

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

DÉBORA FREITAS COLOSIMO

**DESENVOLVIMENTO, MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO
PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIXINA DE
SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana L.*)**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

DÉBORA FREITAS COLOSIMO

**DESENVOLVIMENTO, MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO
PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIXINA DE
SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana L.*)**

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

Orientador: Prof. Luis Antonio Minim

Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim
Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C719d
2021 Colosimo, Débora Freitas, 1990-
Desenvolvimento, modelagem e simulação do processo de
extração e purificação de bixina de sementes de urucum (*Bixa
orellana L.*) / Débora Freitas Colosimo. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (62 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luis Antonio Minim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.256>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Urucum. 2. Precipitação (Química) - Métodos de
simulação. 3. Sistemas aquosos bifásicos. 4. SuperPro Designer
(Software). I. Minim, Luis Antonio, 1960-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.022

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

DÉBORA FREITAS COLOSIMO

**DESENVOLVIMENTO, MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO
PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIXINA DE
SEMENTES DE URUCUM (*Bixa orellana L.*)**


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

APROVADA: 13 de outubro de 2021.

Assentimento:



Débora Freitas Colosimo
Autora



Luis Antonio Minim
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Luis Antonio Minim, pela confiança ao longo da condução deste trabalho.

Aos meus pais, Enrico e Marta, pelos ensinamentos, confiança, amor, dedicação depositados em mim todos esses anos.

Ao meu marido, Rafael, por ser meu porto seguro, sempre estar ao meu lado, me apoiando, me dando carinho, paciência, alegria e amor.

Aos meus amigos, sempre presentes em minha vida.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional, meu muito obrigada!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

RESUMO

COLOSIMO, Débora Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Desenvolvimento, modelagem e simulação do processo de extração e purificação de bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*)**. Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim e Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal.

Com o objetivo de extrair e purificar a bixina de sementes de urucum, um novo processo baseado em extração alcalina, partição com sistemas aquosos bifásicos (SAB) e precipitação ácida foi desenvolvido em um simulador *SuperPro Designer v. 7.0*® (INTELLIGEN INC, USA). Para implementar o modelo, foram obtidos dados experimentais da lixiviação das sementes, extração líquida do pigmento em SAB e precipitação ácida. As sementes foram lixiviadas com soluções salinas alcalinas para a obtenção do extrato. Um planejamento fatorial de face centrada (DFFC) foi aplicado para investigar os efeitos da concentração de sal, pH e temperatura sobre o rendimento de extração do pigmento. Os maiores valores de rendimento foram obtidos quando se utilizou fosfato de potássio, concentração do sal de 20% (p/p), temperatura 25 °C e pH 9,0. O extrato obtido foi então purificado usando SAB composto por fosfato de potássio (14%) pH 9,0 e polietileno glicol 1500 mol/L (14%) e este processo revelou que o sal de norbixina particionou preferencialmente para a fase superior ($K_p = 210,21$). O estudo de precipitação demonstrou que à medida que o pH diminui (até pH 5,0), a concentração do sal de norbixina na fase superior do SAB diminui. A simulação do processo com 1 ton de sementes de urucum indicou que a planta tem capacidade para produzir mais de 1.900 kg/ano do produto principal (88% de norbixina). O preço de venda (\$ 2.400/kg) foi determinado como parâmetro mais sensível na análise de sensibilidade. Baseado nos índices econômicos analisados o projeto mostrou-se atrativo.

Palavras-chave: Urucum. Extração alcalina. SAB. *SuperPro Designer*.

ABSTRACT

COLOSIMO, Débora Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Development, modeling and simulation of extraction and purification of bixin from annatto seeds (*Bixa orellana L.*)**. Adviser: Luis Antonio Minim. Co-advisers: Valéria Paula Rodrigues Minim and Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal.

To extract and purify bixin from annatto seeds, a new process based on alkaline extraction, partition with an aqueous two-phase system (ATPS) and acid precipitation was developed on a *SuperPro Designer v. 7.0*® simulator. To implement the model, experimental data of seed leaching, liquid extraction in an ATPS and acid precipitation were determined. The seeds were leached using alkaline saline solutions and a face-centered factorial design (FCD) was applied to investigate the effects of salt concentration, pH and temperature on the yield of the dye extraction. The highest yields were obtained with potassium phosphate 20% (w/w), at 25 °C and pH 9.0. The extract was then purified using ATPS composed of potassium phosphate (14%) pH 9.0 and polyethylene glycol 1500 mol/L (14%) and norbixin salt preferentially partitioned to the top phase ($K_p = 210.21$). The acid precipitation demonstrated that, as the pH decreases, the concentration of norbixin salt in the top phase decreases. The process simulation with 1 t of annatto seeds showed that the plant has the capacity to produce more than 1,900.00 kg/year of the main product (88% of norbixin). The selling price (\$ 2,400/kg) was the most sensitive parameter of the sensitivity analysis. Therefore, the project is attractive based on the economic indexes analyzed.

Keywords: Annatto. Alkaline extraction. ATPS. *SuperPro Designer*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
OBJETIVOS	10
Objetivo geral.....	10
Objetivos específicos.....	10
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	11
1. Urucum	11
1.1 Pigmentos do Urucum	13
2. Importância econômica	16
3. Aplicação	17
4. Processos de obtenção de corantes do urucum	18
4.1 Processos Mecânicos	19
4.1.1 Atrito e secagem em leito de jorro	19
4.1.2 Raspagem e peneiramento	20
4.2 Processos Físico-Químicos	20
4.2.1 Extração com óleos vegetais	20
4.2.2 Extração com solventes orgânicos	21
4.2.3 Extração com soluções alcalinas	21
4.2.4 Extração com CO₂ supercrítico	22
5. Sistemas aquosos bifásicos	23
5.1 Aplicação dos SAB na purificação de corantes	24
6. Modelagem de processos	25
7. Viabilidade econômica	27
7.1 Valor Presente Líquido (VPL)	27
7.2 Taxa Interna de Retorno (TIR)	27
7.3 Payback	28
8. Referências bibliográficas	29
CAPÍTULO 2 – DEVELOPMENT, MODELING AND SIMULATION OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF BIXIN FROM ANNATTO SEEDS (<i>Bixa orellana L.</i>)	33
ABSTRACT	33
1-INTRODUCTION	34
2- MATERIALS AND METHODS	35
2.1 – Raw material and chemicals	35
2.2 – Seed characterization	36
2.3 – Leaching experiments	36

2.4 – Partition experiments	38
2.5 – Precipitation experiments	39
2.6-Modeling	40
2.6.1 – Process description	40
2.6.2 – Economic analysis	46
3 – RESULTS AND DISCUSSION	47
3.1 – Seeds characterization	47
3.2 – Leaching	47
3.3 – ATPS extraction of bixin	48
3.4 – Acid precipitation	50
3.5 – Modeling	52
3.5.1 – Economic results	52
3.5.2 – Sensitivity analysis	55
3.5.2.1 – Main product selling price	56
4 – CONCLUSION	57
5 - ACKNOWLEDGEMENTS	57
6 - REFERENCES	58
CONCLUSÃO GERAL	62

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil tem se consolidado como o maior produtor a nível mundial de sementes e corante de urucum, se destacando tanto pela quantidade quanto pela qualidade, disponibilizando no mercado sementes com até 6% de bixina, o carotenóide majoritário das sementes de urucum. Segundo o IBGE, a produção de urucum no Brasil tem evoluído, sendo que em 2019 alcançou uma produção de 15.625 toneladas. Por outro lado, os preços das sementes têm aumentado ao longo dos anos, principalmente devido à falta de matéria prima no mercado, para além do que seria demandado pelas indústrias.

Devido à preocupação com aspectos ambientais e de saúde, consumidores têm procurado cada vez mais por produtos que não fazem uso de aditivos sintéticos. Além disso, percebe-se que vários países têm proibido o uso de corantes sintéticos em alimentos. Neste contexto, a aplicação de corantes naturais tem se intensificado nas indústrias alimentícias e, portanto, o desenvolvimento tecnológico de processamento deve acompanhar a evolução do mercado.

Na tecnologia de processamento de urucum não se tem percebido muita inovação, sendo que três métodos comerciais de extração se destacam: a extração alcalina, a extração em óleo e a extração com solventes orgânicos. Entretanto, devido aos recentes interesses na separação de substâncias farmacologicamente ativas presentes nas sementes de urucum, o desenvolvimento tecnológico para essas indústrias tem ganhado destaque podendo alcançar um novo patamar. Sendo assim, novas técnicas de extração têm sido estudadas, incluindo extração assistida por ultrassom ou micro ondas, extração com fluido supercrítico e extração acelerada por solventes.

Impurezas presentes no extrato, tais como açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e outras moléculas solúveis, devido aos métodos não seletivos de extração podem significativamente afetar a qualidade e estabilidade do corante e substâncias ativas presentes. Consequentemente, uma purificação posterior é desejada para aumentar a atividade biológica e a vida de prateleira dos componentes extraídos. Sistemas aquosos bifásicos é uma operação unitária de extração líquido-líquido que tem sido utilizada para separação e purificação de compostos biológicos, uma vez que se apresenta como um sistema composto em grande parte por água e pequenas quantidades de polímeros e sais, estando em conformidade com os requerimentos da química verde.

Considerando o que foi apresentado, este trabalho teve como objetivo estudar o processo de extração de bixina a partir de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) usando soluções

alcalinas e a purificação do pigmento com o uso de sistemas aquosos bifásicos compostos por polímeros e sais, e precipitação ácida. O processo foi modelado usando o *software SuperPro Designer*® e os dados de cada etapa do processo foram obtidos experimentalmente por meio de ensaios conduzidos em escala de bancada. Além disso, a viabilidade econômica do modelo foi avaliada a através de análises de sensibilidade.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolvimento, modelagem e simulação do processo de extração e purificação de bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) usando dados experimentais obtidos em escala de bancada.

Objetivos específicos

- Estudar a extração de bixina com diferentes soluções alcalinas avaliando os efeitos da concentração de sal, pH e temperatura;
- Determinar os coeficientes de partição do pigmento, proteína e açúcares utilizando a extração líquido-líquido com sistemas aquosos bifásicos;
- Estudar o processo de precipitação ácida da bixina após a operação de extração líquido-líquido em diferentes valores de pH;
- Desenvolver um modelo matemático do processo de extração e purificação de urucum usando o software SuperPro Designer® (INTELLIGEN INC, USA), avaliando os balanços de massa e energia;
- Avaliar a viabilidade técnico-econômica do modelo.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. Urucum

A palavra urucum tem origem no Tupi-Guarani *uru-ku* e significa “vermelho” (CASTRO et al., 2009). É o nome dado a planta denominada cientificamente como *Bixa orellana* L. e pertencente à família Bixaceae. É uma planta arbórea (Figura 1) originária da América Tropical e compõe à flora amazônica, mas, apesar disto, pode ser encontrada em locais diversos com as mesmas características do clima tropical, tais como: Colômbia, México, Equador e Peru (RADDATZ-MOTA et al., 2017). As características botânicas da planta são heterogêneas, mas em geral é considerado um arbusto de crescimento rápido que pode atingir de 2 a 5 metros e, excepcionalmente, pode atingir até 10 metros. Além disso, apresentam flores e produzem frutos ovoides tipo cápsula, chamados de cachopas (Figura 2a). As sementes encontram-se no interior das cápsulas e estas podem variar de quantidade dependendo da variedade da planta (CASTRO et al., 2009; DEMCZUK JR; RIBANI, 2015).



Figura 1. Urucuzeiro (CARVALHO, 2020).

As sementes são consideradas a parte da planta com importância comercial, já que o pericarpo seco da semente (revestimento externo da semente) possui pigmentos com grande aplicação industrial. A partir delas é produzido um dos corantes mais usados no mundo, que é aplicado não somente em produtos alimentícios, mas também nas indústrias química, cosmética e farmacêutica (VILAR et al., 2014). O baixo custo de produção e baixa toxicidade fazem deste um pigmento atrativo comparados a outros corantes sintéticos (AGNER et al., 2004). Dentre os corantes naturais, o urucum tem grande importância econômica-social, já que a partir de suas sementes consegue-se obter corantes que vão do amarelo ao castanho, passando pelo vermelho.

Além disso, quando comparado aos demais pigmentos naturais, o urucum possui maior estabilidade e uma coloração atrativa (TAHAM et al., 2015).

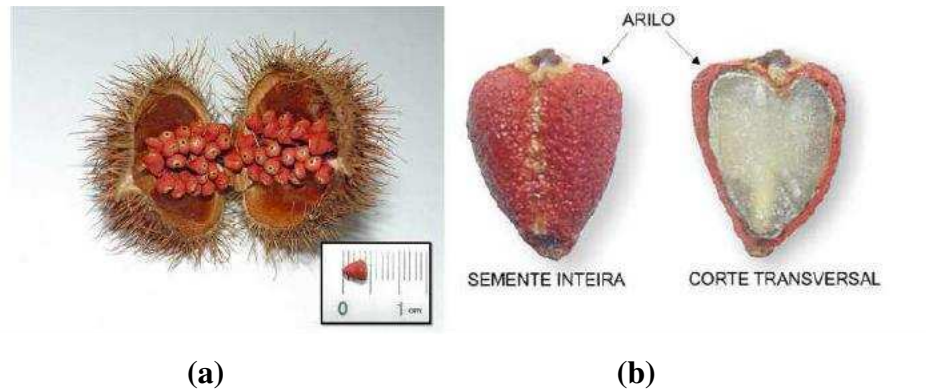


Figura 2. (a) Cachopa de urucum (b) Semente inteira e em corte (CARVALHO, 2020)

As sementes de urucum apresentam um arilo (pericarpo, Figura 2b) que possui várias substâncias além do pigmento vermelho característico. Este representa de 5 a 10% do peso da semente, dos quais 30% do peso total é representado pelos carotenóides. Os 70% restantes estão divididos entre proteínas, lipídeos, carboidratos, umidade e cinzas (Tabela 1) (CARVALHO et al., 2010).

Tabela 1. Composição das sementes de urucum

Composição (%)	Semente ⁽¹⁾	Arilo
Umidade	9,8	3,5
Cinzas	4,6	2,0
Proteína bruta (%N x 6,25)	10,8	2,5
Extrato etéreo	4,8	30,0
Carboidratos totais	70	32,0
Carotenóides totais	-	30,0

(1) Semente sem arilo

Fonte: CARVALHO et al., 2010

1.1 Pigmentos do Urucum

Os pigmentos do urucum se encontram recobrando a superfície externa das sementes. A bixina é o pigmento presente em maior concentração nas sementes, representando cerca de 80% do total de carotenóides. Sendo assim, é o pigmento mais importante, responsável pelas tonalidades que variam do amarelo ao vermelho. De acordo com as características da planta (tipo ou variedade), a localização geográfica da cultura, a altitude da área explorada e as condições climáticas, a quantidade de bixina nas sementes pode variar de 1% a 6% (CASTRO et al., 2009; VILAR et al., 2014).

A bixina (Figura 3) possui uma cadeia de 25 carbonos, fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, sendo que, essa última estrutura, confere ao pigmento um caráter lipofílico, tornando-o insolúvel em água (DA COSTA; CHAVES, 2005). O cromóforo da bixina é o sistema de duplas ligações conjugadas, conferindo sua coloração avermelhada particular. Porém, essa mesma estrutura é a origem da sensibilidade aos danos causados pelo oxigênio, luz e temperatura (FRANCIS, 1996).

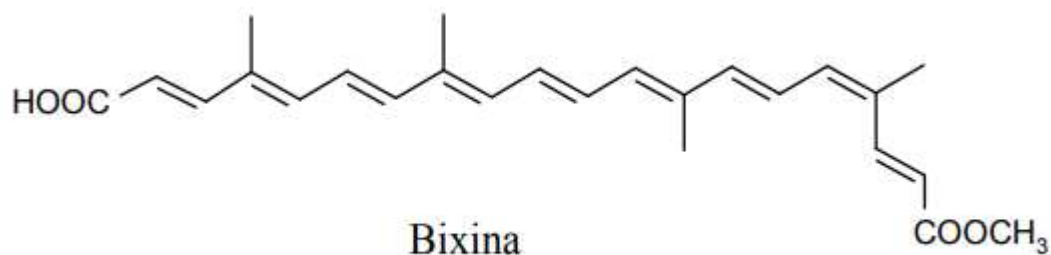


Figura 3. Molécula da bixina (RIOS; MERCADANTE, 2004).

A norbixina (Figura 4), com fórmula molecular $C_{24}H_{28}O_4$, é o derivado da bixina que, apesar de ocorrer naturalmente, é quase sempre referida como produto da saponificação da bixina, sendo esta a sua forma de obtenção para fins comerciais (VILAR et al., 2014). Em meios alcalinos, o grupo metil da bixina pode ser saponificado, produzindo o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina, de menor caráter lipofílico (SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2009).

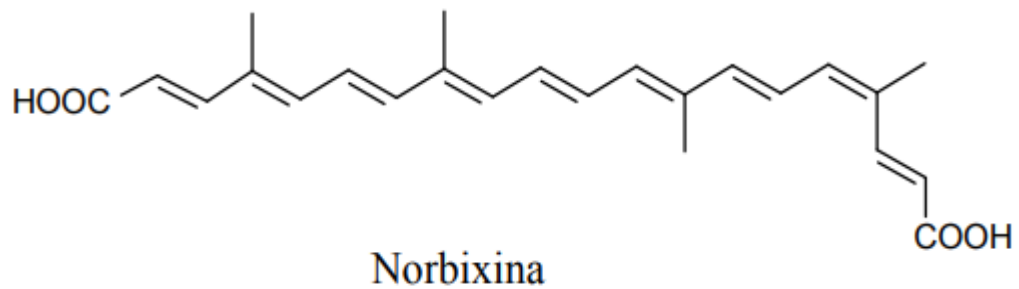


Figura 4. Molécula de norbixina (RIOS; MERCADANTE, 2004).

A bixina e a norbixina apresentam duas configurações estereoquímicas, isto é, *cis* e *trans*. Em condições normais, nos extratos pode-se predominar a *cis*-bixina ou a *cis*-norbixina, mas elas são mais instáveis. Em solução sob aquecimento a *cis*-bixina é convertida para a configuração *trans*, mais estável. Ao continuar o aquecimento, são gerados compostos de degradação, conforme mostrado na Figura 5 (FRANCIS, 1996).

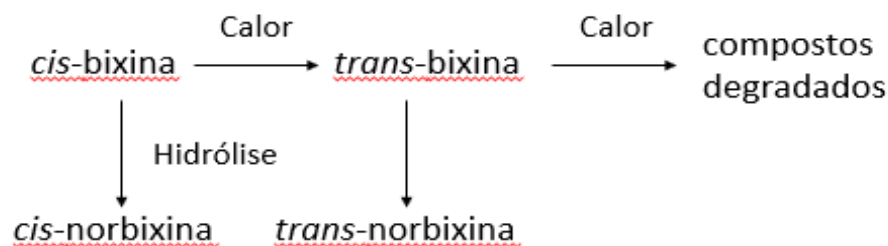


Figura 5. Inter-relação entre os diferentes pigmentos do urucum (adaptado de FRANCIS, 1996).

A bixina e a norbixina, por apresentarem dois grupamentos fortemente polares em sua molécula, são uma particularidade dentre os carotenóides. Além disso, a bixina é uma exceção já que é um carotenóide naturalmente encontrado na forma *cis* enquanto os demais têm a configuração *trans* (DEMCZUK JR; RIBANI, 2015). A *cis*-bixina é sensível à luz e também é instável a temperatura ambiente, mesmo quando armazenada no escuro (HENRY, 1996).

Em meios onde há excesso de álcali, a bixina dissocia-se para formar um sal, convertendo-se em um composto solúvel em água, denominado norbixinato, ou sal de norbixina. Isto ocorre por meio da hidrólise do grupamento éster. Se o meio torna-se ácido, o norbixinato é reprotonado, formando a norbixina, que é um ácido dicarboxílico insolúvel em água, ocorrendo então a precipitação do pigmento. Tal mecanismo é apresentado na Figura 6.

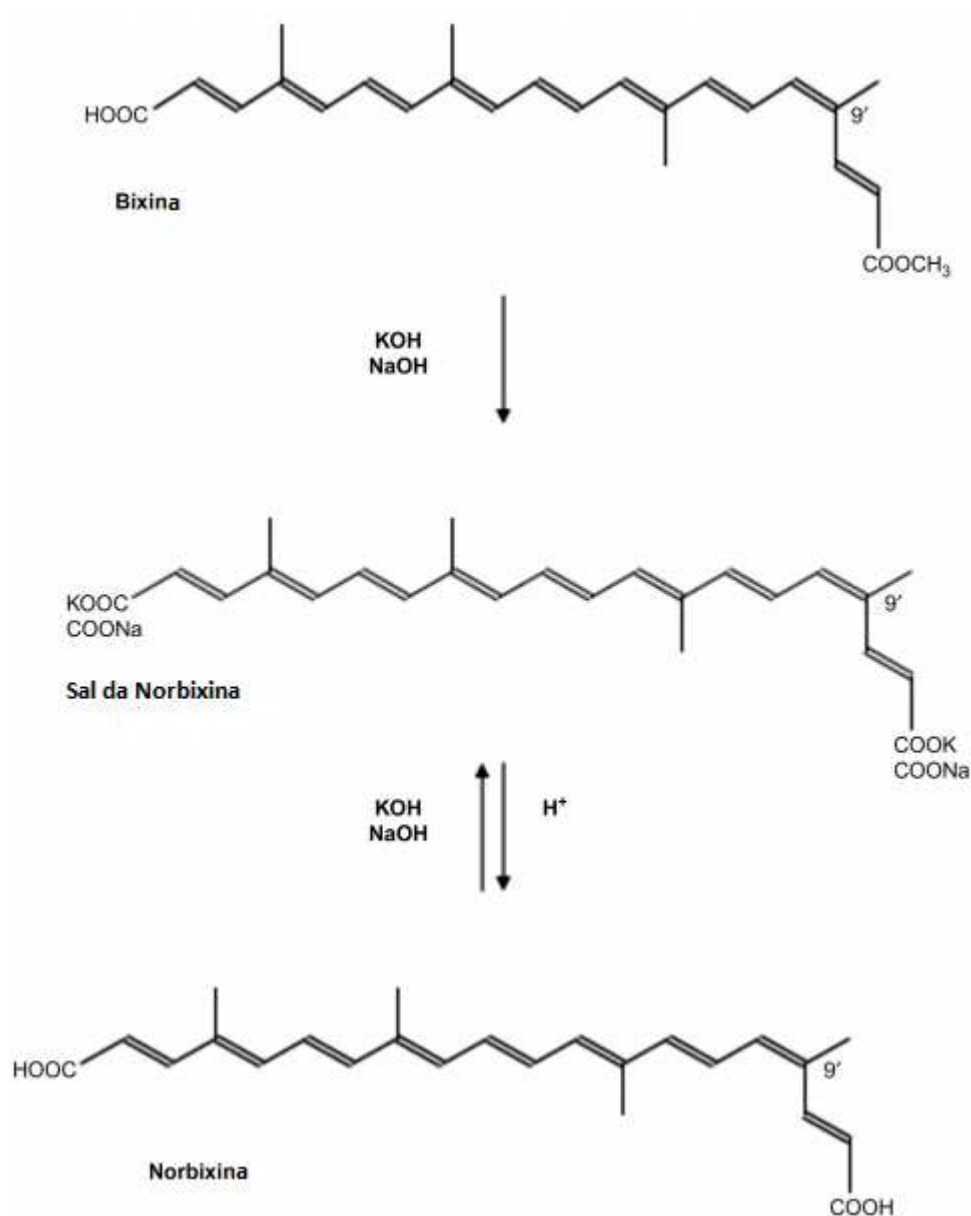


Figura 6. Mecanismo de conversão da bixina, em norbixina e no sal norbixinato (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018)

Sendo assim, a partir da bixina são obtidos os demais pigmentos do urucum, a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e os produtos de degradação térmica (lipossolúveis e de coloração amarela mais estável).

Outros carotenóides já foram isolados das sementes de urucum, entretanto, em quantidades muito pequenas. Além disso, utilizando-se técnicas como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear, já foram reveladas as estruturas destes compostos (MERCADANTE et al., 1996; MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1997, 1999). Os

mesmos autores relatam em trabalhos que outros carotenóides foram detectados nas sementes de urucum, tais como: β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e metil bixina.

2. Importância econômica

A busca por uma alimentação mais saudável é uma tendência mundial que tem proporcionado um aumento no consumo de corantes naturais. Estes são utilizados desde os primórdios da humanidade, mas foram substituídos aos poucos pelos corantes sintéticos, que são mais práticos, estáveis (em relação a pH, luz, oxigênio e calor) e possuem baixo custo de produção. A preocupação dos consumidores com aspectos ambientais e também de saúde, além da proibição do uso de corantes sintéticos em alimentos em vários países, fez com que algumas indústrias tenham optado pela exploração de corantes naturais, como o urucum. O baixo custo de produção e baixa toxicidade do corante de urucum o tornam ainda mais atrativo.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de urucum, com produção anual de 15.625 ton (Figura 7), em que cerca de 70% é utilizada na produção de corantes. O seu plantio está presente em quase todo o território nacional, sendo que os estados com maior produção são São Paulo (5.424 ton) e Rondônia (3.566 ton) (IBGE, 2021).

No Brasil, a cultura e produção do urucuzeiro são destinadas principalmente a comercialização de grãos moídos, a partir dos quais são fabricados colorífico para os mercados nordestinos e corantes naturais para o sul do país. Estes corantes possuem diversas aplicações como em massas, doces, sorvetes, bebidas, tintas, entre outras (FABRI; TERAMOTO, 2015).

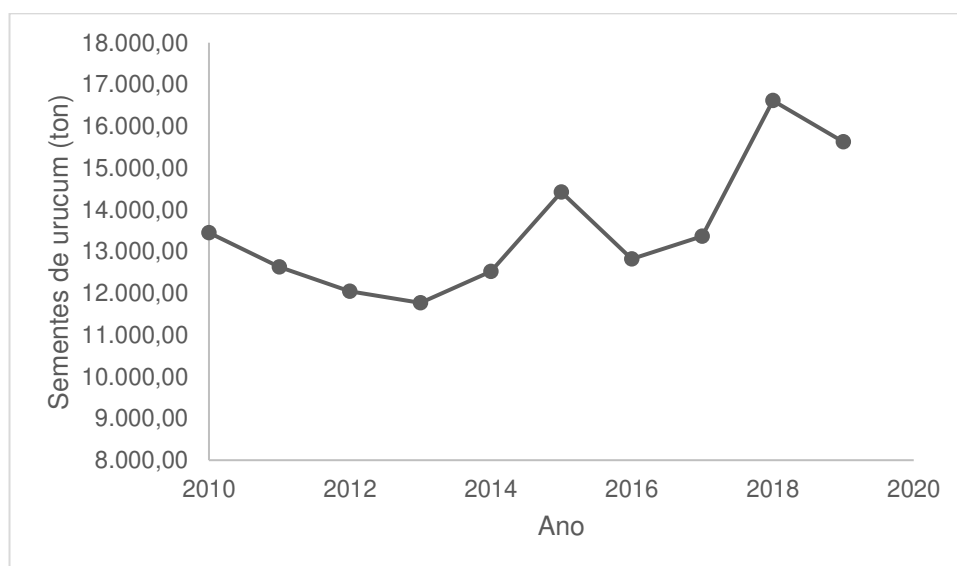


Figura 7. Produção de sementes de urucum no Brasil (IBGE, 2021).

Como o urucuzeiro possui cultura perene e de baixo investimento, visto que se desenvolve naturalmente em solos de média e baixa fertilidade, a produção de urucum era voltada a pequenos e médios produtores. Entretanto, com a mudança do cenário comercial, o urucum se tornou uma das principais matérias-primas de corantes naturais, logo, sua produção teve um crescimento e já é encontrada em grandes propriedades rurais (FABRI e TERAMOTO, 2015).

A qualidade das sementes está diretamente relacionada a fatores como umidade, impurezas e teor de pigmento, sendo que este último determina o preço de venda das sementes (DEMCZUK JR; RIBANI, 2015).

O mercado de urucum corresponde a aproximadamente 90% do consumo total de corantes naturais do Brasil e cerca de 70% de corantes naturais do mundo. Sendo assim, as perspectivas de crescimento deste mercado são promissoras. Além disso, pesquisas mostram que parte das sementes que antes eram descartadas pela indústria de corantes podem ser utilizadas em misturas com rações animais ou para adubação orgânica (SILVA et al., 2006).

3. Aplicação

O urucum é utilizado na indústria alimentícia há muitos anos, especialmente em laticínios e carnes. Tecnicamente é um bom corante e possui uma certa flexibilidade, já que possui as formas lipo e hidrossolúveis (FRANCIS, 1996). Além disso, o sucesso do uso deste corante no setor é devido à comparativa instabilidade dos corantes sintéticos utilizados para a mesma finalidade, além de possuir baixa toxicidade e geralmente exibir melhor biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente (RATHER; MOHAMMAD, 2016).

Na indústria de alimentos, os pigmentos hidrossolúveis do urucum são aplicados principalmente em sorvetes, queijos, bebidas, molhos, dentre outros e representam quase a totalidade do mercado do corante. Já os lipossolúveis são utilizados em cremes vegetais, margarinas, queijos e em outros produtos oleosos (CASTRO et al., 2009; STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018). Podem ainda ser utilizados como condimento caseiro (colorau), obtido através da mistura do pó de urucum com fubá (FABRI; TERAMOTO, 2015); como óleo empregado no revestimento das laranjas para lhe conferir melhor apresentação e conservação; e como ração para aves em postura já que o caroteno do grão triturado do urucum influencia a pigmentação da casca e da gema dos ovos (SILVA et al., 2006).

O urucum é, muitas vezes, combinado com outros corantes naturais para se produzir variadas matizes de cor. A combinação de urucum e a curcumina é desejável quando se almeja

uma tonalidade mais amarelada, enquanto a cor mais avermelhada pode ser obtida com sua mistura com carmim, beterraba ou antocianinas. Já a coloração mais escura é resultado a mistura de urucum e clorofila (STRINGHETA; SILVA; COSTA, 2018).

Na indústria têxtil, de tintas e vernizes o urucum é utilizado para tingir tecidos nas cores amarela, alaranjada e vermelha forte, para avivar e modificar certas tintas e é usado, ainda, para dar cor aos vernizes. O urucum também tem aplicação em cosméticos como na formulação de bronzadores, batons e pós faciais, principalmente devido às características antioxidantes dos carotenóides. Na literatura encontram-se aplicações do urucum também na medicina, como composto adstringente, bactericida, agente oxidante, eficaz no combate aos radicais livres ou ainda para o controle de taxas de colesterol e redução dos níveis de triglicérides no sangue (RATHER; MOHAMMAD, 2016).

Lima *et al.* (2001) estudaram os efeitos da ingestão de bixina, norbixina e quercetina no metabolismo lipídico de coelhos. Os resultados mostraram que, dentre as substâncias estudadas, a bixina apresentou o melhor efeito na redução do colesterol e também na manutenção de valores mais altos de colesterol-HDL. Este trabalho mostrou que estas substâncias poderão ser utilizadas como fármacos no tratamento ou prevenção de doenças cardíacas.

No trabalho de Fleischer *et al.* (2003) foi demonstrado que o extrato etanólico de folhas e sementes de *Bixa orellana L.* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas.

Outros trabalhos descrevem qualidades medicinais do urucum no emprego ao tratamento de hemorragias e queimaduras de pele. Além de propriedades que são efetivas contra diarreia, amidalite, no tratamento de doenças peitorais, também como estimulante, diurético, febrífugo, expectorante, cicatrizante, laxante, dentre outras (PILLAI *et al.*, 2018; SRINEERAJA, 2017).

4. Processos de obtenção de corantes do urucum

Como os pigmentos do urucum estão localizados no pericarpo das sementes, a extração destes é facilitada pelo fato de não ser necessário triturar as sementes. Logo, normalmente os pigmentos são extraídos por processos mecânicos (atrimento ou raspagem) ou físico-químicos (solventes). Comercialmente, três métodos são usados para extrair o pigmento das sementes: a extração alcalina (solução de NaOH ou KOH), que resulta na conversão da bixina (lipossolúvel) em sal de norbixina (hidrossolúvel); extração com óleo (soja, milho), que resulta na remoção da bixina e também de pequenas quantidades de outros materiais coloridos; e a extração com

solventes orgânicos (clorofórmio, etanol, acetona), que resulta na forma mais pura do pigmento bixina (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015). Abaixo serão descritos os principais métodos de extração conhecidos.

4.1 Processos Mecânicos

A extração mecânica é um método físico que baseia-se no atrito ou na raspagem das sementes para remover o arilo. Estes métodos possuem vantagens como a diminuição do tempo de processamento, a redução ou a eliminação do uso de solventes, evitando-se portanto, a combinação destes no extrato, e, com isso, não sendo necessário separar o solvente do extrato e também em alguns casos não sendo necessário secar o extrato. Entretanto, estas técnicas mecânicas podem requerer um tratamento prévio das sementes como uma secagem a baixa temperatura para preservar a qualidade do pigmento (MASSARANI; PASSOS; BARRETO, 1992; TAHAM; SILVA; BARROZO, 2016).

4.1.1 Atrito e secagem em leito de jorro

O atrito e secagem em leito de jorro é um método de extração a seco muito utilizado. Utiliza-se um equipamento em que as sementes de urucum são forçadas a atravessar um tubo em um extrator de leito de jorro devido à passagem de um fluxo de ar. O impacto da partícula faz com que a camada superficial da semente se solte liberando a bixina em pó (STRINGHETA e SILVA, 2008). Esta tecnologia utiliza aparelhos relativamente simples e de fácil instalação, permitindo que sejam utilizados em áreas próximas as plantações de urucum, agregando valor ao produto final. Além disso, esta metodologia se destaca por permitir um maior controle do processo (TAHAM; SILVA; BARROZO, 2016).

Um estudo mostrou que é possível extrair eficientemente a bixina das sementes de urucum utilizando o leito de jorro (BARROZO; SANTOS; CUNHA, 2013). Dando continuidade a este trabalho, alguns pesquisadores, com o objetivo de aumentar o rendimento da extração, propuseram o uso de uma nova configuração para o leito de jorro utilizando um tubo draft, ou seja, um anteparo com altura regulável. As variáveis estudadas foram a influência da posição do anteparo, a massa inicial das sementes e a vazão de ar. O rendimento da extração na configuração otimizada foi de 66,21%. O pó de urucum obtido obteve teores de bixina variados, mas sempre superiores a 30%, sendo, portanto, atraentes comercialmente (TAHAM; SILVA; BARROZO, 2016).

4.1.2 Raspagem e peneiramento

A raspagem e peneiramento são métodos rústicos para obtenção do corante e, como apresentam baixo rendimento, não são utilizados em escala industrial. A raspagem pode ser feita com escovas de nylon e o peneiramento é realizado através da agitação das sementes em uma peneira, de forma que a camada externa se desprenda e seja separada originando uma “massa” corante (STRINGHETA e SILVA, 2008).

4.2 Processos Físico-Químicos

Existem diversas pesquisas com o objetivo de obter novos métodos de extração dos pigmentos do urucum e também otimizar os já existentes. Os processos mais conhecidos são os físico-químicos que se utilizam de solventes como óleos (soja e milho), soluções alcalinas e solventes orgânicos como clorofórmio, etanol e acetona.

4.2.1 Extração com óleos vegetais

A imersão de sementes em óleo comestível foi uma das primeiras formas de se obter corante de urucum. Na culinária doméstica, as sementes eram adicionadas ao óleo e então aquecidos por um tempo para que o pigmento migrasse para o óleo. Em seguida, o extrato obtido era resfriado, filtrado e envasado para posterior uso no preparo de arroz, sopas, dentre outros pratos. Este procedimento se baseia no fato de a bixina ser lipossolúvel e foi adaptado para se obter industrialmente o corante de urucum em óleo (STRINGHETA e SILVA, 2008).

Na extração direta, as sementes são imersas em óleo vegetal comestível refinado que é aquecido e filtrado, produzindo uma solução oleosa de bixina. O extrato apresenta em média 1,5% de bixina e é comercializado como um corante para alimentos ricos em lipídios (PRESTON; RICKARD, 1980).

Os pigmentos do urucum dissolvidos em óleo vegetal possuem algumas características, tais como: presença de isômeros *trans* da bixina (mais estáveis e mais solúveis em óleo) e produtos de degradação térmica da bixina (com menor massa molecular e maior estabilidade) formados durante o aquecimento e que conferem uma tonalidade mais amarela ao corante (PRESTON; RICKARD, 1980).

O colorau ou colorífico pode ser produzido através da extração com óleos vegetais. Este é um produto constituído pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com o urucum em pó ou com o extrato oleoso de urucum. Este produto, que tem como principal mercado a região Nordeste do país, é muito utilizado para proporcionar a cor avermelhada para carnes, molhos, queijos e arroz (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

4.2.2 Extração com solventes orgânicos

A extração com solventes é a mais eficiente em relação ao teor de pigmentos extraídos e à pureza do extrato. A bixina pode ser extraída da semente por meio de solventes orgânicos como etanol, acetona, éter de petróleo, propan-2-ol, dicloroetano e, posteriormente, os extratos são concentrados através da remoção dos solventes (STRINGHETA e SILVA, 2008).

Este método é limitado pela necessidade de que o solvente seja compatível com o produto final. Em escala alimentícia, o corante está sujeito a restrições técnicas pela toxicidade potencial de resíduos de solventes. Portanto, apesar desta técnica ser eficiente em relação a teor de pigmentos e a pureza de extrato, ela não é muito utilizada em escala industrial (PRESTON; RICKARD, 1980).

4.2.3 Extração com soluções alcalinas

A extração com soluções alcalinas é o método de produção de corante de urucum mais utilizado em escala industrial por ser também o mais simples. Este processo considera o fato de que a bixina, pigmento lipossolúvel, se converte em um sal de norbixina (hidrossolúvel) em meios alcalinos, através da saponificação do grupo metil da bixina (Figura 6). Comumente utilizados estão os hidróxidos de sódio (NaOH), potássio (KOH), amônio (NH₄OH) e o carbonato de sódio (Na₂CO₃) como fonte de álcali (CHUYEN et al., 2012).

A intensidade da reação de saponificação da bixina depende, em grande parte, da concentração e do tipo da base utilizada e, em menor extensão, do tempo e da temperatura do processo. De modo geral, quanto mais concentrada a base, mais completa será a reação de saponificação. Em relação ao tipo de base, algumas proporcionam reação completa enquanto outras oferecem uma reação parcial, gerando mistura de pigmentos (bixina e norbixina) no extrato.

Um tempo maior de extração normalmente proporciona uma maior conversão de bixina, entretanto, pode ocasionar a degradação do pigmento. Quando temperaturas mais elevadas são utilizadas, percebe-se um aumento no rendimento da extração dos pigmentos, porém com pouco incremento na reação de hidrólise da bixina em norbixina. Isto se nota de forma marcante com uma maior conversão dos compostos da forma *cis* para a *trans*. Estes também possuem valor como corante para alimentos e podem estar presentes em um extrato ou formulação de urucum, dependendo de como tenha sido preparado (STRINGHETA e SILVA, 2008).

O método de obtenção do pigmento determinará os produtos em que o corante poderá ser utilizado. Para a extração com soluções alcalinas, algumas dificuldades de aplicação poderão surgir quando tem-se um meio mais ácido. Isto ocorre porque nesta condição, o

norbixinato será reprotonado e formará a norbixina, composto com menor solubilidade em água, ocorrendo a precipitação do pigmento (Figura 6). Além disso, outra limitação associada ao método está na remoção da solução alcalina do extrato. Esta exige operações unitárias posteriores ao processo, elevando o custo energético do processo (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

A eficiência de diferentes solventes (KOH 0,6%, NH₄OH 2%, NH₄OH etanólico 2% e etanol comercial) na extração de pigmentos da semente de urucum foi avaliada em um trabalho de 2010. O residual de bixina presente nas sementes ao final da extração foi o parâmetro utilizado para avaliar a eficiência da extração. Sendo assim, concluiu-se que o melhor solvente extrator foi o NH₄OH etanólico 2% uma vez que nesta condição obteve-se o menor teor residual de pigmento nas sementes e, conseqüentemente, a maior eficiência de extração (84%) (SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010).

Chuyen et al. (2012) compararam dois processos de extração de bixina das sementes de urucum que envolviam combinações de soluções de hidróxido de sódio e óleo de soja. No primeiro método, as sementes foram extraídas com solução de hidróxido de sódio por 20 min a 50 °C e, em seguida, extraídas com óleo de soja a 100 °C por 40 min. Já no segundo método as ordens foram invertidas, ou seja, as sementes foram extraídas com hidróxido de sódio por 40 min e com óleo de soja por 20 min. Em ambas as combinações foram obtidos rendimentos maiores (47,3% para o método 1 e 53,7% para o método 2) do que a extração com somente hidróxido de sódio (31,8%) ou somente óleo de soja (42,9%).

4.2.4 Extração com CO₂ supercrítico

No processo de extração supercrítica, o CO₂ é utilizado como solvente em condições críticas de temperatura e pressão. Sendo assim, nestas condições, ocorre um aumento na solubilidade de certos compostos neste solvente. Este método tem se mostrado vantajoso na remoção seletiva de compostos de sistemas alimentícios complexos (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015).

O método de extração de bixina com CO₂ supercrítico tem sido estudado como uma alternativa de processo com baixo impacto ambiental. Além disso, este processo não utiliza solventes tóxicos e produz produtos de alta qualidade.

Taham et al. (2015) estudaram métodos de extração de bixina das sementes de urucum combinando a tecnologia supercrítica com outros métodos de baixo impacto ambiental (extração em leito fixo). O objetivo deste trabalho era aumentar o rendimento da extração e então tornar o processo mais atrativo economicamente. Entretanto, nenhuma das combinações

testadas foi mais eficiente do que a extração com etanol a baixa pressão. Esta condição obteve as maiores porcentagens de bixina no extrato, caracterizada como a bixina mais pura dentre as combinações testadas.

Os processos de extração de pigmentos de urucum que são viáveis industrialmente não garantem uma padronização do produto final nem a obtenção de um extrato com pureza elevada (MAGESTE et al., 2012). Por exemplo, a extração com soluções alcalinas permitem a extração concomitante de carboidratos e proteínas, diminuindo a pureza do pigmento. Por isso, existe a necessidade de se estudar processos de purificação dos extratos para aumentar a pureza, aumentando também a atividade biológica e a vida de prateleira dos componentes extraídos.

5.Sistemas aquosos bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) desempenham um papel importante na extração de compostos de origem biológica, na medida que suas fases são compostas majoritariamente por água (60-95%) (SOARES et al., 2015). Desta forma, os SAB podem ser utilizados como uma tecnologia de extração líquido-líquido e eliminar o uso de solventes orgânicos. Estes normalmente são tóxicos, cancerígenos e/ou inflamáveis, causando, portanto, problemas ambientais e de saúde (MAGESTE et al., 2012).

Os SAB são sistemas de duas fases líquidas parcialmente miscíveis e se formam quando um polímero solúvel em água e uma substância de baixa massa molar (normalmente um sal inorgânico) ou dois tipos de polímeros solúveis em água se dissolvem em solução aquosa acima de suas concentrações críticas (HATTI-KAUL, 2000). As duas fases aquosas são formadas com diferentes composições, sendo que os solutos distribuem entre as duas fases de acordo com sua afinidade relativa com cada fase. Os sistemas apresentam meios muito pouco agressivos a biomoléculas, mantendo suas características e atividades biológicas (ASENJO; ANDREWS, 2012).

Cada tipo de SAB (polímero e sal ou dois polímeros) tem, normalmente, aplicações diferentes em termos das substâncias a serem purificadas e às necessidades operacionais. Aqueles formados por polímero e sal tendem a ser menos viscosos, facilitando a separação das fases, enquanto aqueles sistemas formados somente por polímeros podem ser aplicáveis a substâncias que não toleram a presença de sais em concentrações mais elevadas (MONTEIRO FILHO, 2010).

Os SABs são reconhecidos como sistemas econômicos e eficientes e oferecem muitas vantagens como: curto tempo de processo, baixo consumo de energia e a possibilidade de aplicação em grande escala (GOJA et al., 2013). Além disso, através da manipulação e da

otimização das composições de equilíbrio de cada fase imiscível é possível induzir um comportamento de partição diferencial de uma mistura de analitos, onde certas moléculas possuem uma maior afinidade por uma fase. Com isso, pode-se explorar este comportamento em processos de purificação (SOARES et al., 2015).

5.1 Aplicação dos SAB na purificação de corantes

Na literatura existem poucos estudos de partição/purificação de corantes (naturais ou sintéticos) com a utilização de SAB. Mageste et al. (2009) estudaram a partição do corante natural carmim em sistemas aquosos bifásicos compostos por polímeros ou copolímeros (poli óxido de etileno 1.500, 6.000, 10.000 e 35.000 g/mol; poli óxido de propileno 400 g/mol e copolímero tribloco L35 1.900 g/mol) e soluções aquosas de sal (Na_2SO_4 e Li_2SO_4). Foi investigado o efeito do pH, da massa molar do polímero, da hidrofobicidade, do comprimento da linha de amarração (CLA) e da natureza do eletrólito sobre a partição do corante entre as fases do sistema. Ao final do trabalho, observou-se que o corante se distribui preferencialmente para a fase polimérica do sistema ocorrendo uma maior concentração quando o íon Li^+ era o cátion formador do SAB. Além disso, o coeficiente de partição do corante se mostrou fortemente dependente da natureza do eletrólito e do pH do sistema.

Mageste et al. (2012) avaliaram a partição da norbixina em sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros ou copolímeros (poli óxido de etileno 1.500 e 400 g/mol, poli óxido de propileno 400 g/mol e copolímero tribloco L35 1.900 g/mol) e um sal orgânico (tartarato ou succinato de sódio). No estudo, foi verificada a distribuição preferencial da norbixina para a fase superior do SAB e o coeficiente de partição se mostrou dependente da natureza do eletrólito, da hidrofobicidade do sistema e do comprimento da linha de amarração (CLA). A otimização do processo demonstrou que o aumento na concentração do polímero e do eletrólito promove aumento no coeficiente de partição da norbixina. Além disso, através do cálculo de parâmetros termodinâmicos (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs) mostrou-se que a concentração preferencial de norbixina na fase superior é favorecida pelas contribuições entálpicas e entrópicas.

Mais recentemente, Junqueira et al. (2018) analisaram o efeito de um surfactante (brometo de cetiltrimetilamônio) na partição dos pigmentos do urucum em SAB composto por polietilenoglicol (PEG 1.500, 4.000 ou 6.000 g/mol) ou copolímero (tribloco L35 2.000 g/mol) e citrato de sódio. Os resultados mostraram o potencial do surfactante como agente modulador para transferência do corante entre as fases. O efeito do surfactante foi atribuído à sua interação com a norbixina, revelando a formação de pares iônicos entre eles e a formação de micelas de

norbixina-cetiltrimetilamônio.

6. Modelagem de processos

A modelagem de processos consiste no emprego de modelos matemáticos para o desenho e estudo de processos industriais. Geralmente envolve o uso de softwares especializados para definição de um conjunto de operações interligadas para, em seguida, efetuar os cálculos de balanços de massa e energia, em estado estacionário ou dinâmico. As operações do processo e suas conexões são representadas por um diagrama de fluxo de processo. A simulação permite que sejam testadas diferentes configurações e condições operacionais antes da aplicação prática, gerando cenários, permitindo um maior entendimento do processo e possibilitando a tomada de decisão em tempo real.

O mercado de simuladores computacionais tem se expandido muito e hoje existem diversos softwares disponíveis, tais como o Arena (ROCKWELL AUTOMATION, INC.), Aspen Plus (ASPENTECH, INC.), Ansys (ANSYS, INC.), dentre outros. Além destes, o software *SuperPro Designer*® tem sido amplamente utilizado para aplicação em processos biotecnológicos (ANSYS, INC.). Este software é usado na modelagem, avaliação e otimização de processos de várias áreas como a química, a de alimentos e a farmacêutica. Além disso, permite que sejam desenvolvidas simulações de processos em batelada ou contínuos, ou mesmo uma combinação de ambos (INTELLIGEN, INC., 2019).

Empresas como a Unilever, Pepsico, Petrobrás e Dupont utilizam o *SuperPro Designer*® como ferramenta para modelagem de processos. Além disso, o software é utilizado em diversas universidades do mundo (INTELLIGEN, INC., 2019).

O software *SuperPro Designer*® foi utilizado para comparar o processo de captura de anticorpos humanos utilizando SABS e o processo atualmente utilizado (cromatografia por afinidade). Foram avaliadas a sustentabilidade econômica e ambiental de cada caso e os SABS foram considerados vantajosos em termos de economia e de operação do processo, sendo capaz de reduzir os custos operacionais em 39% quando comparados a cromatografia (ROSA et al., 2011).

O mesmo software foi utilizado para modelar e analisar a viabilidade econômica de uma unidade de processamento do soro do leite para a produção de concentrado proteico (CPS34 e CPS80, concentrado com 34% e 80% de proteína, respectivamente) integrada com o processamento de lactose. Para isto, foram construídos seis modelos e a viabilidade econômica foi feita através do Período de *Payback*, Taxa Interna de Retorno, Ponto de Equilíbrio e Valor

Presente Líquido. A produção de CPS80 apresentou melhor viabilidade econômica quando comparada à produção de CPS34. Além disso, as plantas que produziam lactose em pó se mostraram mais economicamente atrativas em comparação com outras perspectivas (SILVA et al., 2015).

Bajic et al. (2017) projetaram e compararam o processo de produção da goma xantana que utiliza meios de cultivo sintéticos e meios baseados em águas residuais obtidas de diferentes partes do processo da indústria de confeitos. Para isto, um modelo de processo e custo foi desenvolvido utilizando o *SuperPro Designer*®. Os resultados obtidos com o modelo poderão ajudar outros pesquisadores a desenvolver novos processos e tecnologias de produção de goma xantana que sejam mais eficientes.

Alcázar-Alay et al. (2017) desenvolveram modelos para extração e concentração do pigmento de sementes de urucum semi-desengorduradas (fracionamento mecânico e processo integrado de fracionamento mecânico e extração com solvente de baixa pressão) utilizando o *SuperPro Designer*®. O custo da manufatura foi calculado para ambos os métodos e o processo integrado obteve um custo 96% maior. Sendo assim, concluiu-se que o processo de fracionamento mecânico é uma técnica atraente e economicamente viável para a obtenção de partículas ricas em bixina a partir de sementes de urucum semi-desengorduradas.

O mesmo software foi utilizado em uma avaliação técnico-econômica de um processo de extração com fluido supercrítico acoplada à extração com solvente sob baixa pressão para a produção de óleo rico em tocotrienóis e extrato rico em bixina de sementes de urucum. Foram avaliados diversos fatores como os diferentes custos de compra de sementes, custos de plantas, tempos de processamento, entre outros. Dentre os cenários avaliados, o que foi considerado mais promissor forneceu custo de manufatura de U\$336,96/kg de óleo e U\$12,05/kg de bixina (ZABOT; MORAES; MEIRELES, 2018).

Diante do exposto, é possível verificar que existem trabalhos que simularam o processos de extração de pigmento da semente de urucum (fracionamento mecânico, processo integrado de fracionamento mecânico e extração com solvente, e extração com fluido supercrítico) utilizando o software *SuperPro Designer*® e também um estudo que utilizou o mesmo software para avaliar o processo de captura de anticorpos utilizando SAB. Entretanto, não foram encontrados trabalhos que envolvam a simulação e modelagem do processo de extração de bixina a partir de sementes de urucum usando soluções alcalinas e a purificação do pigmento com o uso de SAB e precipitação ácida.

7. Viabilidade econômica

A viabilidade econômica consiste em avaliar se determinado empreendimento é viável ou não economicamente. Com esta avaliação, é possível verificar se é vantajoso para empresa realizar o determinado empreendimento, considerando o investimento e o retorno esperado.

A viabilidade econômica de um projeto é determinada por fatores externos e internos que, se não forem bem planejados, podem afetar a continuidade do projeto. Existem diversos métodos e critérios para auxiliar no processo decisório de alternativas de investimento, dentre elas estão: o Valor Presente Líquido (VPL), Taxa Interna de Retorno (TIR) e o *Payback*. As abordagens mais utilizadas envolvem a integração de procedimentos de valor do dinheiro no tempo, considerações quanto a risco e retorno e conceitos de avaliação para selecionar investimentos de capital.

7.1 Valor Presente Líquido (VPL)

O Valor Presente Líquido (VPL) pode ser calculado pela diferença entre o valor presente das entradas e saídas de caixa que ocorrem durante o tempo de vida de um projeto, descontados a taxa de desconto de mercado (Equação 1). Esta taxa consiste no retorno mínimo que um projeto precisa proporcionar para que o valor de mercado da empresa se mantenha inalterado (GITMAN, 2010).

$$VPL = \sum_{t=0}^n \frac{FC_t}{(1+i)^t} \quad (1)$$

em que FC_t é o fluxo de caixa no período t , i é a taxa de desconto e t é o período.

Nesta análise, a escolha mais adequada é do projeto que apresenta maior VPL. Quando a avaliação for de apenas um projeto, o VPL for positivo indicará que as entradas serão maiores que as saídas de caixa e, portanto, o projeto deverá ser aceito já que o retorno supera o investimento. Entretanto, se o VPL for negativo, o projeto deverá ser rejeitado, e se o VPL for igual a zero, a realização ou não do projeto é indiferente (NORONHA, 1987).

7.2 Taxa Interna de Retorno (TIR)

A Taxa Interna de Retorno (TIR) consiste na taxa de desconto que faz com que o VPL de uma oportunidade de investimento seja igual a zero (Equação 2) (CONTADOR, 1981).

$$TIR = (VPL = 0) = \sum_{t=0}^n \frac{FC_t}{(1+i)^t} \quad (2)$$

em que FC_t é o fluxo de caixa no período t , i é a taxa interna de retorno e t é o período.

Ao utilizar a TIR como um critério de aceitação/rejeição deve-se aceitar o projeto quando a taxa for maior do que o custo de capital e, se for menor, o projeto deverá ser rejeitado (GITMAN, 2010).

7.3 Payback

O período de *payback* é o tempo necessário para que a empresa recupere o investimento inicial em um projeto, ou seja, tempo para que o retorno (lucro) se iguale ao custo gerado. O raciocínio é que quanto mais rápido o capital investido seja recuperado, mais rápido ele poderá ser reinvestido. Este parâmetro é normalmente utilizado para avaliar propostas de investimento de capital (NORONHA, 1987).

Normalmente, a duração do período máximo aceitável de *payback* é definida pela direção da empresa com base em um vários fatores como: o tipo de projeto, risco do projeto, dentre outros. Sendo assim, se o período de *payback* for menor do que o valor definido, o projeto poderá ser aceito, do contrário, ele será rejeitado (GITMAN, 2010).

O período de *payback*, se comparado ao VPL, apresenta algumas limitações. Ao calcular o *payback*, como não há descontos envolvidos, o valor do dinheiro no tempo não é considerado, sendo calculado somente somando os fluxos de caixa futuros. Além disso, existe uma falha em não considerar diferenças de risco, ou seja, o cálculo é feito da mesma forma para projetos seguros e para projetos arriscados. Sendo assim, talvez o maior desafio nesta técnica seja determinar o período máximo aceitável. Como não existe uma base objetiva para determinar esse valor, este é determinado de forma arbitrária. Logo, o *payback* não deve ser utilizado de forma isolada, devendo ser utilizado aliado a outros critérios (ROSS; WESTERFIELD; JORDAN, 2010).

8. Referências bibliográficas

AGNER, A. R. et al. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1687–1693, 2004.

ALCÁZAR-ALAY, S. C. et al. Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. **Food Research International**, v. 99, p. 393–402, 2017.

ANSYS. Disponível em: <https://www.ansys.com/>. Acesso em: 03/08/2019.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, n. September 2011, p. 1–10, 2012.

ASPENTECH. Disponível em: <http://www.aspentech.com>. Acesso em: 01/09/2019.

BAJIĆ, B. et al. Process model economics of xanthan production from confectionery industry wastewaters. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 999–1004, 2017.

BARROZO, M. A. S.; SANTOS, K. G.; CUNHA, F. G. Mechanical extraction of natural dye extract from Bixa orellana seeds in spouted bed. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 279–282, 2013.

CARVALHO, P. R. N. et al. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do instituto agrônomo (IAC). **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 519–524, 2010.

CARVALHO, P. R. N. **O urucum: história, ciência, tecnologia e curiosidades**. Disponível em: <http://www.ourucum.com.br>. Acesso em 01/04/2020.

CASTRO, C. B. et al. **Coleção plantar: A cultura do urucum**. 2a ed. ed. Brasília - DF: EMBRAPA, 2009.

CHUYEN, H. VAN et al. Improvement of bixin extraction yield and extraction quality from annatto seed by modification and combination of different extraction methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 1333–1338, 2012.

CONTADOR, C. R. **Avaliação social de projetos**. São Paulo: Atlas, 1981. 301p.

DA COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de Bixa orellana L.: **Uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica**. Quimica Nova, v. 28, n. 1, p. 149–152, 2005.

DEMCZUK JR, B.; RIBANI, R. H. Updates on chemistry and use of annatto (Bixa orellana L.). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 6, n. 1, p. 37, 2015.

FABRI, E. G.; TERAMOTO, J. R. S. Urucum: fonte de corantes naturais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 140–140, 2015.

FLEISCHER, T. C. et al. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1–2, p. 136–138, 2003.

FRANCIS, F. J. **Natural food colorants**. 2a. ed. Torquay: Science + Business Media Dordrecht, 1996.

GITMAN, L. J. **Princípios de administração financeira**. 12a. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

GOJA, A. M. et al. Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2013.

HATTI-KAUL, R. **Aqueous Two Phase Systems: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção Agrícola Brasileira. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 29/06/2021.

INTELLIGEN INC. Disponível em: <http://www.intelligen.com/>. Acesso em: 01/08/2019.

JUNQUEIRA, C. M. et al. How does the use of surfactants in polymer-salt based aqueous two-phase systems affect the annatto dye (*Bixa orellana* L.) partitioning? **Fluid Phase Equilibria**, v. 478, p. 14–22, 2018.

LIMA, L. R. P. et al. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196–200, 2001.

MAGESTE, A. B. et al. Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7623–9, 2009.

MAGESTE, A. B. et al. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69–77, 2012.

MASSARANI, G.; PASSOS, M. L.; BARRETO, D. W. Production of annatto concentrates in spouted beds. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 70, n. 5, p. 954–959, 1992.

MERCADANTE, A. Z. et al. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1201–1203, 1996.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1379–1383, 1997.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Three minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Phytochemistry**, v. 52, n. November 1998, p. 135–139, 1999.

MONTEIRO FILHO, E. DE S. Sistemas aquosos bifásicos: uma laternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Ciência & Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 33–41, 2010.

NORONHA, J. F. **Projetos agropecuários: administração financeira, orçamento e viabilidade econômica**. 2^a ed. São Paulo: Atlas, 1987. 269p.

PILLAI, S. et al. Pharmacological and cosmeceutical applications of Bixa Orellana L.: A review of the scientific and patent literature. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 9, n. 4, p. 281–289, 2018.

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

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 91–107, 1980.

RADDATZ-MOTA, D. et al. Achiote (Bixa orellana L.): a natural source of pigment and vitamin E. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1729–1741, 2017.

RATHER, L. J.; MOHAMMAD, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016.

RIOS, A. DE O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em “snacks” extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 203–213, 2004.

ROCKWELL AUTOMATION. Disponível em: <www.arenasimulation.com>. Acesso em: 01/08/2019.

ROSA, P. A. J. et al. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 559–567, 2011.

ROSS, S. A.; WESTERFIELD, R. W.; JORDAN, B. D. **Fundamentals of Corporate Finance**. 9a. ed. New York: McGraw-Hill, 2010. v. 53

SILVA, A. N. DA et al. Integrated production of whey protein concentrate and lactose derivatives: What is the best combination? **Food Research International**, v. 73, p. 62–74, 2015.

SILVA, J. H. V. DA et al. Resíduo da semente de urucum (Bixa orellana L.) como corante da gema, pele bico e ovário de poedeiras avaliado por dois métodos analíticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 988–994, 2006.

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (Bixa orellana L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1892–1897, 2009.

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C. Eficiência de solventes na obtenção e caracterização de corantes de urucum (bixa orellana l.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 115–124, 2010.

SOARES, R. R. G. et al. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. iv, p. 1158–1169, 2015.

SRINEERAJA, P. Pharmacological Properties of Bixa Orellana - A review. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 6, n. 7, p. 751–755, 2017.

STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I.; COSTA, A. G. V. Annatto/Urucum— Bixa orellana. **Exotic Fruits**, p. 23–30, 2018.

STRINGHETA, P.C.; SILVA, P. I. **Pigmentos de urucum: Extração, reações químicas, usos e aplicações**. Viçosa: Suprema, 2008.

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 175–183, 2015.

TAHAM, T.; SILVA, D. O.; BARROZO, M. A. S. Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 313–321, 2016.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e eeterminação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, 2001.

VILAR, D. D. A. et al. Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa Orellana L.: A review. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

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

CAPÍTULO 2 – DEVELOPMENT, MODELING AND SIMULATION OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF BIXIN FROM ANNATTO SEEDS (*Bixa orellana* L.)

ABSTRACT

To extract and purify bixin from annatto seeds, a new process based on alkaline extraction, partition with an aqueous two-phase system (ATPS) and acid precipitation was developed on a *SuperPro Designer* v. 7.0® simulator. To implement the model, experimental data of seed leaching, liquid extraction in an ATPS and acid precipitation were determined. The seeds were leached using alkaline saline solutions and a face-centered factorial design (FCD) was applied to investigate the effects of salt concentration, pH and temperature on the yield of the dye extraction. The highest yields were obtained with potassium phosphate 20% (w/w), at 25 °C and pH 9.0. The extract was then purified using ATPS composed of potassium phosphate (14%) pH 9.0 and polyethylene glycol 1500 mol/L (14%) and norbixin salt preferentially partitioned to the top phase ($K_p = 210.21$). The acid precipitation demonstrated that, as the pH decreases, the concentration of norbixin salt in the top phase decreases. The process simulation with 1 t of annatto seeds showed that the plant has the capacity to produce more than 1,900.00 kg/year of the main product (88% of norbixin). The selling price (\$ 2,400/kg) was the most sensitive parameter of the sensitivity analysis. Therefore, the project is attractive based on the economic indexes analyzed.

Keywords: annatto; alkaline extraction; ATPS; *SuperPro Designer*.

1-INTRODUCTION

Annatto is a natural reddish-yellow dye obtained from the seeds of *Bixa orellana* L. The pigments from this seed are widely used in chemical, food, cosmetic and pharmaceutical applications (CUNHA et al., 2009; CHISTÉ et al., 2011; JUNQUEIRA et al., 2018) and as solar cell sensitizers (GÓMEZ-ORTÍZ et al., 2010). Bixin, a fat-soluble carotenoid, is the main pigment (about 80% of the total pigments) extracted from annatto seeds. Norbixin is the water-soluble form (at neutral and alkaline pH) of the pigment resultant from the saponified bixin in sodium or potassium alkali solutions. Norbixin, like other carotenoids, precipitates in acidic conditions (ZHANG & ZHONG, 2013; MOLLER et al., 2020).

Annatto extract is one of the main natural dyes used worldwide and demand for it has been increasing. This is due to some characteristics such as its abundance, its varied coloring properties (ranging from yellow to reddish/orange) and its stability, as well as the possibility of obtaining hydrosoluble or liposoluble extracts from the same source depending on the extraction method (CUNHA et al., 2009). Therefore, the development of an efficient, environmentally-safe and economically-viable extraction method has become essential.

Usually, the pigment is extracted by mechanical methods (BARROZO, 2015; TAHAM & BARROZO, 2016) or solvent extractions (CHUYEN et al., 2012). However, these processes do not result in a high-purity extract and a standard final product. Due to recent interest in the separation of pharmacologically active substances present in annatto seeds, technological development of processes for this industry has become more important. New extraction techniques have been studied including extraction assisted by ultrasound or microwave (SINHA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; YOLMEH et al., 2014; QUIROZ, et al., 2019), and extraction with supercritical fluid (SILVA et al., 2008; TAHAM et al., 2015; ZABOT et al., 2018).

Alkaline extraction has also been used to obtain natural dyes (ALI et al., 2009; ELKSIBI, 2014; CHENG, et al., 2019, RODIAH et al., 2021). Extraction of bixin from annatto seeds with alkaline solutions, usually potassium or sodium hydroxide, is typically used in industrial processes. Bixin, present in the seeds as an ester, is soluble in concentrated alkaline solutions, where it is transformed into a diacid salt known as “norbixinate” that is soluble in water. In acid media, the salt norbixinate forms a water insoluble, norbixin (SCOTTER, 2009). Organic solvents are also effective for extracting bixin from the seeds and concentrating it (MUTHURAMAN, 2011). However, this technique has the disadvantage of using organic

solvents, which are not environmentally friendly and may cause health problems due to their toxicity, flammability, and carcinogenicity.

Bixin extraction techniques generally produce a crude extract, a complex matrix with low purity. The challenge of these processes is to improve the dye purification, minimize contamination by sub-products and, consequently, increase the bixin yield (ALCÁZAR-ALAY et al., 2017). Extract impurities (such as sugars, organic acids, proteins and other soluble molecules), due to non-selective extraction methods, can significantly affect the quality and stability of the dye and active substances. Consequently, further purification is desired to increase the biological activity and shelf life of the extracted components.

Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) have been used for separation and purification of biological compounds since they are composed mainly of water and small amounts of polymers and salts, being compliant with environmental requirements. Research has exploited ATPS as an alternative technique for dye purification (MAGESTE et al, 2009; MAGESTE et al, 2012; JUNQUEIRA et al, 2018).

Due to the intensification of the search for products with no synthetic additives, caused by health and environmental concerns and also restrictions on use by European Community countries, the development of environmentally-friendly processes for the extraction and purification of natural dyes such as bixin is of industrial interest. Therefore, this study develops a process model, based on alkaline extraction, partition with ATPS and acid precipitation, using a *SuperPro Designer v. 7.0*[®] (Intelligen, Inc.) simulator. The parameters necessary to implement the main unit operations of the process (lixiviation, liquid extraction with ATPS and acid precipitation) were determined experimentally.

2- MATERIALS AND METHODS

2.1 – Raw material and chemicals

Annatto seeds were obtained from Itapetinga (Bahia State, Brazil) and were stored at -4.0 °C under light-free conditions. Polyethylene glycol (PEG) with molecular mass of 1500 g/mol was obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). The salts ammonium sulfate (AS; 98%), sodium sulfate (SS; 98%) and potassium phosphate (PP; 98%), hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, Brazil) and were of analytical grade. In all experiments, deionized water was used.

2.2 – Seed characterization

The seeds were characterized for total lipids, moisture, ash, protein, carbohydrates and bixin content. The official methods published by Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997) were used to determine moisture, ash and protein contents. The total lipid content was quantified by a gravimetric method, using a Soxhlet extractor and petroleum ether. The method consists in repeated seed extraction with petroleum ether until exhaustion of the lipid content. The carbohydrate content was determined by difference. The experiments were carried out in triplicate. The bixin was determined by solvent extraction with chloroform, using a Soxhlet extractor until a colorless solution was obtained. The concentration was calculated according to the Lambert-Beer law (Equation 1), using the extension coefficient of $\epsilon_{1cm}^{1\%} = 3090$, according to FAO / WHO (2006) methodology.

2.3 – Leaching experiments

Three parallel experiments of leaching process were performed in 50 mL centrifuge tubes by saline extraction under alkaline conditions. Annatto seeds (1 g) were added to the Falcon tube containing 19 g of a saline solution (Ammonium sulfate (AS), Sodium sulfate (SS) or Potassium phosphate (PP)) at a desired concentration and pH according to Table 1. The mixture was stirred for 15 h at a controlled temperature. Then, the mixture was centrifuged at 10.000 x g for 5 min and the liquid phase (extract) was separated from the seeds.

Table 1. Yield for each experimental run of FCD

Run	Factors						Responses		
	Coded			Uncoded			Yas	Yss	Ypp
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃			
1	-1	-1	-1	18	9	25	40.30	9.42	49.97
2	1	-1	-1	22	9	25	48.33	37.38	57.85
3	-1	1	-1	18	11	25	17.61	34.26	6.36
4	1	1	-1	22	11	25	23.56	22.88	13.75
5	-1	-1	1	18	9	45	20.63	26.26	29.82
6	1	-1	1	22	9	45	32.52	46.73	13.88
7	-1	1	1	18	11	45	17.61	45.09	9.74
8	1	1	1	22	11	45	6.01	37.66	6.43

9	0	0	0	20	10	25	47.92	38.53	4.40
10	0	0	0	20	10	25	34.52	52.29	5.30
11	0	0	0	20	10	25	17.61	50.39	3.89
12	0	0	0	20	10	25	24.58	19.83	2.19
13	0	1	0	20	11	35	25.93	32.39	25.74
14	1	0	0	22	10	35	20.21	45.35	15.78
15	0	-1	0	20	9	35	40.14	36.93	36.60
16	-1	0	0	18	10	35	24.58	46.60	37.21
17	0	0	1	20	10	45	26.58	34.26	49.94
18	0	0	-1	20	10	25	22.95	27.44	13.37

An aliquot of extract was used for absorbance measurements in a Biomate 3 spectrophotometer (Thermo Scientific, Hampton, USA), at 482 nm. The concentration of norbixinate was calculated according to the Lambert-Beer law (Equation 1), using the extension coefficient of $\varepsilon_{1cm}^{1\%} = 2870$, according to FAO / WHO (2006) methodology.

$$S(\%) = \frac{A * f}{\varepsilon_{1cm}^{1\%} * m_S} \quad (1)$$

in which S is the percentage of norbixin salt, A is the mean absorbance, f is the dilution factor, $\varepsilon_{1cm}^{1\%}$ is the absorptivity coefficient, m_S is the sample mass (g). The extraction yield was determined according to Equation 2:

$$Y = \frac{C_S}{C_{S,T}} \times 100 \quad (2)$$

in which C_S and $C_{S,T}$ represent the norbixinate concentration in the extract and the total concentration in the seeds, respectively.

The extraction yield (Y) was evaluated as a function of salt concentration (x_1), pH of the solution (x_2) and temperature (x_3), for each salt separately. A FCD was used with 4 repetitions at the central point and with axial points according to Table 3.

A polynomial equation was fitted to the experimental data (Equation 3).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (3)$$

where Y is the extraction yield; β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the regression coefficients for the intercept, linear, quadratic and the interaction effects, respectively; X_i and X_j are the coded independent variables and e is the error term. The statistical significance of the model was evaluated by analysis of variance (ANOVA) using Fisher's statistical test (F-test). The suitability of the model was considered by the determination coefficient (R^2) and the significance of the regression coefficients was evaluated by the Student t-test. Parameters with less than 95% significance ($p > 0.05$) were excluded from the model and incorporated into the error term (MONTGOMERY and RUNGER, 2003).

After statistical analysis of the leaching conditions, the experiments were carried out in the optimized condition and the extract obtained was used in the partition experiments.

2.4 – Partition experiments

Stock solution of PEG (average molar mass of 1500 g/mol) 60% (w/w) was previously prepared and the pH was adjusted using NaOH (0.1M) and HCl (0.1 M). Based on the leaching results, potassium phosphate was chosen and a solution of 20% (w/w) was prepared with pH adjusted to 9.0 using proper amounts of the monobasic and the dibasic forms of the salt using a HI 221 pH meter (Hanna Instruments, Smithfield, USA). The next purification stage was acid precipitation so the lowest pH was chosen in order to decrease expenses with reagents. An ATPS (40 g) was prepared in 50 mL centrifuge tubes by weighing the proper amounts of PEG, water and salt using an AUX220 analytical balance (Shimadzu, Kyoto, Japan) to obtain the desired overall composition (13% w/w, 14% w/w and 15% w/w). The ATPS was shaken in a vortex for 30 s, then centrifuged at 2000 x g for 20 min in a 5804R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) and allowed to stand for 24 h until thermodynamic equilibrium was reached. Subsequently, the two phases were collected separately using syringes.

Partition experiments were performed in 15 mL centrifuge tubes in three different top/bottom volume ratio (2.5:2.5; 1.5:3.5; 1.0:4.0) maintaining the total volume of 5 mL. 300 μ L of extract from the leaching process were added to the ATPS, which were shaken in a vortex for 30 s and then centrifuged at 2000 x g for 20 min. The tubes were left in a TE-184 incubator (Tecnal, Piracicaba, Brazil) at constant temperature (25.0 °C) for 24 h to reach equilibrium. The overall procedure was carried out in triplicate.

Aliquots of the top and the bottom phases were collected and appropriately diluted with water. For norbixinate concentration determination, absorbance was directly measured at 482

nm using a Biomate 3 UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Hampton, USA). Protein concentration was determined according to the method described by Bradford (1976) and the absorbance was measured at 595 nm. Sugar concentration was determined by the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method proposed by Miller (1959) and the absorbance was read at 540 nm. To avoid phase component interference, the samples were analyzed against blanks containing the same composition as the phases but without the extract. The partition coefficient was calculated using Equation (4) as follows:

$$K_P = \frac{Abs^T \cdot f_d^T}{Abs^B \cdot f_d^B} \quad (4)$$

where Abs^T and Abs^B are the the absorbance values of the top and the bottom phases, respectively, and f_d^T and f_d^B are the dilution factors of each corresponding phase.

2.5 – Precipitation experiments

The polymeric phase containing the dye was acidified for norbixin precipitation. The experiments were performed in 15 mL centrifuge tubes. The polymeric phase from the ATPS (7 g) was added to a Falcon tube and the pH of the solution was adjusted with hydrochloric acid (1 M) to a determined value (pH from 9.0 to 3.0). Then, 1 g of norbixinate extract was added and the mixture was manually agitated and stored in a temperature-controlled chamber for 15 h. After this time, the mixtures were centrifuged at 10.000 x g for 10 min in a 5804R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatant was separated from the precipitate and the supernatant mass was determined in order to calculate norbixin solubility. Aliquots of the solution were collected and diluted with deionized water and the absorbance was determined at 482 nm, using a Biomate 3 UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Hampton, USA). To avoid phase component interference, the samples were analyzed against blanks containing the same composition as the phases but without the extract. The percentage of norbixin was determined according to Equation 5 (TAHAM et al., 2016). The overall procedure was carried out in triplicate.

$$N(\%) = \frac{A \cdot f}{\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} \cdot m_s} \quad (5)$$

in which N is the percentage of norbixin, A is the mean absorbance, f is the dilution factor, $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%}$ is the absorptivity coefficient, m_s is the sample mass (g).

Norbixin solubility was calculated by Equation 6:

$$S_{Norbixin} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{m_{NS}}{m_T} \quad (6)$$

in which m_{NS} is the mass of norbixin in the supernatant (mg) and m_T is the total mass of norbixin in the solution (g).

2.6-Modeling

2.6.1 – Process description

SuperPro Designer v. 7.0[®] (Intelligen, Inc.) was used to develop the model for bixin extraction and purification. Using the unit operation models of this software, the experimental laboratory scale was scaled up to an industrial scale.

The process was divided into three major sections: A-Extraction section (P-1 to P-4), B-Purification section (P-5 to P-11) and C-Recovery section (P-12 to P-18) as is indicated in Figure 1. The plant was designed for processing 1 ton of annatto seeds in a 28-hour batch production with a maximum annual operation of 7920 h (330 days). The unit operations of this process are described in this section and the information necessary provided in each equipment of the simulation is shown in Table 2.

A. Extraction section

P-1/SL-101 Seed storage

Annatto seeds are stored in a silo that supply the process with 1 ton of seeds per batch. In each batch, all the silo content is transferred to the leaching process.

P-2/V-101 Mixing salt phase

In this procedure, a 20% m/m potassium phosphate solution is prepared in a blending tank. This solution is the solvent for the next step (leaching) and also the saline phase of the ATPS. After loading the raw materials into the tank, the mixture is stirred and then transferred to the next step for leaching.

P-3/SMSX-101 Leaching

The extraction of the soluble constituents from the solid phase by means of the alkaline solvent was accomplished by the leaching unit operation. Bixin, the main pigment present in

annatto seeds, is soluble in concentrated alkaline solutions, where it undergoes a saponification reaction, forming a norbixin salt. It is extracted in a mixer-settler extractor using a 20% m/m potassium phosphate solution (pH 9.0) for 4 h. The recovery yield of norbixin salt was set as 49% according to the data obtained in the experiment.

P-4/NFD-101 Filtration

A Nutsche filter is usually used to remove suspended impurities from liquid solutions. As the extract from leaching presents impurities from the seed, a subsequent filtration procedure is required. The filtration time was set to 1 h to a final Loss-On-Drying (LOD) of 30%. The cake was washed with a 20% m/m potassium phosphate solution in a proportion of 3 vol/vol of cake. Particulate component removal settings were 99% inert, 5% norbixin salt, 10% potassium phosphate, 5% protein, 5% sugar.

B. Purification section

In this study, three different top/bottom volume ratio of ATPS phases and three global compositions were tested to determine the best conditions for purifying the extract. The best result was used in the simulation.

P-7/V-102 Storage tank (Heavy phase)

In this procedure, the salt phase of the ATPS is prepared. The phase diagram of the best result of the partition experiments (HAGHTALAB & MOKHTARANI, 2004) was used to define the composition of each phase (heavy and light). The filtrate from the Nutsche filter is mixed with water and PEG 1500 in the appropriate proportions to produce the bottom phase, containing 15.85% of potassium phosphate, 4% of PEG 1500 and 80.15% of water.

P-8/V-101 Mixing PEG phase

In this procedure, the PEG phase (light phase) is prepared. PEG 1500 is mixed with water and phosphate solution to produce the top phase constituted by 3.75% of potassium phosphate, 30.4% of PEG 1500 and 65.85% of water (HAGHTALAB & MOKHTARANI, 2004).

P-9/DX-101 Extraction in ATPS

Liquid-liquid extraction in ATPS occurs in a differential (column) extractor. The best TP/BP ratio was determined by experiment and the result (1:4) was used in this step. The

norbixin salt is partitioned to the top phase of the ATPS in the column. The recovery yield was set to 95% and the partition coefficients were set to: PEG1500 (7.6), potassium phosphate (0.24), norbixinate (210), protein (0.45) and sugar (1.01). The PEG and the salt partition coefficients were calculated based on liquid–liquid equilibria for aqueous two-phase systems of PEG 1500 and potassium phosphate (HAGHTALAB & MOKHTARANI, 2004). The norbixinate coefficient was determined by experiment. Protein and sugar concentrations were calculated using the method described by Bradford (1976) and the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method proposed by Miller (1959), respectively. Then, the partition coefficients were calculated according to Equation 4.

P-10/V-105 Acidification

The light phase is transferred to a stirred reactor where the pH of the solution is adjusted by adding hydrochloric acid at 37% to achieve a pH of 5.0. At this pH, the norbixin salt solubility reaches lower values, as determined in the precipitation experiment. The norbixin salt when in acidic solutions is re-protonated, forming norbixin, which is a water-insoluble dicarboxylic acid and then the pigment precipitates. The reaction extent was set to 75% based on a reaction-limiting component (norbixin salt).

P-11/NFD-101 Filtration and drying

The solution containing norbixin is then transferred to a Nutsche filter to isolate the pigment and obtain the final product. The filtration time is 2 h. Particulate component removal was set as: 95% norbixin and the LOD was left as default at 30%. The cake is washed with HCl (1 M) and then dried at a rate of 0.75 kg/m².h, in an atmosphere of nitrogen flowing at a rate of 5 wt gas/wt evaporated. The cake was cooled down to 25 °C to obtain the final product with 86.1% of norbixin.

C. Recovery section

To reduce the cost of the process, a section for recovery the salt, PEG 1500 and water were added to the model. Raffinate from the differential extractor (P-9/DX-101) and filtrate from the Nutsche filter (P-11/NFD-101) are transferred to a storage tank P-12/V-103 to feed the diafiltration procedure P-13/DF-101.

P-13/DF-101 Diafiltration

Diafiltration is a dilution process based on molecular size in which low molecular weight solutes are removed from PEG 1500 and protein solutions (in this specific case) through ultrafiltration membranes. The rejection coefficients of the PEG 1500 and the proteins were set at 0.95, the concentrate factor at 2 (feed/retentate), filtration time and flux were left as default, 4h and 20 L/m².h, respectively.

P-14/RO-101 Reverse osmosis

A batch reverse osmosis is a separation process mainly used for removing impurities or unwanted components from water. The rejection coefficient of water was set at 0.01. The filtration time was set as 24 h and the concentration factor as 4.

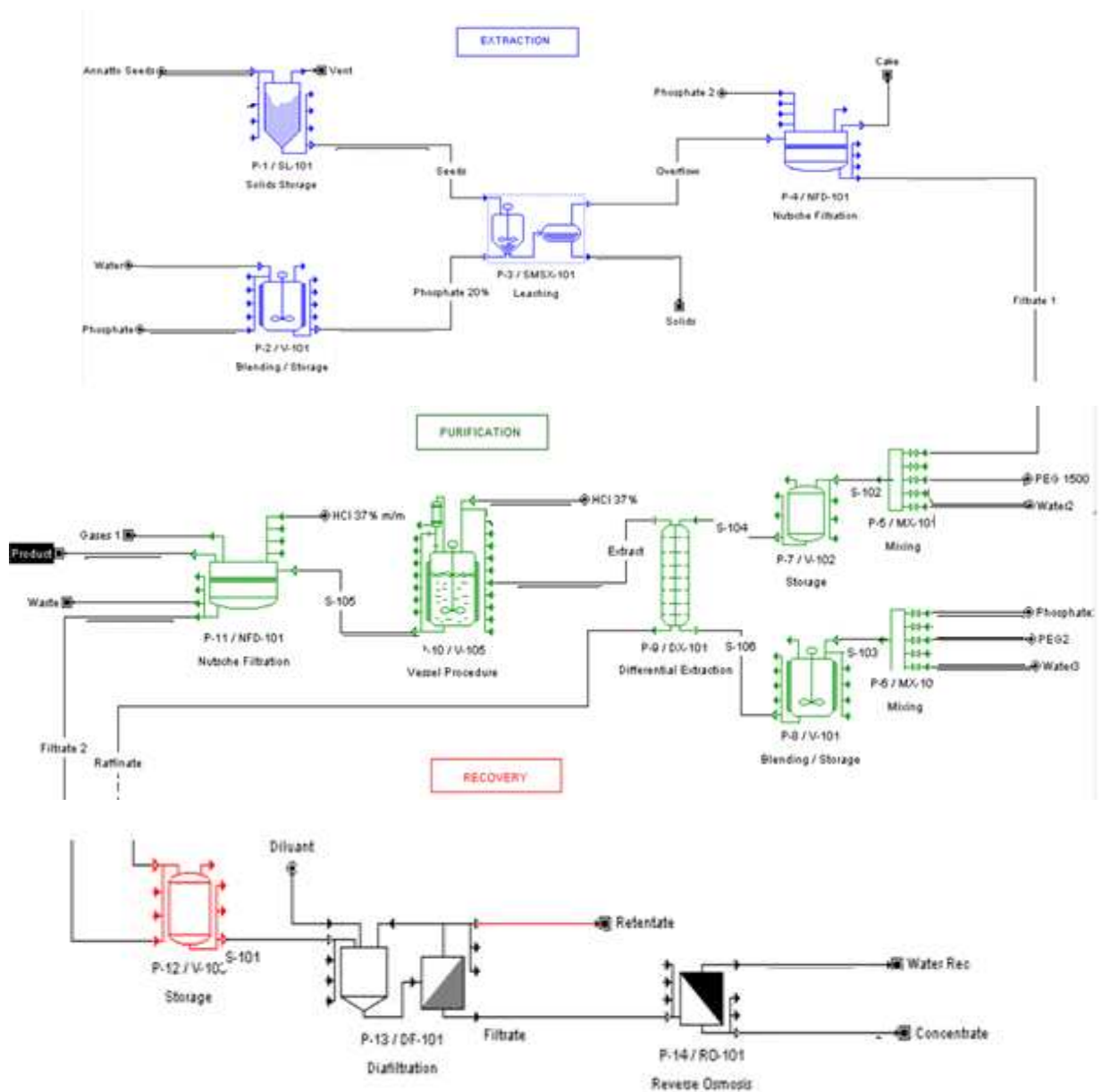


Figure 1. Process flow diagrams of extraction and purification of bixin from annatto seeds.

Table 2. Information provided on the equipment necessary for the simulation

Step	Equipment	Unit Operation	Characteristics
1.Extraction	P-1/SL-101	Seeds storage	-Store annatto seeds to use for following leaching process -Inlet of 1.0 t of annatto seeds
	P-2/V-101	Blending	-Load 1,600 kg of water -Load 400 kg of potassium phosphate

			-Agitation: 10 min, 0.1 kW/m ³
			-Final temperature: 25 °C
	P-3/SMSX-101	Leaching	-Mixer residence time: 3h
			-Settler residence time: 1h
			-Temperature: 20 °C
			-Recovery yield: Norbixin salt (49%)
			-5% of inert lost to liquid phase
			-2 kg of water lost per 1 kg of solid phase
	P-4/NFD-101	Filtration	-Filtration time: 1h
			-99% of inert removed
			-LOD: 30%
			-Max. cake thickness: 15 cm
			-Cake wash with 3 L of potassium phosphate per 1 L of cake for 30 min
2.Purification	P-7/V-102	Heavy phase storage	-Storage of heavy phase (ATPS)
			-Tank volume: 50 m ³
	P-8/V-101	Blending	-Mixing PEG phase
			-Agitation: 10 min, 0.1 kW/m ³
	P-9/DX-101	Extraction (ATPS)	-Liquid-liquid extraction (ATPS)
			-Partition coefficients: Norbixin salt (210.10), PEG1500 (7.60), Potassium phosphate (0.24), Protein (0.45), Sugar (1.01).
			-Mass transfer coefficient: 0.72 cm/h (default)
			-Single-solvent system: Water (0.65 in light phase)
	P-10/V-105	Saponification	-Charge 4kg of hydrochloric acid 37%
			-Stirred reactor: Saponification reaction, 75% of extent
		-Temperature: 25 °C	
P-11/NFD-101	Filtration	-Filtration time: 2 h	
		-95% of norbixin removed	
		-LOD: 30%	
		-Max. Cake thickness: 15 cm	
		- Cake wash with 7 L of HCl 37% per 1 L of cake for 10 min	
3.Recovery	P-12/V-103	Storage	-Volume: 50 m ³

	P-13/DF-101	Diafiltration	-Rejection coefficient: PEG 1500 0.95, Proteins 0.95
			-Filtrate flux: 40 L/m ² .h
			-Max. Solids concentrate in retentate: 600 g/L
			-Concentration factor (feed/retentate): 2
			-Membrane area: 56 m ²
	P-14/RO-101	Reverse osmosis	-Rejection coefficient: Water 0.01
			-Filtrate flux: 20 L/m ² .h
			-Max. Solids concentrate in retentate: 350 g/L
			-Concentration factor: 4
			-Filtration time: 12 h
-Membrane area: 28 m ²			

2.6.2 – Economic analysis

The cost of raw material prices was estimated as the mean of values from different suppliers. Utility prices were taken from the literature or from *SuperPro Designer* default values and the cost of operational labor was taken from the literature. All these costs are presented in Table 3. Economic assumptions used to model the total capital cost investment were based on the study by Yang and Rosentrater (2019).

Table 3. Input economic parameters for *SuperPro Designer* simulation v.7.0[®] (Intelligen, Inc.)

Cost of raw material	Value	Dimension
Annatto seeds ^a	0.91	US\$/kg
Water (for direct use in the process) ^b	2.23	US\$/t
Potassium phosphate ^c	3.55	US\$/kg
Polyethylene glycol 1500 ^c	2.58	US\$/kg
Hydrochloric acid ^c	2.40	US\$/kg
Cost of utilities	Value	Dimension
Water (for cooling and cleaning) ^d	0.05	US\$/t

Steam ^d	12	US\$/t
Electricity ^e	0.1	US\$/MWh
Cost of operational labor	Value	Dimension
Wage ^f	5.95	US\$. h ⁻¹

^aBased on IBGE data for reference year of 2018.

^bBased on Copasa data for reference year of 2019.

^cDirect quotation for reference year of 2020.

^dSPD database.

^eBased on Firjan data for reference year of 2011.

^fBureau of Labor Statistics, <http://www.bls.gov/fls/country/brazil.htm>, USA, accessed on April 4th, 2020.

The Return on Investment (ROI), Net Present Value (NPV), Internal Rate of Return (IRR) and Payback Time were the parameters used to evaluate the attractiveness of the project. A sensitivity analysis was performed in order to understand which parameters significantly affect the payback of the project.

3 – RESULTS AND DISCUSSION

3.1 – Seeds characterization

The percentage of moisture, ash, total lipids, protein and carbohydrate were 9.41%, 4.61%, 2.78%, 14.68% and 68.52%, respectively. The results are similar to those found in the literature (TAHAM, 2016; TAHAM, 2015; ALBUQUERQUE & MEIRELES, 2012).

The bixin content obtained in the extraction with chloroform was 1.03% and was used as a reference to compare with the other treatments. The literature presents a bixin content in the seeds of between 1 and 6% (TAHAM, 2016; TAHAM, 2015; ALBUQUERQUE & MEIRELES, 2012). This variation can be justified by different environmental conditions in the production region (BALASWAMY et al., 2006).

3.2 – Leaching

A FCD design was applied to characterize the effect of salt concentration (X_1), pH (X_2), and temperature (X_3) on the leaching of annatto seeds. Table 1 shows the coded and uncoded values of each factor and the experimental yields (Y_{as} for ammonium sulfate, Y_{ss} for sodium sulfate and Y_{pp} for potassium phosphate).

To fit a mathematical model to the experimental data, regression analysis was done. The relationship between the yield and the independent variables were described by quadratic

models and were evaluated by analysis of variance (ANOVA) using Fisher's statistical test (F-test). Parameters with less than 95% significance ($p > 0.05$) were excluded from the model and incorporated into the error term. The models are described by Equations 3.1 to 3.3 below.

$$Y_{as} = 29,64 - 9,12x_2 \quad (3.1)$$

$$Y_{ss} = 39,97 - 8,40x_1x_2 \quad (3.2)$$

$$Y_{pp} = 14,98 - 2,54x_1 - 12,61x_2 - 3,14x_3 + 5,14x_2^2 + 5,63x_3^2 + 1,51x_1x_2 - 4,31x_1x_3 + 7,52x_2x_3 \quad (3.3)$$

The R^2 values for the models are 0.65, 0.65 and 0.50 for AS, SS and PP, respectively. The highest yields were obtained when using potassium phosphate. High salt concentration, low pH and low temperature led to a high yield. Salt concentration was limited to 20% (w/w) due to salt solubilization limitations. Temperature and pH were set to the minimum value of the experimental design, i. e., 25 °C and 9.0, respectively.

The literature demonstrates that, normally, the extraction yield of natural dyes increases until the alkali concentration reaches a maximum and then it no longer increases with any further increase in alkalinity (ALI et al., 2009; ELKSIBI, 2014; CHENG et al., 2019).

3.3 – ATPS extraction of bixin

ATPS is of great importance in several purification strategies, such as for animal or plant cells, microorganisms, nucleic acids and, mainly, enzymes and proteins. These systems have been applied for dye purification (MAGESTE et al., 2009; MAGESTE et al., 2012; JUNQUEIRA et al., 2018). For each particular situation, controlled parameters can be adjusted to improve the target partition, such as the choice of ATPS polymers or components, pH of the system, concentration of the components, the use of affinity binders (RITO-PALMARES, 2004; SOARES et al., 2015). The use of ATPS for purification has the inconvenience of extracting simultaneously sugars and proteins, which are the main contaminants of the pigment.

In this study, partition experiments were performed to capture and pre-purify the bixin from the extract obtained in the previous leaching operation. Figure 2 presents the values of K_p obtained at each point of top phase/bottom phase (TP/BP) ratio and the standard deviation.

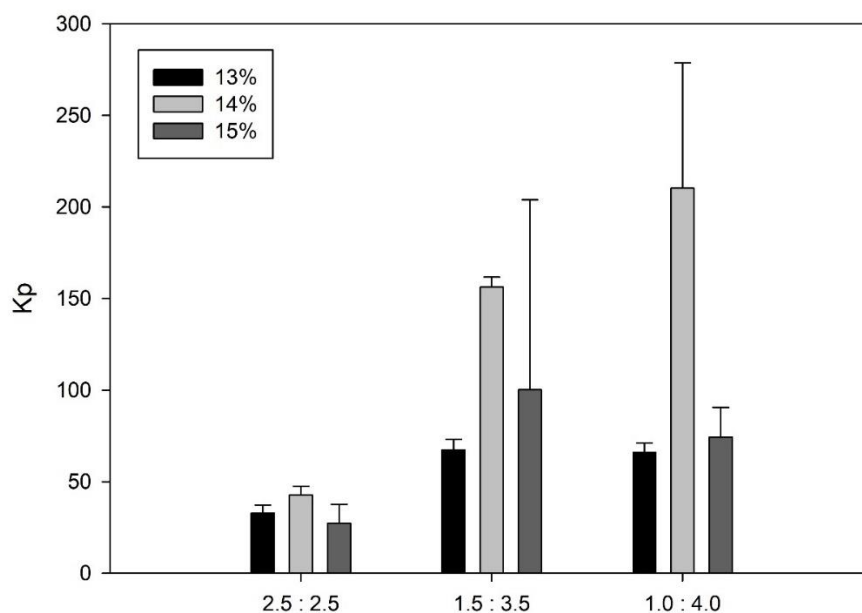


Figure 2. Results obtained for the ATPS studied at different concentrations and TP/BP ratios.

An analysis of these data reveals that the ATPS containing 14% of PEG 1500 and 14% of potassium phosphate with a TP/BP ratio of 1:4 (v/v) achieved a greater K_p (210.21). A quick analysis of the partition coefficient results revealed that the norbixin salt preferentially partitioned to the PEG phase since all the K_p values are greater than 1. The results are in agreement with the study of Mageste et al. (2012) that demonstrated the partition of norbixin to the top phase is favorable by the enthalpic and entropic contributions. Besides that, this data demonstrates that ATPS is a good methodology for the partitioning of norbixin salt as the dye partition coefficient values were high ($27 < K_p < 210$). Therefore, the high selectivity of the norbixin salt confirms that this system can separate the dye studied here. On the other hand, protein and sugar also partitioned to the top phase, though in less magnitude. In Table 4, values of the partition coefficient of norbixinate, proteins and sugars are shown.

Table 4. Norbixinate, protein and sugar partition coefficients

	K_p	Standard deviation
Norbixinate	210.21	68.4
Protein	0.45	0.01
Sugar	1.01	0.04

Table 4 shows that proteins from annatto extract have greater affinity to the bottom phase as the partition coefficient is lower than 1. A similar partition behavior was demonstrated in a previous study with whey proteins. The partition study using ATPS showed that main protein (β -lactoglobulin) had partitioned to the salt-rich phase (ALCANTARA et al., 2011).

Sugars are considered contaminants of natural pigment extracts as they contribute to pigment degradation. In this study, it was not possible to separate sugar from the pigment as the partition coefficient obtained was 1, indicating that the sugar concentration is the same in both phases. A previous study demonstrated that free sugars were successfully separated from beet extract using ATPS, the betalains partitioned to the top phase and the sugar preferentially stayed in the bottom phase (CHETHANA et al., 2007). Even if this ATPS couldn't isolate the dye from the sugars, control parameters can be adjusted to improve the target partition, as mentioned before. A recent study demonstrated that different strategies to choose the proper ATPS can help to achieve the desired partition (GONZÁLEZ-AMADO et al., 2021). Summarizing, this ATPS presented desirable characteristics for purifying the seed extract separating protein but not the sugar from the dye.

3.4 – Acid precipitation

A precipitation study was performed to show the precipitation behavior of norbixin as a function of pH. The results, shown in Figure 3, revealed that, as the pH decreases to 5.0, the concentration of norbixin in the top phase of the ATPS decreases, meaning an increase in precipitate formation. In pH values lower than 5.0, norbixin solubility didn't change, remaining constant until pH 3.0.

This is justified by the conversion of the norbixin salt, which is water-soluble, into norbixin. The norbixin salt, when in acid solutions, is re-protonated, forming norbixin, which precipitates in acid media.

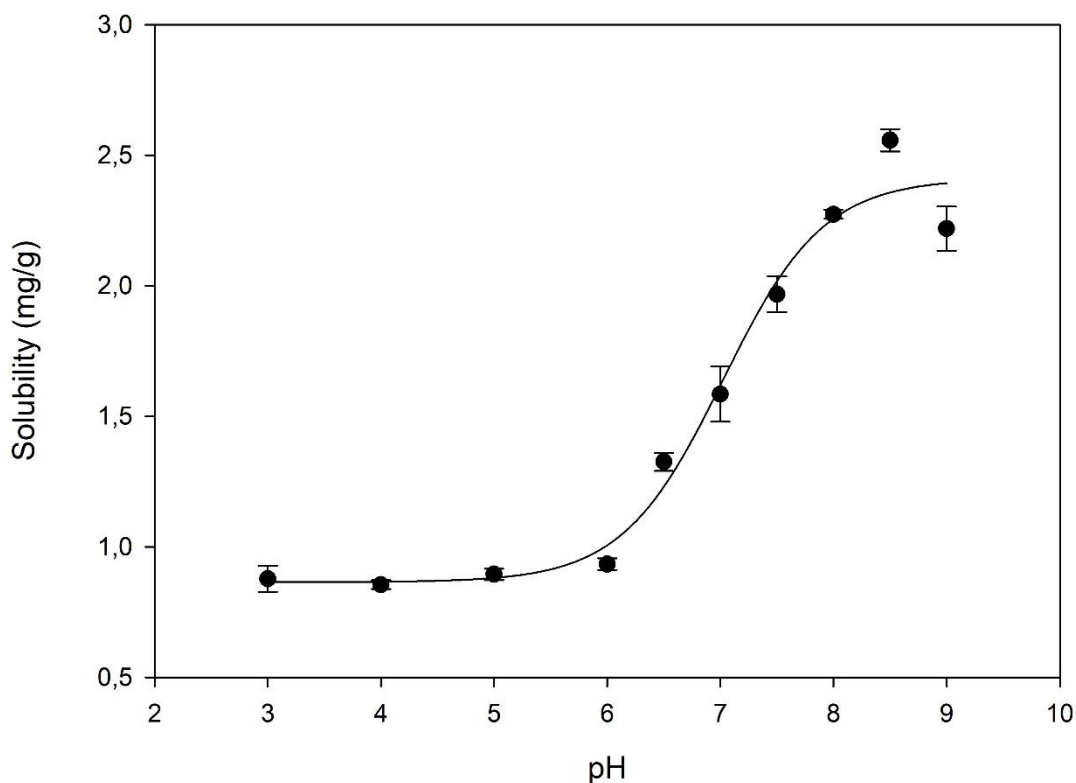


Figure 3. Solubility of norbixin in the top phase of ATPS as a function of pH at 25 °C.

After precipitation, the dye can be recovered by decantation or filtration. Acid precipitation has been used for the purification of annatto extract resulting in a concentrated extract.

The dye yield for each step of the process was calculated and is presented in Table 5.

Table 5. Dye yields for each step

	$m_{\text{dye}} \text{ (g)}^1$	Yield
Initial	1.63E-04	100.00%
Leaching	7.97E-05	49.00%
ATPS	7.93E-05	99.53%
Precipitation	7.92E-05	99.91%

(1) Dye mass in grams

The initial mass represents the bixin content of the seeds. The leaching yield was calculated using the equation 3.3 and demonstrate that 49% of the bixin of the seeds was extract

in this step. The following steps obtained high yields, reaching more than 99%, showing that all the bixin mass that was extracted in the first stage was recovered in the following steps.

3.5 – Modeling

The techno-economic aspects of upscaling the lab-based extraction and purification of bixin to industrial scale were analyzed.

3.5.1 – Economic results

By starting the extraction with 1 ton of annatto seeds, process simulation showed that this plant has the capacity to produce 1,916.22 kg of main product per year. The unit production cost was \$ 2,832.52/kg. A total of 649 batches per year was considered and an annual operational time of 7,918.56 h (330 days/year). In each batch, about 2.95 kg of final product are produced. The month that the plant is down could be used for annual maintenance and projects that require a shutdown to be done (Table 6).

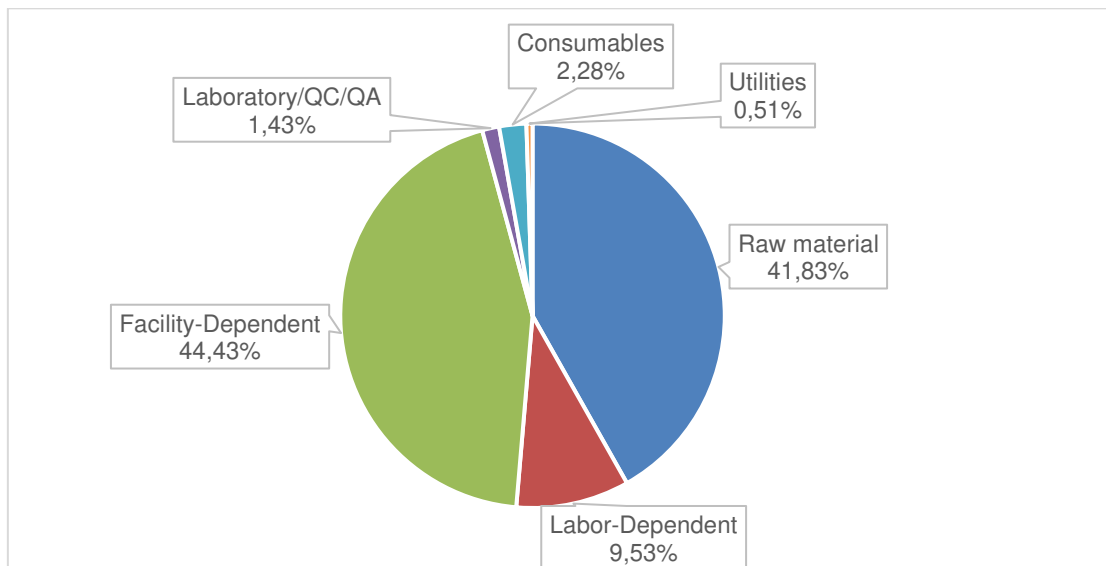
Table 6. Economic results

Parameter	Value
Annual operating time (h)	7,918.56
Recipe batch time (h)	34.56
Number of batches per year	649.00
Production Rate (kg MP ¹ / year)	1,916.22
Unit production cost (\$/ kg MP)	2,832.52
Total Capital Investment (\$)	9,295,000
Operating Cost (\$/ year)	5,428,000
Total Revenues (\$/ year)	5,932,000
Gross Margin (%)	8.50
Return On Investment (ROI) (%)	20.85
Intern Rate of Return (IRR) (%)	11.33
Payback time (year)	4.80
Net Profit Value (NPV) (\$)	1,344,000

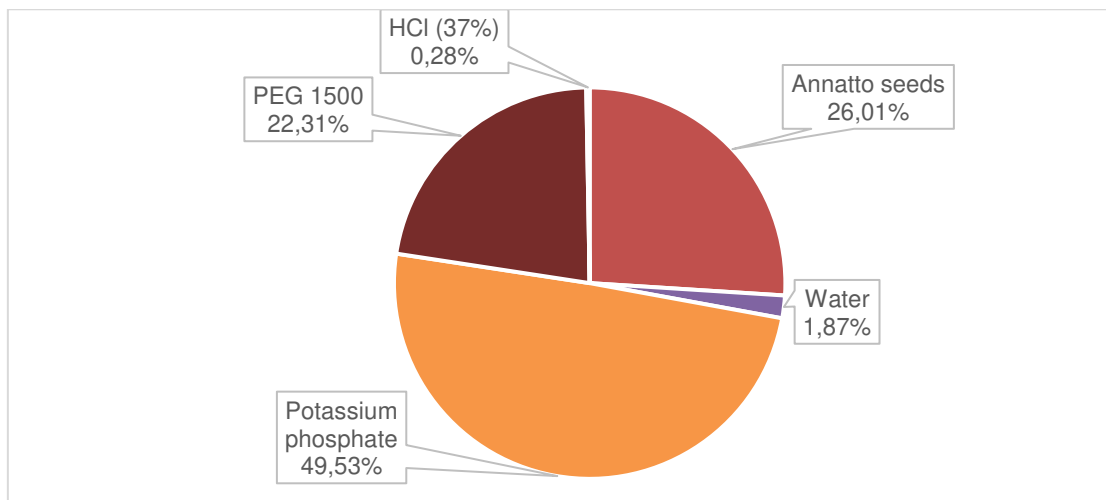
¹MP = Main Product

Table 6 was extracted from the Economic Evaluation Report of Super Pro Designer software. The capital investment for this plant is \$ 9,295,000 including direct fixed capital cost

(\$ 8,608,000), working capital (\$ 256,000) and startup cost (\$ 430,000). The annual operating cost is \$ 5,428,000 and that translates to a unit production cost of around \$ 2,832.52/kg of the main product. Figure 4 (a) shows the percentage contribution of each cost to the annual operating cost. The facility-dependent is the major contribution and represents 44.43% of the cost (\$ 2,411,000). The raw material cost is the second highest percentage, representing 41.83% of the annual cost (\$ 2,270,000).



(a)



(b)

Figure 4. (a) Annual operating cost and (b) Raw material contribution.

Figure 4 (b) shows the percentage contribution of each raw material. As can be seen, potassium phosphate contributes with almost 50% of the raw material cost (\$ 1,124,530) and it

is followed by annato seeds with 26,01% (\$ 590,590). The sum of them represents more than 75% of the raw material cost. Therefore, the cost of these two items was considered in the sensitivity analysis.

In economic analysis, some cash flow measures - such as Return on Investment (ROI), Net Present Value (NPV), Internal Rate of Return (IRR) and Payback Time - are key parameters widely used to evaluate the attractiveness of a project (BAJIC et al., 2017; ZABOT et al., 2018; CHALERMTHAI et al., 2020). ROI evaluates the probability of gaining a return from an investment, that means, the percentage of money recovered from the project profit. Then, the higher ROI is, the better the investment is. ROI for this project is 20.85% and according to the literature, values of ROI higher than 15% indicates that the project is feasible (FERNÁNDEZ- RONCO et al, 2013; ZABOT; MORAES; MEIRELES, 2018).

The NPV can be calculated by the difference between the present value of cash inflows and outflows that occur during the lifetime of a project, discounted at the market discount rate. Generally, an investment with a positive NPV indicates that it will be profitable (DHESKALI et al, 2020), which is the case of this project (\$ 1,344,000). The IRR is the discount rate that makes the NPV of an investment opportunity equal to zero. The IRR calculated was 11.33% and the higher it is, the more desirable the investment is.

The total revenue is \$ 5,932,000 per year and is based on a dye selling price of \$ 2,400/kg and the recovery of the PEG 1500, salt and water. Part them were recovered in the recovery section and they can be reused in the process. Therefore, they were considered as revenue and the PEG 1500 and salt selling prices were calculated through a linear relationship between concentration and the market price. The main product selling price was determined to achieve a payback time lower than 5 years (4.80). The initial investment can be quickly recovered with lower payback times, therefore, projects that have payback times larger than 5 years are not considered as attractive to investors (PARJIKOLAEI et al, 2017). Despite this, the selling price of the product could be considered high if compared to other dyes found in the Brazilian market. Based on national supplier quotations, dyes with norbixin concentration from 0.3 to 2.5% were found, a lower concentration compared to the product obtained in the simulation (88% of norbixin), but the price ranged between \$0,13/kg and \$2,40/kg. However, norbixin standard (70% of purity) from laboratory suppliers is sold for \$ 3.08/mg or \$ 3,080,000/kg. This price is higher than the simulation one, demonstrating that the final product obtained is attractive as its selling price is lower and its purity is higher than the norbixin standard. In order to study the influence of the selling price, a sensitivity analysis was undertaken.

3.5.2 – Sensitivity analysis

A sensitivity analysis was performed in order to understand which parameters significantly affect the payback of the project. Since some raw material and equipments costs have a huge variation and were obtained from different sources, this analysis was carried out to cover those variations. The parameter value (base case) in the analysis was increased or decreased by 25%, all the others were kept constant and the variation of the payback is presented in Figure 5.

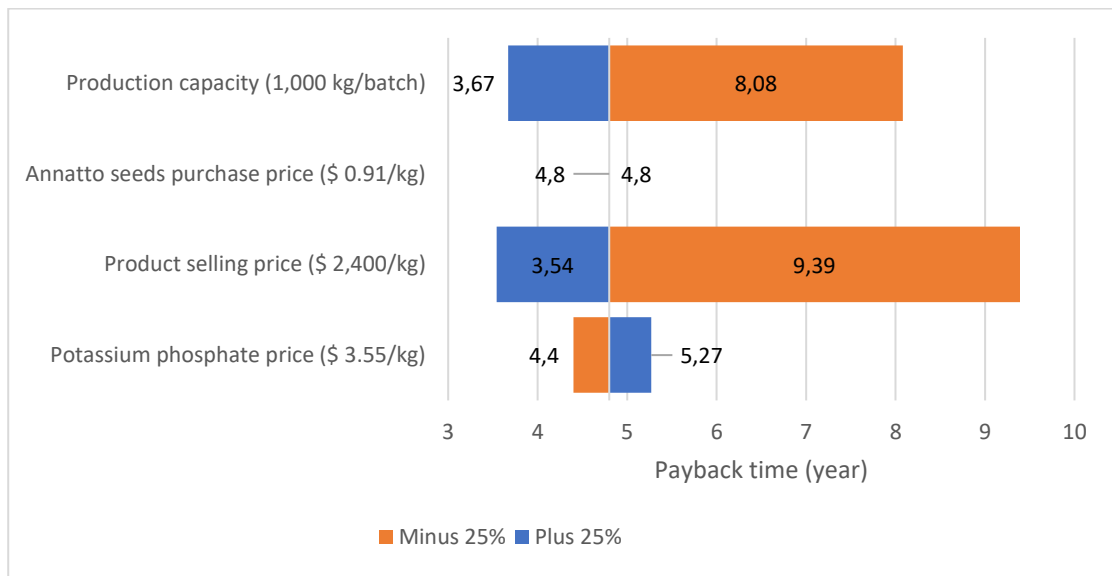
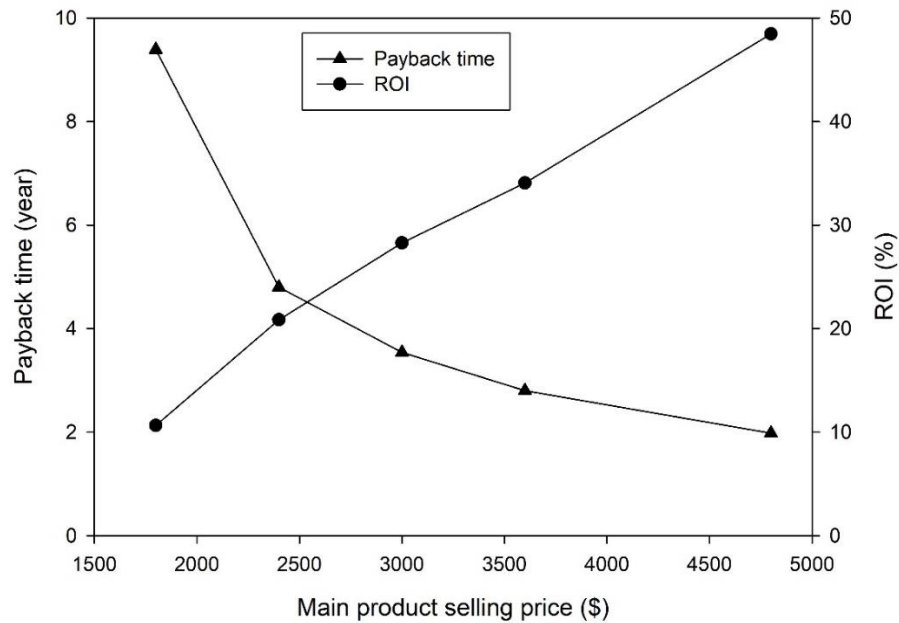


Figure 5. Tornado chart of dependent price and cost variations.

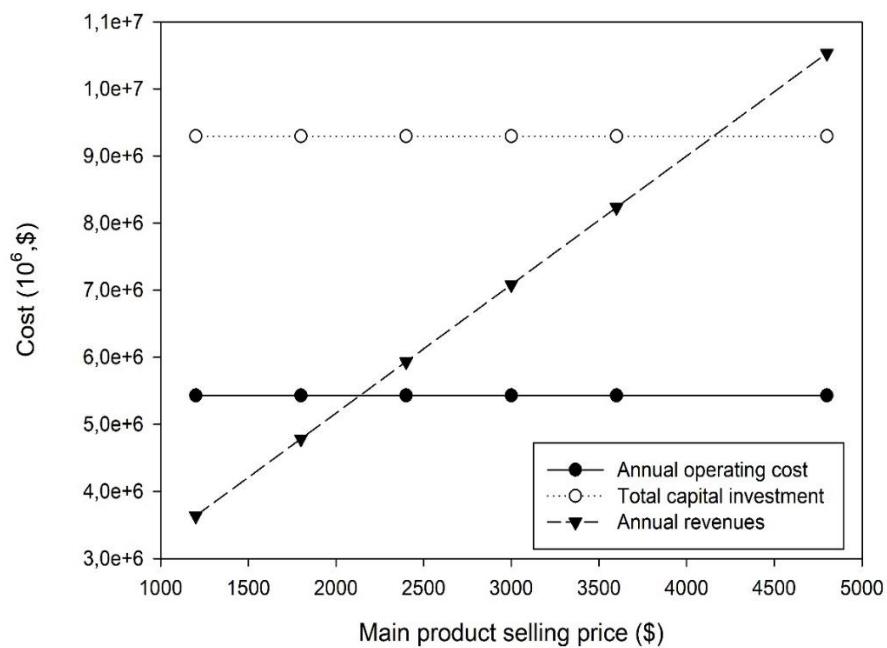
Figure 5 shows that the most sensitive parameter is the product selling price. Reducing this price by 25%, in other words, to \$ 1,800.00, the payback increased to 9.39 years, an 95% increase in the base time. Increasing the base selling price by 25% (\$ 3,000.00), the payback decreased to 3.54 years. Moreover, the production capacity had significant impact on the payback of the project. Meanwhile, other parameters that were analyzed did not significantly affect the payback. Therefore, for further sensitivity analysis, only the product selling price was considered.

3.5.2.1 – Main product selling price

The base case assumed a dye selling price of \$ 2,400/kg to achieve a payback time lower than 5 years (4.80). A sensitivity analysis considered a price ranging from \$ 1,200,00 (half the baseline price) to \$ 4,800 (double of the baseline case). The results are shown in Figure 6.



(a)



(b)

Figure 6. Effects of the main product price on (a) Payback time (year) and ROI (%), and (b) Annual operating cost, total capital investment and annual revenues (10^6 , \$).

Decreasing the main product selling price by 50% (\$ 1,200.00), the payback of the project reached an infinite value, making the project unfeasible and, consequently, this wasn't shown on the first graph (Figure 6a). The payback time decreased as the sale price increased and it reached 1.98 years when the price was double (\$ 4,800) the base case. ROI increased linearly with the price and reached a value of 48.46% when the price doubled. The price didn't affect the annual operating cost and the total capital investment both remaining constant with the parameter changes (Figure 6b). The revenues increased 77% compared to the base case.

Therefore, this analysis confirms that the main product selling price is a very sensitive parameter and cannot be less than \$ 2,400 in order to keep the payback time less than 5 years and keep the project profitable.

4 – CONCLUSION

A new process was developed in order to extract bixin from annatto seeds and purify it. The present study revealed that a leaching process with potassium phosphate obtained the highest yields. The ATPS containing 14% of PEG 1500 and 14% of potassium phosphate with a TP/BP ratio of 1:4 (v/v) achieved the highest K_p (210.21). Therefore, norbixin had preferentially partitioned to the top phase. The precipitation study showed that as the pH decreased, the precipitate formation increased due to a saponification reaction. The process simulation showed good economic parameters demonstrating that the project is profitable. The selling price of the product proved to be attractive when compared to the current prices of norbixin standards. A sensitivity analysis was carried out and demonstrated that the most sensitive parameter is the main product selling price. Therefore, the project is attractive based on the economic indexes analyzed.

5 - ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) and Brazilian National Council for Science and Technology Development (CNPq) for financial support.

6 - REFERENCES

ALBUQUERQUE, C.L.C; MEIRELES, M.A.A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.66, p.86-95, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.01.004>.

ALCANTARA, L. A. P. et al. Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v 879, p. 1881-1885, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.007>.

ALCÁZAR-ALAY, S. C. et al. Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. **Food Research International**, v. 99, p. 393–402, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.032>.

ALI, S.; HUSSAIN, T.; NAWAZ. Optimization of alkaline extraction of natural dye from Henna leaves and its dyeing on cotton by exhaust method. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 61-66, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2008.03.002>.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Official Methods of Analysis, 16th ed., 1997, Washington.

BALASWAMY, K.; PRABHAKARA R., P.G.; SATYANARAYANA, A.; RAO, D.G. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. **LWT**, v. 39, p. 952-956, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.004>.

BAJIĆ, B. et al. Process model economics of xanthan production from confectionery industry wastewaters. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 999–1004, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.055>.

BARROZO, M.A.S., SANTIS, K. G., CUNHA, F. G. Mechanical extraction of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. **Industrial crops and products**, v. 45, p. 279-282, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.052>.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CHALERMTHAI, B; ASHRAF, M. T.; BASTIDAS-OYANEDEL, J.; OLSEN, B. D.; SCHMIDT, J. E.; TAHER, H. Techno-economic assessment of whey protein-based plastic production from a co-polymerization process. **Polymers**, v. 12. p. 847, 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12040847>.

CHENG, T.; LIU, Z.; YANG, J.; HUANG, Y.; TANG, R.; QIAO, Y. Extraction of functional dyes from tea stem waste in alkaline medium and their application for simultaneous coloration and flame retardant and bioactive functionalization of silk. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v, 7, p. 18405 – 18413, 2019. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04094>.

CHETHANA, S.; NAYAK, C. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. **Journal of Food Engineering**, v.81, p. 679-687, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.021>.

CHISTÉ, R. C.; YAMASHITA, F.; GOZZO, F. C.; & MERCADANTE, A. Z. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography A**, v.1218(1), p. 57–63, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.094>.

CHUYEN, H. VAN et al. Improvement of bixin extraction yield and extraction quality from annatto seed by modification and combination of different extraction methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 1333–1338, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02977.x>.

CUNHA, F. G.; SANTOS, K. G.; ATAIDE, C. H.; EPSTEIN, N.; BARROZO, M. A. S. Annatto powder production in a spouted bed: and experimental and CFD study. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 976-982, 2009. <https://doi.org/10.1021/ie801382d>.

DHESKALI, E.; KOUTINAS, A. A.; KOOKOS, I. K. Risk assessment modeling of bio-based chemicals economics based on Monte-Carlo simulations. **Chemical Engineering Research and Design**, v.163, p.273-280, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.09.011>.

ELKSIBI, I.; HADDAR, W.; TICHA, M. B.; ELGHARBI, R.; MHENNI, M. F. Development and optimization of a non-conventional extraction process of natural dye from olive solid waste using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v.161, p. 345-352, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.108>.

FERNÁNDEZ-RONCO, M. P.; DE LUCAS, A.; RODRÍGUEZ, J.F; GARCÍA, M. T., GRACIA, I. New considerations in the economic evaluation of supercritical processes: Separation of bioactive compounds from multicomponent mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 79, p. 345-355, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.018>.

GÓMEZ-ORTÍZ, N. M.; VÁZQUEZ-MALDONADO, I. A.; PÉREZ-ESPADAS, A. R.; MENA-REJÓN, G. J.; AZAMAR-BARRIOS, J. A.; OSKAM, G. Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. **Solar energy material & solar cells**, v.94, p. 40-44, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2009.05.013>.

GONZÁLEZ-AMADO, M.; TAVARES, A. P. M.; FREIRE, M. G.; SOTO, A.; RODRÍGUEZ, O. Recovery of lactose and proteins from cheese whey with poly(ethylene) glycol/sulfate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 255, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117686>.

HAGHTALAB, A.; MOKHTARANI, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄). **Fluid phase equilibria**, v.215, p. 151-161, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2003.08.004>.

MAGESTE, A.B.; LEMOS, L.R. de; FERREIRA, G.M.D.; SILVA, M.D.H. da; SILVA, L.H.M. da; BONOMO, R.C.F.; MINIM, L.A. Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method of purification of natural dye carmine. **J. Chromatography, A** 45, p. 7623–7629, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.048>.

MAGESTE, A. B. et al. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69–77, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.012>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31(III), p. 426–428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MOLLER, A. H.; WIJAYA, W.; JAHANGIRI, A.; MADSEN, B.; JOERNSGAARD, B.; VAERBAK, S.; HAMMERSHIJ, M.; MEEREN, P. V.; DALSGAARD, T.K. Norbixin binding to whey protein isolate – alginate electrostatic complexes increase its solubility and stability. **Food Hydrocolloids**, v.101, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105559>.

MUTHURAMAN, G. Extractive removal of astacryl blue BG and astacryl golden yellow dyes from aqueous solutions by liquid–liquid extraction. **Desalination**, v. 277, p. 308–312, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.047>.

PARJIKOLAEI, B. R.; ERRICO, M.; EL-HOURI, R. B.; MANTELL, C.; FRETTE´, X. C.; CHRISTENSEN, K. V. Process design and economic evaluation of green extraction methods for recovery of astaxanthin from shrimp waste. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 117, p. 73-82, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2016.10.015>.

QUIROZ, J. Q; TORRES, A. C.; RAMIREZ, L. M.; GARCIA, M. S.; GOMEZ, G. C.; ROJAS, J. Optimization of the microwave-assisted extraction process of bioactive compounds from annatto seeds (*Bixa Orellana* L.). **Antioxidants**, v. 8, p. 37, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox8020037>.

RODIAH, M. H.; HAFIZAH, S. N.; ASIAH, H. N.; NURHAFIZAH, I.; NORAKMA, M. N.; NORAZLINA, I. Extraction of natural dye from the mesocarp and exocarp of *Cocos nucifera*, textile dyeing, and colour fastness properties. **Materials today: proceedings**, v. 46, part 8, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.315>.

RODRIGUES, L.M.; ALCÁZAR-ALAY, S.C.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Bixin extraction from defatted annatto seeds. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, p. 268–283, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.10.010>.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 807, p. 3–11, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.01.008>.

SCOTTER, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 26:8, p. 1123-1145, 2009. <https://doi.org/10.1080/02652030902942873>.

SILVA, G.F.; GAMARRA, F.M.C; OLIVEIRA, A.L; CABRAL, F.A. Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 419–426, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322008000200019>.

SINHA, K.; CHOWDHURY, S.; SAHA, P.D.; DATTA, S. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). **Ind. Crop. Prod.**, v. 41, p. 165–171, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.004>.

SOARES, R. R. G; AZEVEDO, A. M.; ALSTINE, J. M. V.; AIRES-BARROS, M. R. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. **Biotechnology Journal**, v. 10, p. 1158-1169, 2015. <https://doi.org/10.1002/biot.201400532>.

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

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

YANG, M.; ROSENTRATER, K. A. Techno-economic analysis of the production process of structural bio-adhesive derived from glycerol. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, p. 388-398, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.288>.

YOLMEH, M.; NAJAFI, M.B.H.; FARHOOSH, R. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 155, p. 319–324, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.059>.

ZABOT, G. L.; MORAES, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Process integration for producing tocotrienols-rich oil and bixin-rich extract from annatto seeds: A techno-economic approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 122–138, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.007>.

ZHANG, Y. & ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 1-9, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.009>.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho um novo processo foi desenvolvido com o objetivo extrair e a purificar a bixina das sementes de urucum. O presente estudo revelou que a lixiviação com fosfato de potássio obteve os maiores rendimentos dentre as diferentes soluções estudadas. Na purificação, o ATPS contendo 14% (m / m) de PEG 1500 e 14% (m / m) de fosfato de potássio com uma razão TP/BP de 1: 4 (v / v) atingiu o maior Kp (210,21). Portanto, o norbixinato foi preferencialmente particionado na fase superior. Por fim, o estudo de precipitação mostrou que conforme o pH diminuía, a formação de precipitado aumentava devido a uma reação de saponificação.

Neste estudo foi desenvolvido um modelo matemático do processo utilizando o software SuperPro Designer® (INTELLIGEN INC, USA). A simulação apresentou bons parâmetros econômicos demonstrando que o projeto é lucrativo. Além disso, o preço de venda do produto final se mostrou atrativo quando comparado com os preços atuais dos padrões de norbixina. Sendo assim, uma análise de sensibilidade foi realizada e demonstrou que o parâmetro mais sensível é o preço de venda do produto principal. Logo, pode-se concluir que projeto é atrativo baseado nos índices econômicos analisados.