influencia significativamente na partição da norbixina, dando indícios que fatores de distribuição configuracional de tal composto não tem grande relevância no processo, uma vez que a variação da energia livre de Gibbs de transferência com o aumento do CLA, é praticamente a mesma para o PEO 1500 e PEO 4000. Fica claro também a influência que o segmento óxido de propileno presente no polímero e o ânion proveniente do eletrólito tem em reduzir a eficiência com que o corante particiona para a fase superior, já que o aumento do conteúdo de tal segmento na macromolécula acaba por reduzir o valor da  $\Delta_{tr}G$  na seguinte ordem:  $\Delta_{tr}G_{PEO} < \Delta_{tr}G_{L35} < \Delta_{tr}G_{PPO}$ . Além disso, a presença do ânion succinato acaba por tornar o processo menos espontâneo, a partir de certos valores de composição global nos quais sistemas do tipo PEO 1500+ succinato de sódio possam ser preparados.

Temos que lembrar que a variação da energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) pode ser dividida em duas contribuições, uma é a entalpia de transferência ( $\Delta_{tr}H$ ) e a outra é a entropia de transferência ( $\Delta_{tr}S$ ).

A tabela 15 agrupa os parâmetros termodinâmicos  $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$  obtidos para o primeiro e último valor de CLA, para todos os sistemas aplicados.

**Tabela 15:** Parâmetros termodinâmicos obtidos para a transferência da norbixina em todos os SAB estudados.

SAB	CLA	Parâmetros Termodinâmicos		
		$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}H$	$\Delta_{tr}S$
		(kJ.mol <sup>-1</sup> )	(kJ.mol <sup>-1</sup> )	(kJ.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )
<b>PEO1500/ tartNa</b>	28,80	-7,55±0,35	-3,69±0,61	0,0130±0,00220
	50,34	-11,95±0,96	-6,88±0,70	0,0173±0,00220
<b>PEO1500/succNa</b>	28,70	-9,30±0,11	-3,02±0,31	0,0211±0,00220
	41,31	-9,65± 0,24	-5,12±0,25	0,0152±0,00080
<b>PEO4000/tartNa</b>	23,96	-6,51± 0,09	-4,85±0,55	0,00560±0,000640
	31,18	-8,83± 0,13	-6,45±0,30	0,00802±0,000390
<b>L35/tartNa</b>	40,32	-10,32± 0,16	-2,71±0,30	0,0255±0,00280
	69,36	-11,54± 0,82	-5,26±0,41	0,0213±0,00220
<b>PPO400/tartNa</b>	48,44	-6,24± 0,52	-4,69±0,60	0,00523±0,000800
	74,56	-5,17± 1,14	-9,10±0,50	-0,0127±0,00300

Dos resultados obtidos podemos observar que o processo de transferência de moléculas de norbixina para a fase superior é favorecido pelo fator entálpico e entrópico, salvo o último ponto estudado para o SAB PPO 400+ tartarato de sódio, no qual somente a entalpia está favorecendo tal processo termodinâmico.

Os resultados do  $\Delta_{tr}H$ , obtidos através de experimentos de calorimetria, revelaram que o processo de transferência para a fase superior das moléculas do corante é exotérmico, onde os valores variaram de -2,71 kJ.mol<sup>-1</sup> no 1º CLA do SAB L35+ tartarato de sódio a -9,10 kJ.mol<sup>-1</sup> no 5º CLA do SAB PPO400+ tartarato de sódio.

Outra tendência observada para a  $\Delta_{tr}H$  foi o seu aumento em módulo com o aumento do CLA, ou seja, ocorre uma maior liberação de energia quando os sistemas são preparados a partir de composições globais mais altas. Este comportamento de  $\Delta_{tr}H$  indica que, à medida que aumenta-se a segregação dos componentes formadores do sistema, as interações que são formadas devido a transferência da norbixina para a fase superior é mais estável que aquelas que são rompidas.

O comportamento de partição, não só de solutos, mas também de íons, em SAB, são compreendidos em termos de destruição/formação das interações intermoleculares que ocorrem ao longo do processo de transferência do soluto de uma fase para outra<sup>31,32</sup>. Assim a entalpia do processo de transferência da norbixina envolve seis termos de pares interacionais, de acordo com a equação 15.

$$\Delta_{tr}H = \Delta_{N-H_2O}H + \Delta_{N-S}H + \Delta_{H_2O-S}H + \Delta_{N-Macro}H + \Delta_{H_2O-Macro}H + \Delta_{S-Macro}H \quad (15)$$

em que  $\Delta_{i-j}H$  representa a entalpia de interação entre os componentes i e j. Estes componentes são: água (H<sub>2</sub>O), sal (S), macromolécula (Macro), norbixina (N).

Nos SAB, a principal diferença de composição entre as fases é a elevada concentração de macromoléculas na fase superior e de íons na fase inferior. Assim, no processo de transferência são formadas interações entre os pares N-Macro, H<sub>2</sub>O--S fazendo com que os termos  $\Delta_{H_2O-S}H$  e  $\Delta_{N-Macro}H$  contribuam para uma entalpia favorável à partição. Já os termos  $\Delta_{N-H_2O}H$ ,  $\Delta_{N-S}H$ ,  $\Delta_{H_2O-Macro}H$  e  $\Delta_{S-Macro}H$  representam os pares interacionais que são rompidos. Estes quatro últimos termos ocorrem com absorção de

energia e, assim, são desfavoráveis para o processo de transferência da norbixina para a fase polimérica.

Estes resultados fornecem suporte para uma interpretação molecular do processo de transferência. Supondo as magnitudes das interações N-H<sub>2</sub>O não sendo muito distintas nas fases superior e inferior, este termo não influencia os valores da entalpia de transferência. Assim, à medida que  $\Delta_{tr}H$  torna-se mais negativa,

$$|\Delta_{H_2O-Macro}H + \Delta_{S-Macro}H + \Delta_{N-S}H| < |\Delta_{N-Macro}H + \Delta_{H_2O-S}H|.$$

A partir da relação acima se pode analisar a influencia do ânion e hidrofobicidade do polímero sobre o fator entálpico de transferência da norbixina nos SAB do tipo polímero-eletrólito.

A análise do valor do  $\Delta_{tr}H$  para o 1º CLA dos SAB PEO 1500+ tartarato de sódio e PEO 1500+succinato de sódio mostra que a presença do ânion tartarato em detrimento do ânion succinato promove uma maior liberação de energia, isso ocorre, pois a interação H<sub>2</sub>O-S é mais forte para o primeiro sistema do que no segundo e promove uma maior liberação de energia.

Já a análise do 5º CLA do SAB PEO 1500+ tartarato de sódio e o 1º CLA do SAB PPO 400+ tartarato de sódio revela a influência da hidrofobicidade do polímero sobre o processo de transferência com base nas interações que são realizadas nesses sistemas. A partir dos valores encontrados para o  $\Delta_{tr}H$  conclui-se que as interações realizadas entre a macromolécula e as espécies químicas (H<sub>2</sub>O ou íons) eram mais desfavoráveis para o segundo sistema, devido principalmente a presença

dos segmentos óxido de propileno. Tais interações desfavoráveis necessitam absorver um menor conteúdo energético para serem rompidas, de modo que ao somar a energia consumida para quebrar as interações iniciais com a energia liberada devido as novas interações formadas é obtido esse valor de  $\Delta_{tr}H$  mais negativo para o sistema formado por PPO 400+ tartarato de sódio.

O termo  $\Delta_{tr}S$  relaciona com o aumento ou redução das possibilidades de distribuição dos componentes presentes no sistema que ocorre devido a transferência de moléculas de norbixina da fase inferior para a fase superior. Pela tabela 15, vemos que o processo termodinâmico estudado ocorre com aumento entropia ( $\Delta_{tr}S > 0$ ). Dessa forma é razoável considerar que o valor do  $\Delta_{tr}S$  medido está relacionado ao processo de transferência de todas as espécies químicas presentes no sistema que são afetadas pela passagem do soluto da fase inferior para a fase superior, conforme é mostrado pela equação 16.

$$\Delta_{Tr}S = \Delta_{Tr}S^N + \Delta_{Tr}S^{esp.quím.} \quad (16)$$

onde  $\Delta_{Tr}S^N$  é a variação de entropia devido as moléculas de *norbixina* e  $\Delta_{Tr}S^{esp.quím.}$  a variação de entropia devido as espécies químicas que se deslocam de uma fase para outra.

Da equação 16 temos que o primeiro termo da direita tem uma contribuição negativa, uma vez que o corante está saindo de uma região com maior densidade numérica e indo para uma região com menor densidade numérica. Já o outro termo tem uma contribuição positiva para a variação da entropia de transferência, pois tais espécies químicas (moléculas de água ou íons), que têm as interações quebradas devido a

chegada do soluto, irão migrar para uma região de maior densidade numérica, aumentando assim a entropia configuracional do sistema.

Análise similar ao realizado para a entalpia de transferência pode ser feita para o fator entrópico. Desse modo ao se comparar os valores de  $\Delta_{tr}S$  para o 1º CLA dos SAB PEO 1500+ tartarato de sódio e PEO 1500+ succinato de sódio, observa-se um menor incremento de entropia quando os ânions tartarato estão presentes, sendo isso devido à maior hidratação apresentada por esse ânion quando comparado ao succinato.

Ao comparar os 5º CLA do SAB PEO 1500+ tartarato de sódio com o 1º CLA do SAB PPO 400+ tartarato de sódio observa-se um menor incremento entrópico para o segundo sistema, isso é devido principalmente ao menor número de espécies químicas que se transferem para a fase inferior quando comparado à quantidade de espécies químicas que realizam esse mesmo processo no primeiro sistema.

Após analisar o efeito do ânion sobre os fatores entálpicos e entrópicos relacionados à partição da norbixina chega-se à conclusão que o aumento de entropia que ocorre devido a transferência das espécies químicas que inicialmente estavam interagindo com a macromolécula para a fase inferior se sobressai ao balanço de interações rompidas/formadas, uma vez que o SAB PEO 1500+ succinato de sódio apresentou um processo de partição mais espontâneo no valor de CLA analisado. Mesma influência do fator entrópico pode ser observado ao se estudar o efeito da hidrofobicidade de polímero.

Assim em resumo, podemos concluir que para o processo de transferência das moléculas de norbixina para a fase superior dos SAB tanto

o fator entálpico quanto o entrópico favorecem esse processo, porém o segundo fator tem maior destaque para sistemas do tipo PEO 1500+ tartarato de sódio, PEO 1500+ succinato de sódio e PPO 400+tartarato de sódio.

### **3.3 – Análise das propriedades dos componentes formadores dos SAB sobre o $K_N$ baseados no modelo termodinâmico de Johansson.**

Um modelo desenvolvido por Johansson et al.<sup>33</sup> foi usado para analisar o comportamento de distribuição de solutos em SAB em função dos fatores entálpicos e entrópicos, modelo este derivado da Teoria de Flory-Huggins.

A idéia é analisar separadamente cada fator em relação aos valores do coeficiente de partição obtido para um dado soluto. Assim a contribuição da entropia para a partição das moléculas de norbixina é obtido pela Eq. (17)

$$\ln K_N = \frac{M_N}{\rho} \left( \frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (17)$$

onde  $M_N$  é a massa molar do soluto particionado (norbixina),  $n^{FS}$  e  $n^{FI}$  são o número total de moléculas nas fases superior e inferior, respectivamente, os quais ao serem divididos por  $V^{FS}$  e  $V^{FI}$  originam a densidade numérica de cada fase, e  $\rho$  é a densidade numérica total do sistema, a qual é determinada pela razão entre o número total de partículas presentes e o volume total ocupado pelo sistema.

E o fator entálpico relacionado ao processo de partição das moléculas de norbixina é dada pela Eq. (18):

$$\ln K_N = -\frac{M_N}{RT} \left[ \sum_{i=1}^m (i \neq N) (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{iN} - \sum_{i=1}^{m-1} (i \neq N) \sum_{j=i+1}^m (j \neq N) (\phi_i^{FS} \phi_j^{FS} - \phi_i^{FI} \phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (18)$$

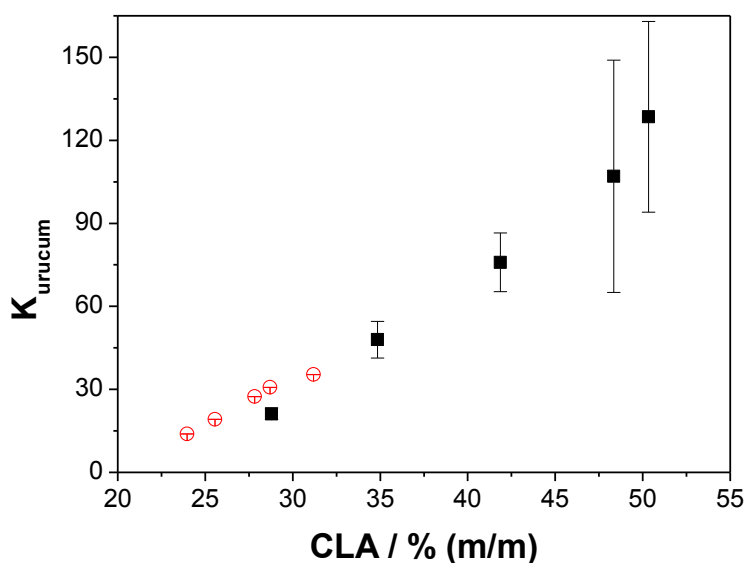
onde  $\phi_i^{FS}$  e  $\phi_i^{FI}$  são a fração volumétrica dos componentes formadores do SAB nas fases superior e inferior, respectivamente,  $w_{ij}$  é a energia envolvida na formação do par potencial efetivo definido como:  $w_{ij} = z[\epsilon_{ij} - (1/2)(\epsilon_{ii} + \epsilon_{jj})]$ ,  $z$  é o número de vizinhos próximos, e  $\epsilon_{ij}$  é a energia potencial do par  $i$ - $j$ .

Este modelo termodinâmico é muito útil, pois através de equações bem simples podemos fazer inferências sobre os fatores termodinâmicos que regem um dado processo de partição. Porém como todo modelo teórico ele não tem a obrigação de descrever exatamente todo o comportamento dos resultados experimentais, uma vez que podemos ter situações experimentais que fogem das condições pré-definidas na elaboração desses modelos. Um fato muito interessante dos resultados calorimétricos obtidos para os parâmetros termodinâmicos de partição da norbixina nos SAB é justamente essa diferença observada entre o comportamento real e o comportamento teórico, já que os valores determinados experimentalmente diferiram daqueles esperados para o modelo termodinâmico de Johansson et al., o qual prevê uma redução da entropia toda vez que o soluto particionar preferencialmente para a fase polimérica. Isso ocorre, pois tal modelo considera apenas o processo de transferência de moléculas do soluto, desprezando assim possíveis transferências de moléculas do solvente ou de íons que estão na fase que irá receber o soluto, e como discutido anteriormente as espécies químicas que são afetadas pelo processo de partição da norbixina devem ser consideradas. Entretanto tal fato observado não tira os méritos do modelo termodinâmico de Johansson

et. al.<sup>33</sup> o qual continua sendo de grande utilidade para a interpretar a influência sofrida por um dado soluto mediante alterações das propriedades dos componentes formadores dos SAB.

### 3.3.1- Efeito da massa molar do polímero PEO na partição da norbixina.

A figura 18 mostra a influência da massa molar de PEO sobre o valor do coeficiente de partição da norbixina no sistema PEO/ tartarato de sódio/ H<sub>2</sub>O. Pela figura pode-se ver que na região de menores valores de CLA, o comportamento do coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ ) em função do comprimento da linha de amarração (CLA) é muito similar.



**Figura 18:** Efeito da massa molar do polímero PEO no coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ ) em função do comprimento da linha de amarração (CLA). SAB: (■) PEO1500+tartNa+H<sub>2</sub>O e (○) PEO 4000+tartNa+H<sub>2</sub>O.

Tal comportamento nos leva a concluir que a massa molar do polímero PEO não tem efeito significativo sobre o processo de partição das moléculas de norbixina. Desse modo é tido que o processo de transferência

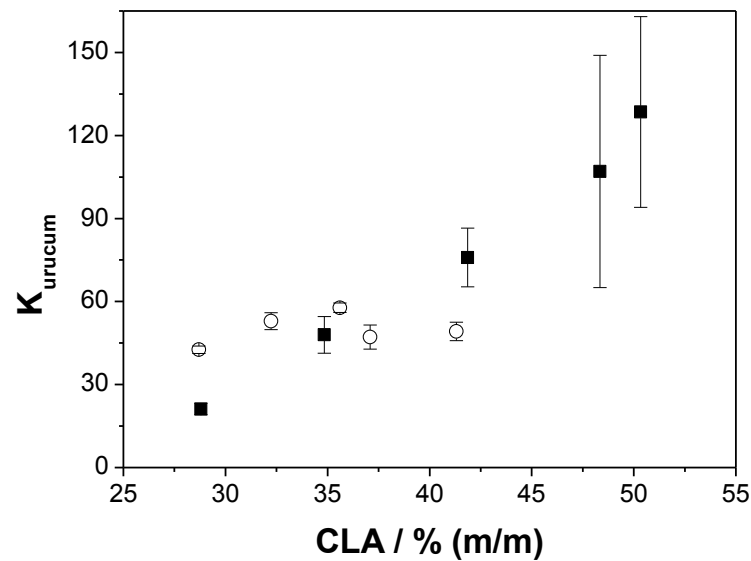
das moléculas de norbixina para a fase superior seja entálpicamente dirigido em sistemas do tipo PEO+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O.

Em certos casos a distribuição de um soluto é afetado pela massa molar do polímero constituinte do SAB<sup>33,8</sup>. De modo geral, aumento da massa molar do polímero do SAB reduz a concentração do soluto na fase que o polímero predomina. Isso é devido a redução da densidade numérica da fase, uma vez que quanto maior for a massa molecular do polímero, menor será o número de moléculas do mesmo por unidade de volume. Aumentando a diferença de densidade numérica entre as fases superior e inferior, dificultando assim a passagem do soluto para a fase rica em polímero, conforme pode ser deduzido da eq. 17.

Porém conforme foi observado na figura 18, onde os sistemas diferem apenas no tamanho da macromolécula constituinte, nenhuma alteração significativa no valor de  $K_N$  foi visto. Isto nos leva a concluir que é o fator entálpico o que direciona a distribuição preferencial da norbixina para a fase superior, uma vez que os polímeros utilizados apresentam a mesma unidade monomérica –EO-, tem-se que as interações realizadas por estas estruturas e o composto norbixina serão idênticas, ou seja com valores de energia efetiva de par potencial  $i-N$  ( $w_{iN}$ ) iguais, o que explica os valores próximos de  $K_N$  quando os dois sistemas estão em valores parecidos de CLA, como pode ser concluído a partir do termo relacionado ao fator entálpico do modelo de Johansson (equação 18).

### **3.3.2- Efeito da natureza do eletrólito na partição da norbixina**

É sabido que a modificação dos componentes formadores dos SAB podem afetar drasticamente o comportamento de partição do soluto de interesse<sup>34,35</sup>. Tal efeito pode ser observado na figura 19, onde avaliou-se a influência do ânion do eletrólito formador do SAB sobre a distribuição da norbixina em diferentes valores de CLA.



**Figura 19:** Influência da natureza do eletrólito formador do SAB no comportamento de partição da norbixina ( $K_N$ ) em função do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO1500+tartNa+H<sub>2</sub>O e (□) PEO1500+succNa+H<sub>2</sub>O.

Como pode ser observado para os sistemas formados com succinato, os maiores valores de  $K_N$  ocorreu quando o CLA foi inferior à 36,5 % . A troca do ânion formador do SAB de tartarato para succinato altera o comportamento de distribuição da norbixina em função da composição global do sistema. Nos SAB com Tartarato como ânion, tem-se um aumento do  $K_N$  com elevação do valor da CLA, já com succinato é observado uma tendência oposta para valores de CLA maiores que 36,50 %.

Para todos os fenômenos que ocorrem na natureza existe sempre um balanço entre os fatores entálpicos e entrópicos relacionados a tal fenômeno. De modo que podem ocorrer situações onde um ou outro fator esteja favorecendo a ocorrência espontânea de tal processo, ou uma situação mais favorável na qual tanto entalpia quanto a entropia favorecem a espontaneidade do fenômeno estudado.

Tal competição pode ser observada na figura 19, onde para o SAB constituído por PEO 1500+succinato de sódio+H<sub>2</sub>O, temos que em valores de CLA menores que 36,5% é o fator entálpico que comanda o fenômeno de partição da norbixina, e em valores de CLA superiores o fator entrópico passa a ter uma contribuição crescente sobre esse fenômeno de modo a reduzir o valor do  $K_N$ .

Em qualquer processo termodinâmico que ocorre existe sempre um balanço entre entalpia e entropia, onde podemos ter que os dois favorecem o fenômeno, ou situações onde um ou outro é quem se sobressai para que tal processo venha a ocorrer. A figura 19 demonstra bem essa situação onde para o SAB formado por PEO 1500+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O é o fator entálpico que governa o processo de transferência da norbixina em qualquer composição global na qual o sistema seja preparado, isso é visto pois os valores de  $K_N$  são sempre maiores que 1,0 e tendem a aumentar com o aumento do CLA. Isso ocorre, pois com o aumento do CLA, acabamos por aumentar a concentração do polímero na fase superior, e o termo  $[\sum_{i=1(i \neq N)}^m (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{iN}]$  destaca-se sobre os demais fatores que podem influenciar a partição do soluto de interesse.

Já para o sistema PEO 1500+succinato de sódio+H<sub>2</sub>O temos que a entalpia prevalece para valores de CLA menores que 36,5% e em valores maiores a entropia passa a contribuir mais significativamente para o processo de transferência da norbixina. Isso é visto devido ao comportamento contrário observado para o  $K_N$  que diminui à medida que o CLA é aumentado para valores superiores à 36,5%.

Temos que em valores menores de CLA, o aumento do mesmo tende a intensificar o número de interações entre moléculas do corante com moléculas do polímero, contribuindo para o primeiro termo da eq. (18) tornar-se mais negativo e aumentar o valor de  $K_N$ . Já em CLA maiores, a diferença na quantidade de água entre a fase inferior e superior é aumentada (Tabela 16); e conseqüentemente o termo  $[(n^{FS}/V^{FS}) - (n^{FI}/V^{FI})]$  na eq.(17) torna-se mais negativo, e a transferência das moléculas de norbixina para a fase superior é menos favorecido entropicamente.

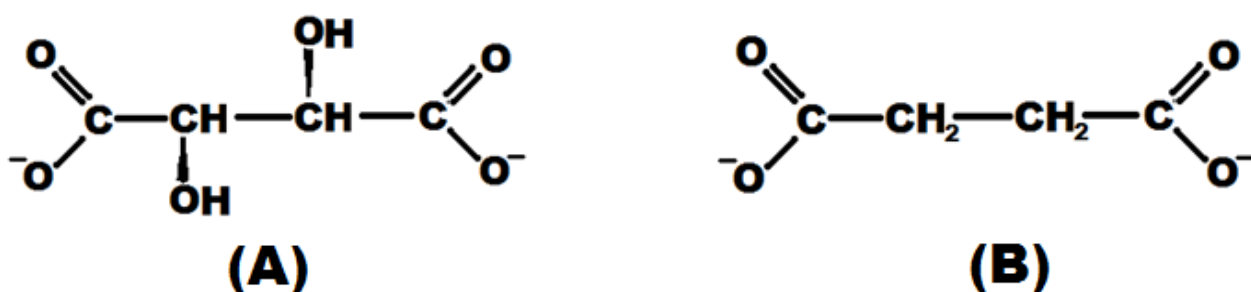
**Tabela 16:** Diferença da concentração de H<sub>2</sub>O entre as fases inferior e superior dos SAB, à 25 °C.

CLA	$\Delta[H_2O] = [H_2O]_{FI} - [H_2O]_{FS} \% (m/m)$				
	TartNa				SuccNa
	PEO1500	PEO4000	PPO400	L35	PEO1500
1	13,47	14,40	38,44	23,14	15,74
2	15,22	15,02	42,31	25,59	17,79
3	16,93	15,68	45,98	26,47	20,16
4	19,64	16,38	49,25	28,88	20,67
5	18,67	16,91	51,54	32,40	21,45

E como pode ser visto na tabela 16, a variação da concentração das moléculas de H<sub>2</sub>O em função do valor do CLA é maior quando o ânion succinato está presente, e assim o termo relacionado à entropia tem maior

destaque sobre este sistema do que o observado para o sistema que possui o ânion tartarato.

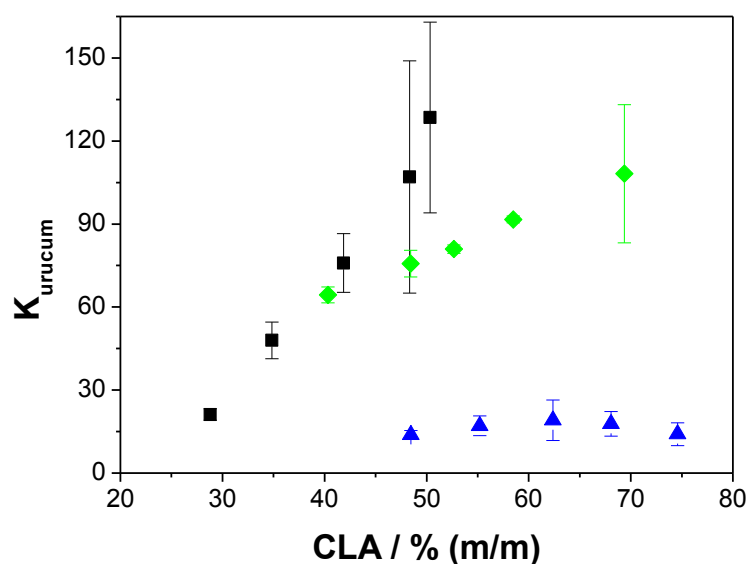
Além disso temos que considerar também a interação realizada entre esses ânions do eletrólito e o pseudo-policátion, pois é natural que ocorra uma disputa entre estas espécies e o composto norbixina, de tal maneira que aquele ânion que interagir mais fortemente irá dificultar a ocorrência da interação entre norbixina e o pseudo-policátion, reduzindo assim o valor de  $K_N$ . Assim temos que o ânion tartarato interage mais fortemente com o pseudo-policátion do que o ânion succinato, por isso o menor valor de  $K_N$  para o sistema no qual o primeiro ânion está presente em comparação ao segundo, como pode ser visto figura 19 para a região onde os dois sistemas apresentam a entalpia como fator governante sobre processo de partição da norbixina. Essa interação mais forte pode ser devido aos grupos hidroxilas presentes no ânion tartarato (figura 20), os quais podem estar desprotonados no valor de pH no qual o sistema foi preparado, e assim conferirá maior densidade de carga negativa para tal ânion, ou as interações mais eficientes que os átomos de oxigênio desse mesmo grupamento realizam com o pseudo-policátion, quando comparado as interações que os átomos de hidrogênio realizam com o pseudo-policátion.



**Figura 20:** Estruturas químicas dos ânions (A) tartarato e (B) succinato.

### 3.3.3- Efeito da Hidrofobicidade na partição da norbixina

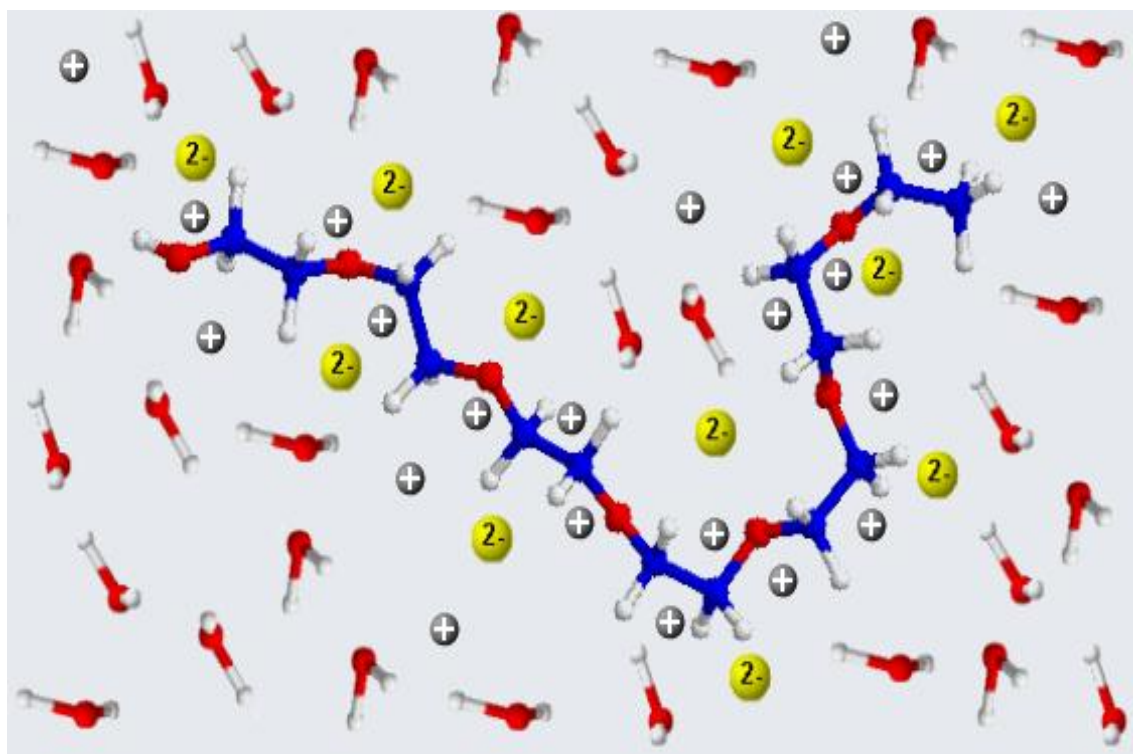
A figura 21 mostra o coeficiente de partição da norbixina em função do comprimento da linha de amarração (CLA) do sistema formado por PEO 1500+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O, L35+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O e PPO 400+tartarato de sódio+H<sub>2</sub>O. Como pode ser visto, a transferência da norbixina para a fase superior é reduzida a medida que aumenta a hidrofobicidade da mesma. Esse aumento da hidrofobicidade é dado pelo conteúdo de grupos óxido de propileno (PO) presentes na macromolécula.



**Figura 21:** Efeito da hidrofobicidade sobre o coeficiente de partição da norbixina ( $K_N$ ) em função do Comprimento da Linha de Amarração (CLA). SAB: (■) PEO1500+tartNa+H<sub>2</sub>O; (▲) PPO400+tartNa+H<sub>2</sub>O e (◆) L35+tartNa+H<sub>2</sub>O.

Sendo que para os polímeros/copolímeros estudados tem-se a seguinte ordem para o conteúdo de segmentos -PO-: PPO > L35 > PEO. Temos assim que quanto mais hidrofílico for o sistema preparado melhor deverá ser a partição da norbixina.

Pela figura 21 podemos ver o efeito que o aumento do caráter hidrofóbico do polímero causou sobre a partição da norbixina. O caráter hidrofóbico é aumentado pelo acréscimo de segmentos –PO– (óxido de propileno), sendo que nos polímeros/ copolímero usados tem-se a seguinte ordem quanto o segmento PPO (PEO 1500 < L35 < PPO400). O acréscimo de segmentos –PO– na macromolécula acaba por gerar uma diminuição da densidade de cargas da mesma, uma vez que é conhecido que os cátions presentes no meio apresentam a tendência de interagir com os segmentos –EO–, conforme evidenciado nos estudos calorimétricos realizados por Silva e Loh<sup>36</sup>. Tal interação acaba criando uma região com uma alta densidade de carga positiva, chamada de pseudo-policátion, como ilustrado na figura 22.



**Figura 22:** Modelo de interação cátion-PEO. Representação esquemática da saturação da cadeia polimérica. Legenda: (●) carbono, (●) oxigênio, (●) hidrogênio, (●) cátion do eletrólito formador do SAB e (●) ânion do eletrólito formador do SAB

Tal estrutura torna possível a interação com compostos que sejam carregados negativamente e viabilizando assim a sua partição/purificação. Dessa forma a diminuição do coeficiente de partição da norbixina está refletindo a redução da densidade de carga positiva sofrida pela macromolécula devido o acréscimo dos segmentos –PO-. Essa redução da carga efetiva do pseudo-polycation acaba por interferir na eficiência da interação deste com a norbixina de modo a alterar o valor do  $w_{iN}$ , muito possivelmente elevando o seu valor, o que segundo a equação 18, resulta na diminuição da extensão com que o soluto se transfere para a fase superior obedecendo a ordem: PPO < L35 < PEO, conforme observado na figura 21.

#### 4. Conclusões

Neste trabalho verificou-se a possibilidade de utilização dos sistemas aquosos bifásicos (SAB) como potencial metodologia para a extração/purificação do corante natural norbixina, uma vez que valores de coeficiente de partição variando de 8 a 130, dependendo do tipo de sistema utilizado, foram encontrados.

Com esse intuito os parâmetros mais importantes para se obter a melhor eficiência de extração/purificação do corante foram analisados. Os resultados obtidos pela metodologia de superfície de resposta (RSM) indicaram que a quantidade de polímero e sal são as variáveis que mais influenciam a partição da norbixina quantos os SAB utilizados são PEO 1500+ tartarato de sódio ou PPO 400+ tartarato de sódio. Já quando trocasse o ânion formador de tartarato para succinato, as variáveis que mais influenciaram foram a quantidade do sal e o valor do pH do sistema.

A análise dos parâmetros termodinâmicos  $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$  revelaram que a transferência de moléculas de norbixina da fase inferior para a superior é totalmente favorável do ponto de vista entálpico e entrópico, e que a espontaneidade dessa transferência aumenta com o aumento das diferenças entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases para os SAB: PEO 1500+ tartarato de sódio, PEO 4000+ tartarato de sódio, L35+ tartarato de sódio e PEO 1500+ succinato de sódio. Já para os SAB e PPO 400+ tartarato de sódio, a partir de certos valores dessa diferença de propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases, o processo de transferência passa a ocorrer em menor extensão. E assim torna necessário o estudo das condições de otimização dos parâmetros relevantes ao

processo de extração/purificação de qualquer soluto em sistemas aquosos bifásicos

Os estudos das características inerentes dos componentes formadores dos SAB foram avaliados em relação ao efeito causado pelo tamanho da cadeia polimérica, natureza do ânion e hidrofobicidade do polímero sobre o coeficiente de partição da norbixina. Observou-se que a natureza do ânion e a hidrofobicidade do polímero interferem no comportamento de partição do corante norbixina. Tem-se que o ânion tartarato irá competir mais fortemente com a norbixina pela interação com o pseudo-policátion do que o ânion succinato, causando assim um menor valor do  $K_N$ . Já quanto maior for a hidrofobicidade do polímero menor é o  $K_N$ , uma vez que o aumento do número de segmentos –PO- na macromolécula acaba por reduzir a densidade de carga do pseudo-policátion, e conseqüentemente a interação desta estrutura com as moléculas do corante.

E um fato muito interessante é que o estudo dos fatores termodinâmicos que regem a partição da norbixina em sistemas aquosos bifásicos não é totalmente correspondido pelo modelo termodinâmico de Johansson et al. visto que as condições reais do experimento difere das condições teóricas estipuladas na elaboração de tal modelo termodinâmico.

## Referências.

1. A.O.Rios, A.Z. Mercadante, C.D. Borsarelli, Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes and Pigments* 2007; 74: 561-565.
2. P.G. Prabhakara Rao, T. Jyothirmayi, K. Balaswamy, A. Satyanarayana, D.G. Rao. Effect of processing conditions on the stability of annatto (*Bixa orellana L.*) dye incorporated into some foods. *LWT* 2005; 38:779-784.
3. V. Galindo-Cuspinera, A.S. Rankin. Bioautography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 2524-2529.
4. N. M. Gómez-Ortíz, L.A. Vázquez-Maldonado, A.R. Pérez-Espadas, G.J. Mena-Rejón, J.A. Azamar-Barrios, G. Oskam. Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. *Solar Energy Materials & Solar Cells* 2010; 94: 40-44.
5. R. Parimalan, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G.A. Ravishankar. Annatto Fruit Pericarp: Newer Source as a Potencial Fuel. *Energy & Fuels* 2007; 21: 1181-1182.
6. R.W. Alves, A.A.U. Souza, S.M.A.G.U. Souza, P. Jauregi. Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas aphrons (CGAs). *Separation and Purification Technology* 2006; 48: 208-213.
7. M.J. Scooter, L.A. Wilson, G.P. Appleton, L. Castle. Analysis of Annatto (*Bixa orellana L.*) Food Coloring Formulations. 1.Determination of Coloring Components and Colored Thermal Degradation Products by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46: 1031-1038.
8. A.B. Mageste, L.R de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim. Aqueous two-phase systems: Na efficient, environmentally safe and economically viable

- method of purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography A*. 2009; 45: 1216, 7623.
9. M.K. Purkait, S. DasGupta, S. De. Determination of thermodynamic parameters for the cloud point extraction of different dyes using TX-100 and TX-114. *Desalination* 2009; 244: 130-138.
  10. S.A.B.V. Melo, G.M.N. Costa, A.C.C Viana, F.L.P. Pessoa. Solid pure component property effects on modeling upper crossover pressure for supercritical fluid process synthesis: A case study for the separation of Annatto pigments using SC-CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids* 2009; 49: 1-8.
  11. Y. Akama, A. Tong, M. Ito, S. Tanaka. The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system. *Talanta* 1999; 48: 1133-1137.
  12. G. Muthuraman, K. Palanivelu. Selective extraction and separation of textile anionic dyes from aqueous solution by tetrabutyl ammonium bromide. *Dyes and Pigments* 2005; 64: 251-257.
  13. J.G. Huddleston, H.D. Willauer, K.R. Boaz, R.D. Rogers. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. *Journal of Chromatography B* 1998; 711: 237-244.
  14. L. Bulgariu, D. Bulgariu. Hg(II) extraction in a PEG-based aqueous two-phase system in the presence of halide ions. I. Liquid phase analysis. *Central European Journal of Chemistry* 2006; 4: 246-257.
  15. G.D. Rodrigues, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paggioli, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. *Separation and Purification Technology* 2008; 62: 687-693.
  16. N.P. Marhual, N. Pradhan, R.N. Kar, L.B. Sukla, B.K. Mishra. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Bioresource Technology* 2008; 99: 8331-8336.
  17. G.X. Zhao, J.X. Xiao. Aqueous Two-Phase System of the Aqueous Mixtures of Cationic-Anionic Surfactants. *Journal of Colloid Interface Science* 1996; 177: 513-518.

18. A.J. Tong, Y. Wu, L.D. Li, Y. Akama, S. Tanaka. Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins. *Analytica Chimica Acta* 1998; 369: 11-16.
19. Y. Akama, A. Tong, M. Ito, S. Tanaka. The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system. *Talanta* 1999; 48: 1133–1137.
20. A.J. Ting, J.J. Dong, L.D. Li. Aqueous two-phases extraction system of sodium perfluorooctanoate and dodecyltriethylammonium bromide and its application to porphyrins and dyes. *Analytica Chimica Acta* 1999; 390: 125-131.
21. A.E. Visser, A.E. Griffin, D.H. Hartman, R.D. Rogers. Naphthol- and resorcinol-based azo dyes as metal ion complexants in aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography B* 2000; 743: 107–114.
22. J.P. Martins, A.B. Mageste, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, P.R. Patrício, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data* 2009; 54: 2891-2894.
23. M.T. Zafarani-Moatar, S. Hamzehzadeh, S. Hosseinzadeh. Phase diagrams for liquid-liquid equilibrium of ternary poly(ethylene glycol)+di-sodium tartrate aqueous system and vapor-liquid equilibrium of constituting binary aqueous systems at  $T=(298.15, 308.15 \text{ and } 318.15)\text{K}$ . Experiment and correlation. *Fluida Phase Equilibria* 2008; 268: 142-152.
24. S.A.M. Martins, D.M.F. Prazeres, L.P. Fonseca, G.A. Monteiro. *Applicaation of central composite design for DNA hybridization onto magnetic microparticles*, *Analytical Biochemistry* 2009; 391: 17-23

25. A.M. Azevedo, P.A.J. Rosa, I.F. Ferreira, M.R. Aires-Barros. *Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies.* Journal of Biotechnology 2007; 132: 209-217
26. B. Mutel, M. Bigan, H. Vezin. *Remote nitrogen plasma treatment of a polyethylene powder Optimisation of the process by composite experimental designs.* Applied Surface Science 2004; 239: 25-35
27. Q.K. Beg, V. Sahai, R. Gupta. *Statistical media optimization and alkaline protease production from Bacillus mojavensis in a bioreactor.* Process Biochemistry 2003; 39: 203-209
28. M. Zabeti, W.M.A.W. Daud, M.K. Aroua. *Optimization of the activity of CaO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst for biodiesel production using response surface methodology.* Applied Catalyst A: General 2009; 366: 154-159
29. D. Qiao, B. Hu, D. Gan, Y. Sun, H. Ye, X. Zeng. *Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from Hyriopsis cumingii.* Carbohydrate Polymers 2009; 76: 422-429
30. Y. Q. Ling, H-L. Nie, S-N. Su, C. Branford-White, L-M. Zhu. *Optimization of affinity partitioning of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology.* Separation and Purification Technology 2010; xxx: xxx-xxx
31. S. Chia-Kai, C. Been Huang. *Process Biochemistry* 2006; 41: 257-263.
32. B. Andrea, B. Georgina, P. Guillermo, N. Bibiana. *Journal Chromatography B* 2006; 837: 18-23.

- 33.H-O. Johansson, G. Karlström, F. Tjerneld, C.A. Haynes. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 1998; 711: 3-17.
- 34.L.H. Haraguchi, R.S. Mohamed, W. Loh, P.A. Pessoa Filho. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymer and potassium phosphate. *Fluid Phase Equilibria* 2004; 215: 1-15.
- 35.L.H.M. da Silva, W. Loh, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e Aplicações para Partição/Purificação de Proteínas. *Química Nova*; 2006; 29: 1345-1351.
- 36.L.H.M. da Silva, W. Loh. Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous Two-Phase Systems in Ternary Mixture of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (or Dextran). *Journal of Chromatography B* 2000; 104: 10069-10073.