

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR
CROMATOGRAFIA DE COMPOSTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza

Juarez Souza de Oliveira

Florianópolis – SC, 23 de fevereiro de 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR
CROMATOGRAFIA DE COMPOSTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza

Juarez Souza de Oliveira

Florianópolis – SC, 23 de fevereiro de 2005.

CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR
CROMATOGRAFIA DE COMPOSTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Por

Juarez Souza de Oliveira

Submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de
Doutor em Engenharia
Especialidade: **Engenharia Química**

Prof. Dr. Antônio Augusto U. de Souza.

Orientador

Prof^a. Dra. Selene M. A. Guelli U. de Souza

Co-orientadora

BANCA EXAMINADOR

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coordenador do Curso

Prof. Dr. Antônio Augusto U. de Souza

Prof^a. Dra. Selene M. A. Guelli U. de Souza

Prof^a. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder

Prof. Dr. João A. F. R. Pereira

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2005.

A paciência é irmã do tempo; ela vive e confia nele,

e este a recompensa constantemente.

Do livro Introdução ao Conhecimento Logosófico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela dádiva do saber, instrumento que nos impulsiona no caminho para desvendar os frutos de sua criação. A quem nos momentos difíceis recorri e sempre me iluminou.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza e à Prof^a Dr^a Selene M. A. Guelli U. de Souza, pela oportunidade para realização deste trabalho e à banca examinadora pelo tempo dedicado à análise deste trabalho.

À minha esposa Jocinéa, pelo incentivo e paciência, sempre do meu lado dando-me força para concluir esta jornada. Aos meus filhos Guilherme e Raquel agradeço pelo carinho dedicado e compreensão.

Em especial aos grandes amigos, Ricardo e Jaime que sem medir esforços sempre me apoiaram e também pela valiosa ajuda prestada na elaboração de experimentos agradeço a Milena, Fabiana, Thais, Junior, Felipe, Adriana e a Talita. A Clarice e ao Anderson pela atenção dispensada no início dos trabalhos. A Emilly, ao Ronald, a Heloisa e a Cristiane, que sempre me incentivaram.

Também ao Bruno e a Elaine que muito me auxiliaram na versão final.

Ao secretário da coordenação do CPGENQ, Edevilson da Silva, pela sua atenção e auxílio.

Ao amigo Ângelo do Departamento de Química da UFSC pela valiosa ajuda como também ao professor Dr. Madureira e ainda ao professor Dr. Luciano da Univali.

Aos professores da UFPR em particular aos amigos, professores Drs. Moacir Kamisnki, Regina Weinschutz e Carlos Yamamoto, que sempre me apoiaram para a realização deste trabalho, como também ao professor Dr.Obdílio pelas valiosas informações técnicas.

A Capes pelo auxílio financeiro e Universidade Federal de Santa Catarina pelo uso de suas instalações.

A todos os amigos que, embora não citados nominalmente, foram importantes para realização deste trabalho.

Dedico esta conquista a você Jocinea,
Minha querida esposa e aos nossos filhos Guilherme e Raquel,
Pela paciência, incentivo e especialmente
Pelo carinho ao longo desta jornada
Amo vocês

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
SIMBOLOGIA	xix
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO 1– INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO	06
OBJETIVO GERAL	06
OBJETIVO ESPECÍFICO	06
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
2.1 – ADITIVOS NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES	08
2.1.1– PESQUISAS NA ÁREA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	08
2.1.2 – PESQUISAS NA ÁREA DA SAÚDE (MÉDICO-FARMACÊUTICA)	10
2.2 – ESTABILIDADE DOS CORANTES NATURAIS	14
2.3– CAROTENÓIDES	15
2.3.1 – BIOSÍNTESE DOS CAROTENÓIDES	16
2.3.2 – OCORRÊNCIA DOS CAROTENÓIDES-DISTRIBUIÇÃO NA	17
NATUREZA	
2.3.3 – FUNÇÃO DOS CAROTENÓIDES	17

2.3.4 – APOCAROTENÓIDES	19
2.3.5 – ISOMERIZAÇÃO	22
2.4 – BIXINA	23
2.5 – ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA PRODUÇÃO DE CORANTES	25
2.6 – DERIVADOS SINTÉTICOS DE CAROTENÓIDES	27
2.7 – URUCUM	30
2.7.1 – PRINCIPAIS APLICAÇÕES PARA O PIGMENTO	34
2.7.2 – COMPOSIÇÃO DA SEMENTE	35
2.7.3 – TOXIDEZ	40
2.7.4 – MÉTODOS DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO	40
2.7.5 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO	45
2.7.6 – ESTABILIZAÇÃO/CONSERVAÇÃO	48
2.8 – PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR ADSORÇÃO	49
2.9 – CROMATOGRAFIA	50
2.9.1 – CROMATOGRAFIA PREPARATIVA	52
2.9.2 – VARIÁVEIS E PARÂMETROS OPERACIONAIS NA CROMATOGRAFIA	55
2.9.3 – RELAÇÕES DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO	64
2.9.4 – DESLOCAMENTO DO SOLUTO ATRAVÉS DE UM LEITO EMPACOTADO	66
2.9.5 – MEDIDAS DE EFICIÊNCIA NA CROMATOGRAFIA	68

2.9.6 – OTIMIZAÇÃO DE UMA COLUNA - CONTROLE DA RESOLUÇÃO	71
2.9.7 – PERMEABILIDADE EM UMA COLUNA CROMATOGRÁFICA	73
2.9.8 – DESEMPENHO DE UMA COLUNA	74
2.10 – ADSORVENTES	74
2.10.1 – CARACTERÍSTICAS DO ADSORVENTE	75
2.11 – POROSIDADE DE UM LEITO	77
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	79
3.1 – SEMENTE DE URUCUM	79
3.2 – EQUIPAMENTOS	79
3.3 – REAGENTES	80
3.4 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO	80
3.4.1 PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO SÓLIDO DE URUCUM (PIGMENTO)	83
3.5 – PADRÃO DE BIXINA	83
3.6 – DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA BIXINA E NORBIXINA	83
3.7 – MONITORAMENTO DO TEOR DE BIXINA NO EXTRATO BRUTO EM MEIO ALCOÓLICO	83

3.8 – AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DE PADRÃO DE BIXINA	84
3.9 – METODOLOGIA ANALÍTICA	85
3.9.1 – ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA	85
3.9.2 – DETERMINAÇÃO DA MASSA DO EXTRATO SECO	88
3.10 – ACOMPANHAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO CURSO DA HIDRÓLISE ALCALINA	89
3.11 – CRISTALIZAÇÃO DA BIXINA	90
3.12 – CROMATOGRAFIA PREPARATIVA	91
3.12.1 – PREPARAÇÃO DA COLUNA	92
3.13 – OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE BIXINA	97
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4.1 – SOLUBILIDADE DA BIXINA E NORBIXINA EM DIFERENTES SOLVENTES	99
4.1.1 – SOLUBILIDADE EM SOLUÇÕES ALCALINAS	101
4.2 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO	105
4.2.1 – TEORES DE BIXINA DO EXTRATO SOLÚVEL DURANTE OS CICLOS DE EXTRAÇÃO	107
4.2.2 – COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA E OUTRO SOLVENTE NA MISTURA	112

4.2.3 – EXTRAÇÃO DE BIXINA COM SOLUÇÃO ALCOÓLICA AMONICAL	114
4.3 – DERIVADOS DA BIXINA	115
4.3.1– DERIVADO AMONICAL	115
4.3.2 – DERIVADO CÁLCICO	117
4.4– OBTENÇÃO DE BIXINA CRISTALIZADA	120
4.5– RECRISTALIZAÇÃO DA BIXINA	121
4.6– SOLUBILIDADE DA BIXINA E DERIVADOS (METODOLOGIA II)	123
4.7– ESCOLHA DO SOLVENTE PARA A ESPECTROFOTOMETRIA	123
4.7.1 – EMPREGO DO CLOROFÓRMIO	123
4.7.2 – EMPREGO DO ETANOL	124
4.8 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM CLOROFÓRMIO	128
4.9 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM SOLUÇÃO ALCALINA	129
4.10 – ACOMPANHAMENTO DA ESTABILIDADE DA BIXINA EM ETANOL	132
4.11 – MONITORAMENTO DE PADRÕES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	133

4.12 – MONITORAMENTO ESPECTROMÉTRICO NO CURSO DA HIDRÓLISE	136
4.13 – SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	140
4.13.1 – VELOCIDADE DOS PICOS CIS E TRANS COMO FUNÇÃO DA POLARIDADE	146
13.2 – VOLUME DE COLUNAS EM FUNÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL	149
4.13.3 – NÚMERO DE PRATOS	150
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	152
5.1 – PRINCIPAIS CONCLUSÕES OBTIDAS DO TRABALHO	152
5.2 – SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	154
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
Anexo A – BALANÇO DE MASSA - EXTRAÇÃO ALCOÓLICA AMONIACAL	169
Anexo B – MICROFOTOGRAFIAS DE BIXINA E DERIVADOS	171
Anexo C – ESPECTRO DE RMN DA CIS BIXINA	174
Anexo D – ESPECTRO DE RMN DA TRANS BIXINA	176
Anexo E – COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE DE BIXINA EM SOLUÇÃO ALCOÓLICA	180

Anexo F - VALORES DE ABSORBÂNCIA DURANTE MONITORAMENTO DE HIDRÓLISE	182
Anexo G-RESUMO DE DADOS OBTIDOS DE COLUNAS PREPARATIVAS	185
Anexo H - CROMATOGRAMAS DE DUAS COLUNAS COM DIFERENTES SECÇÕES	186
Anexo I- CROMATOGRAMA -PICO 2 DEFORMADO	188
Anexo J - PLANÍLHA DE DADOS CROMATOGRÁFICOS (CROMATOGRAFIA FLASH)	189

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados e propriedades da bixina e norbixina.	25
Tabela 2 –	Solubilidade da bixina em CO ₂ supercrítico	43
Tabela 3 –	Solubilidade do pigmento de urucum em CO ₂ supercrítico	44
Tabela 4. –	Solubilidade do óleo de urucum em CO ₂ supercrítico	44
Tabela 5 –	Determinação da Taxa de Decomposição da bixina	47
Tabela 6 –	Fatores responsáveis pela má definição de um pico cromatográfico	67
Tabela 7 –	Relação da pressão de equilíbrio do mercúrio com o diâmetro dos poros de um adsorvente.	76
Tabela 8 –	Relação das informações contidas nos experimentos de extração	82
Tabela 9 –	Plano de ensaio para monitoramento da hidrólise da bixina	90
Tabela 10 –	Composição das fases móveis e suas polaridades	97
Tabela 11 –	Solubilidade da bixina/norbixina em solventes orgânicos	100
Tabela 12 –	Solubilidade da bixina em solução aquosa de NaOH	101
Tabela 13 –	Solubilidade da bixina em solução aquosa de NH ₄ OH	102
Tabela 14 –	Percentual de bixina no extrato hidro-alcoólico amoniacal	103
Tabela 15 –	Percentual de bixina no extrato seco hidro-alcoólico	104
Tabela 16 –	Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração -Experimento 1	109
Tabela 17 –	Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração – Experimento 2	110
Tabela 18 –	Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração-Experimento 3	111
Tabela 19 –	Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração-Experimento 4	112
Tabela 20 –	Teores de bixina no extrato alcoólico e etéreo – Experimento 5	113

Tabela 21–	Solubilidade da bixina e derivados (metodologia II)	123
Tabela 22–	Análise do teor de bixina recristalizada em acetona	124
Tabela 23–	Coefficiente de absorvidade da bixina em etanol	125
Tabela 24–	Valores de absorvância das amostras provenientes dos ciclos de extração do experimento 3	127
Tabela 25–	Valores de absorvância das soluções empregadas para determinação do coeficiente de absorvidade	127
Tabela 26–	Bandas de absorção e valores de absorvância de amostras acompanhadas sob efeito de aeração.	131
Tabela 27–	Acompanhamento da absorvância das soluções com tempo de estocagem	132
Tabela 28–	Concentração dos padrões em função do tempo de estocagem	134
Tabela 29–	Valores máximos de absorvância apresentados pelas amostras sob monitoramento de hidrólise	139
Tabela 30–	Comparação dos Volumes de coluna entre colunas de diferentes seções	142
Tabela 31–	Velocidade dos picos cis e trans em função da polaridade	146
Tabela 32–	Fator de retardo e fator de capacidade	147
Tabela 33–	Volumes de coluna e valores de Rf para a trans-bixina em função de diferentes polaridades	149
Tabela 34–	Número de pratos teóricos	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura básica dos carotenóides.	15
Figura 2 –	Últimos estágios da biosíntese de carotenóides e suas possíveis transformações.	17
Figura 3 –	Degradação oxidativa do β caroteno (cisão oxidativa)	20
Figura 4 –	Provável rota deformação da crocina via cisão oxidativa da molécula da zeaxantina	21
Figura 5 –	Rota de biosíntese do licopeno - enzima carotene7,8-desnaturase.	22
Figura 6 –	Estrutura dos carotenóides bixina e norbixina, cis e trans e do principal produto de degradação.	24
Figura 7 –	Rota proposta da biosíntese da bixina a partir do licopeno.	27
Figura 8 –	Fotos de urucum: A: fruto verde; B: cachopa com frutos maduros; C: em floração; D: fruto aberto com sementes expostas.	31
Figura 9 –	Degradação térmica da 9'cis-bixina.	46
Figura 10 –	Isotermas: (a) Langmuir, (b) anti-langmuir e (c) e (d) os cromatogramas relacionados.	66
Figura 11 –	Pico cromatográfico típico.	69
Figura 12 –	Cromatograma com banda adjacente	69
Figura 13 –	Pico cromatográfico assimétrico	69
Figura 14 –	Esquema representativo de um poro	76
Figura 15 –	Conjunto para coleta de amostra volátil	89
Figura 16 –	Conjunto para filtração sob pressão.	91
Figura 17 –	Disposição esquemática do conjunto para cromatografia preparativa flash	92
Figura 18 –	Válvula de restrição	92
Figura 19 –	Solubilidade da bixina e norbixina em diferentes solventes orgânicos	100
Figura 20 –	Curva de solubilidade da bixina em solução aquosa de hidróxido de sódio.	101

Figura 21 –	Solubilidade da bixina em solução aquosa de NH_4OH .	102
Figura 22 –	Percentual de bixina no extrato hidro-alcoólico	103
Figura 23 –	Percentual de bixina no extrato seco hidro-alcoólico	104
Figura 24 –	Evolução da concentração de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - Experimento 1	109
Figura 25 –	Evolução da concentração de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - experimento 2.	110
Figura 26 –	Evolução da concentração de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - Experimento 3.	111
Figura 27 –	Evolução das concentrações de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - Experimento 4.	112
Figura 28 –	Reações da bixina e provável estrutura do sal amoniacal	116
Figura 29 –	Espectro no bixina no infravermelho	118
Figura 30 –	Espectro do derivado cálcico no infravermelho	118
Figura 31 –	Espectro do derivado amoniacal no infravermelho	119
Figura 32 –	Fluxograma de extração, pré-purificação e cristalização de bixina obtida de urucum	122
Figura 33 –	Espectros de absorção de bixina em clorofórmio	128
Figura 34 –	Espectro de absorção da bixina em solução de hidróxido de sódio	129
Figura 35 –	Evolução da hidrólise da bixina em solução de NaOH 0,02N	136
Figura 36 –	Evolução da hidrólise da bixina em solução de NaOH 0,1N	137
Figura 37 –	Evolução da hidrólise da bixina em solução de NaOH 0,5N	137
Figura 38 –	Retenção da bixina em placa de TLC em função da polaridade da fase móvel.	141
Figura 39 –	Perfil de deslocamento de um pico de elevada retenção	145
Figura 40 –	Velocidade do pico em função da polaridade do eluente	148
Figura 41 –	Volumes de coluna x índice de polaridade da fase móvel para eluição da trans bixina	150

SIMBOLOGIA

Letras latinas

A	área do pico cromatográfico (cm^2)
$^{\circ}\text{A}$	angstrom (cm^{-8})
A_s	área superficial do adsorvente ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)
C_s	concentração do soluto na fase sólida
C_m	concentração do soluto na fase móvel ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)
CV	volume de coluna (adimensional)
C	concentração na fase móvel ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
cP	centipoise ($\text{kg}/\text{m} \cdot \text{s}$)
d_p	diâmetro médio de partículas (cm)
D_m	coeficiente de difusão do soluto na fase móvel ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
d_c	diâmetro da coluna (cm)
E°	potencial de redução (v)
F_c	fluxo em uma coluna cromatográfica ($\text{g}/\text{cm}^{-3} \cdot \text{s}$)
f	fator de forma das partículas no empacotamento
G_y	(gray) $1\text{gy} = 100 \text{ rad J/kg}$
h	altura do prato reduzido (cm)
H	altura equivalente do prato teórico (cm)
ΔH	Entalpia de adsorção ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
K	grau Kelvin
K_A	constante de equilíbrio de adsorção
K_d	fração de volume de poros em um empacotamento
k_i	constante de equilíbrio entre fases
L	comprimento da coluna cromatográfica (cm)
mmol	milemol
N	número de pratos teóricos

n_s	fração molecular na fase estacionária
n_m	fração molecular na fase móvel
P	permeabilidade na coluna cromatográfica
p_r	pressão reduzida
P_i	índice de polaridade
P''	parâmetro de polaridade do solvente
pH	potencial hidrogeniônico
q	quantidade de adsorbato na fase adsorvida ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$)
R	retenção cromatográfica
R	raio (cm)
®	marca registrada
R_f	fator de retenção cromatográfico
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
t	tempo (s)
u_i	componente de velocidade ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)
V_s	volume da fase sólida (mL)
V_m	volume da fase móvel (mL)
V_e	volume de eluição em um empacotamento (mL)
v	velocidade reduzida ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)
V	volts
x_i	fração molar na fase sólida
y_i	fração molar na fase líquida
W_i	largura da banda cromatográfica (cm)

Letras gregas

ϕ_i	fração volumétrica
λ	comprimento de onda (cm)
μ	prefixo (micro)
f	Prefixo (femto)

Abreviações

ATP	Adenosin Triphosphate
BDDT	Brunauer- Deming-Deming-Teller
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BHA	Butil hidroxianisol
CAS	Chemical Abstract Service
CI	Color Index
CACEX	Carteira de Comercio Exterior
DNA	Desoxiribonucleic acid
EEC	Economic European Community
EC	Electrochemical array detection
FAO	Food and Agriculture Organization
GC- MS	Gas Chromatography – mass spectrometry
FDA	Food and Drug Administration
HDL	High Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
LSERs	Linear Solvation Relationship
NIST	National Institute of Standard and Technology
OMS	Organização Mundial de Saúde
SST	Triangle Solubility Solvent
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
TLS	Thermal lens spectroscopy
WHO	World Health Organization

RESUMO

Técnicas cromatográficas são freqüentemente empregadas em processos de separação de misturas complexas, sendo por isso essenciais em química fina e também para o isolamento e identificação de compostos naturais, em particular quando as substâncias de interesse apresentam reduzida estabilidade. O perfeito domínio dos fenômenos de adsorção envolvidos, associado às condições não agressivas do processo, permite isolar e purificar compostos de elevado valor agregado, sendo por isso, de grande aplicação na indústria farmacêutica como também em processos biotecnológicos. Neste trabalho foi estudado o isolamento da bixina proveniente de sementes de urucum empregando-se coluna preparativa flash com fase normal. Pela variação de parâmetros de polaridade da fase móvel, a técnica de separação por cromatografia preparativa flash mostrou-se eficaz, possibilitando inclusive a separação das duas formas isômeras da bixina. O desenvolvimento desta pesquisa compreendeu também a determinação da solubilidade da bixina em diferentes solventes, assim como a avaliação das melhores condições de armazenamento para conservação de um padrão de bixina, tendo em vista a reduzida estabilidade apresentada por esta substância. O estudo envolveu ainda o desenvolvimento e otimização de um processo de extração, separação e purificação da bixina obtida. O processo desenvolvido resultou em uma nova rota para produção de concentrado de bixina, viável, comparada às tradicionais formas de extração, por permitir a obtenção de maiores quantidades de extrato com menor consumo de solvente. Procedimentos analíticos existentes foram reavaliados e modificados, com base na identificação dos principais problemas detectados. Neste sentido, verificou-se também a técnica que melhor atendia os requisitos de confiabilidade.

ABSTRACT

Chromatographic techniques are frequently applied to complex mixture separation process, this way are essential at fine chemical and also to natural compound identification and isolation, mainly when the target substance presents reduced stability. The perfect knowledge of adsorption phenomena involved in the process, associated to non aggressive conditions usually applied, allow to isolate and purify valuable compounds, therefore with wide application in the pharmaceutical industry as well as biotechnological process. In this work, it was studied the bixin isolation from annatto seeds using a preparative flash column with normal phase. The technique using flash preparative chromatography has shown to be efficient by changing the parameters of polarity in the mobile phase, making possible to separate the two isomers form of bixin. The development of this work also comprised the solubility determination of bixin in different solvents as well as the evaluation of the best storage conditions for a bixin standard, due to the bixin reduced stability. This work also involved the development and optimization of an extraction separation and purification process for bixin. The developed process resulted in a viable new route for the production of a bixin concentrate, compared to the traditional extraction processes because the new process yields bigger amounts of extracts with less use of solvents Actual analytical procedures were evaluated and modified based on the identification of the main problems that were detected. This way, it was also verified the technique that best suit confiability requirements.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A facilidade de padronização dos corantes sintéticos, associada ainda à sua grande disponibilidade muito contribuiu para sua expansão. No entanto, na década de 70 foi constatado que estes se apresentavam como potenciais causadores de doenças degenerativas como câncer, deformações teratogênicas e males associados ao coração entre outros.

A crescente divulgação quanto aos efeitos nocivos dos corantes sintéticos tem contribuído para a sua substituição por produtos naturais. Em 1990, a Food and Drugs Administration (FDA) proibiu a utilização de alguns corantes sintéticos nos Estados Unidos. Também na Europa houve restrição ao uso de corantes artificiais.

Os constantes avanços da ciência têm trazido benefícios diretos ao aumento da expectativa de vida do ser humano. Dentro deste contexto o desenvolvimento de equipamentos que permitem diagnósticos mais precisos como também o surgimento de novos fármacos tem colaborado de forma decisiva para esta conquista. Nos procedimentos empregados pela medicina, sejam preventivos, profiláticos ou cirúrgicos, frequentemente estão presentes fármacos, e um grande número destes tem origem em uma matriz vegetal.

A diversidade vegetal brasileira desperta interesse da comunidade internacional, face às perspectivas econômicas que representam. Segundo Garcia et al. (1994), mais de 365 000 espécies de plantas já foram catalogadas em todo o mundo e isto corresponde a 60 % das existentes. Destas, apenas 1100 espécies foram estudadas em termos de compostos bioativos e identificadas propriedades medicinais. Estima-se que o Brasil possui cerca de 60000 espécies de plantas. Segundo os autores supõe-se que mais de 70 % dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento popular. Dados etnobotânicos de plantas medicinais da Amazônia, por exemplo, revelam mais de 300 espécies de plantas catalogadas.

São muitas as espécies vegetais que apresentam propriedades antibióticas, anti-tumorais, anestésicas e antioxidantes exploradas pelas indústrias farmacêuticas.

O comércio mundial de medicamentos atinge cifras bilionárias (próximo de meio trilhão de dólares/ano). Em 2002, segundo Neves et al. (2003) foram 406 bilhões de dólares assim distribuídos: 42 % na América do Norte, 27 % na Europa, 11 % no Japão, 3 % na África, Ásia e Oriente Médio e 7 % na América Latina. Naquele ano, o faturamento do setor no Brasil foi de 4,1 bilhão de dólares.

Segundo Garcia et al. (1994) estimativas da Organização Mundial de Saúde, apontam que mais de 25 000 espécies de plantas são conhecidas no mundo das quais são extraídos remédios fitoterápicos. Ainda, de todos os medicamentos existentes no mercado mundial quase 40 % provêm de fontes biológicas, deste percentual 60 % obtido de plantas.

Segundo Cughlin (1993), um quarto de todos os produtos farmacêuticos comercializados nos Estados Unidos provêm de plantas, tendo sido os produtos naturais as principais matérias primas empregadas na produção de medicamentos usados até a metade do século. Segundo Veash (2000), de 150 drogas prescritas nos Estados Unidos 118 são derivados de plantas e animais e, em média para cada 125 espécies de plantas pesquisadas, uma nova droga tem sido produzida. Por outro lado, quando a busca se faz por compostos químicos sintéticos a proporção passa de 10000 para uma.

Conservantes e corantes estão cada vez mais presentes nos alimentos que consumimos. Os produtos naturais têm apresentado uma demanda crescente não só na conservação de alimentos como também na indústria de cosméticos. Muitos são os corantes, antioxidantes e óleos essenciais hoje consumidos nesse nicho de mercado.

O emprego de corantes naturais em substituição aos artificiais por diversos setores da indústria tem gerado um crescente interesse pelos produtos provenientes do urucum. Os métodos rudimentares freqüentemente aplicados para obtenção destes produtos tendem a ser substituídos por processos mais elaborados visando, não só a reduzir os custos de processamento, mas também para agregar valor ao pigmento. Estes corantes apresentam problemas de instabilidade resultante da própria estrutura dos carotenóides, (Mc Keown, 1962), exigindo cuidados especiais durante as fases de processamento.

A indústria alimentícia pelo seu elevado volume de produção é responsável por grande parte desta demanda. Por outro lado, a indústria de cosméticos, com seus distintos segmentos: perfumes, produtos para cabelo; maquiagem; cosméticos dermatológicos; corporais e faciais é um outro grande mercado consumidor de produtos naturais.

O urucum figura como uma das principais fontes de corantes naturais utilizados mundialmente. Na indústria de alimentos é aplicado como corante em derivados lácteos, embutidos, doces, licores, sorvetes e margarinas. Os corantes obtidos do urucum apresentam versatilidade, estando disponíveis tanto na forma lipossolúvel quanto hidrossolúvel. Sendo assim, têm um amplo espectro de aplicação. Outros ramos industriais que também fazem uso de suas propriedades tintoriais são: a indústria têxtil e a de tintas e vernizes.

O Brasil situa-se como o segundo produtor de urucum, seguido pelo Quênia, sendo o Peru, o maior produtor e exportador.

A bixina, um carotenóide de cor vermelha, é o pigmento presente em maior concentração no arilo da semente do urucum, sendo a principal substância responsável pelas características tintoriais dos corantes obtidos daquela semente. Na semente bruta sua concentração pode chegar até 5,0%. Contudo diferentes variedades de sementes apresentam teores às vezes inferiores a 2,0 %. O valor comercial da semente é baseado no percentual de bixina. Teores mínimos de 2,5% são normalmente exigidos para exportação.

Os compostos de urucum sofrem grande interferência das condições de processo estando susceptíveis à decomposição provocada pelo calor, luz e oxidação, como também potencializada por determinados solventes. Uma vez isolada da semente, a bixina torna-se muito vulnerável à degradação.

As técnicas de extração em sua maioria visam à produção de um concentrado bruto, no qual a bixina, maior responsável pela cor, encontra-se em baixa concentração. A otimização de um processo de extração é de fundamental importância e visa não só aumentar o rendimento como também minimizar a contaminação com subprodutos de decomposição. Pesquisas da cinética de oxidação da bixina e seus isômeros, a otimização das condições de processamento do pigmento do urucum em diferentes temperaturas e concentração de álcali, como também a influência do teor de água na redução da estabilidade têm sido realizadas.

Os processos atuais em uso no Brasil destinados ao processamento da semente de urucum baseiam-se na extração mecânica e/ou empregando solventes como: óleos vegetais, para a produção de extratos lipossolúveis; solução alcalina, para o extrato hidrossolúvel ou ainda os solventes orgânicos como: acetona, etanol, hexano, propilenoglicol ou clorofórmio. Alguns dos extratos obtidos com estes solventes são normalmente processados na forma de pasta ou em pó, após a eliminação do solvente. Em todos os casos trata-se de produto onde a

bixina encontra-se misturada a outros componentes extraídos da semente, resultando em um produto de baixo valor agregado.

O desenvolvimento de tecnologia que conduza não só a extração do pigmento bruto, mas principalmente que leve à obtenção de bixina de elevada pureza, conjugada a sua estabilização é de fundamental importância para agregar valor ao produto. Disponibilizar no mercado bixina de elevada pureza significa maior competitividade, e certeza de expansão comercial ao atender aos segmentos de maior tecnologia, como as indústrias farmacêuticas.

A comprovada ação antioxidante de alguns carotenóides tem intensificado o número de pesquisas no sentido, não só de obter produtos derivados que possam ter suas propriedades potencializadas, mas também a busca de alternativas para ampliar sua produção. Experimentos efetuados com a associação por simples mistura de ácido ascórbico e outros compostos antioxidantes, tocoferol, por exemplo, têm sido realizados, indicando efeito potencializado na inibição dos processos de auto-oxidação lipídica.

A síntese de derivados semi-sintéticos da bixina vem sendo pesquisada, com vistas a oferecer ao mercado uma nova geração de antioxidantes mais eficazes, como também fármacos, destinados a aplicações específicas, como por exemplo, na composição de drogas antitumorais, fotoprotetoras entre outras.

A busca por compostos naturais para aplicação no tratamento de doenças degenerativas como o câncer tem despertado a atenção de muitos pesquisadores. Alguns fitoterápicos têm sido empregados como agente fotoprotetores em tratamentos radioterápicos devido as suas propriedades antioxidantes. A bixina figura em algumas pesquisas relacionadas a aplicações farmacológicas por apresentar um grande potencial antioxidante.

Através do desenvolvimento do presente projeto serão determinados parâmetros de solubilidade da bixina e norbixina em diferentes solventes, assim como as fases do processo que permitirão a melhor separação da bixina via cromatografia. Estes resultados permitirão embasamento de novas tecnologias. A importância do desenvolvimento tecnológico neste setor possibilitaria para o Brasil um aumento de divisas, visto que a semente exportada como produto agrícola tem um valor comercial muito baixo e a bixina purificada tem elevada cotação no mercado internacional. Considerando ainda que o país é o terceiro exportador mundial da semente “in natura”, a oferta de produto tecnologicamente processado poderia aumentar sua competitividade comercial.

A técnica de separação a ser adotada, separação por cromatografia flash, envolverá ajustes dos parâmetros operacionais, trazendo em consequência melhor entendimento dos fenômenos nela envolvidos.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo e desenvolvimento de um processo para a obtenção de bixina com elevada pureza, a partir de semente de urucum, como também determinar as melhores condições de controle para sua otimização.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que o Objetivo Geral fosse atingido, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

Avaliar a influência do óleo presente na semente sobre o processo de purificação da bixina;

Determinar um processo de pré-tratamento da semente com o objetivo de otimizar a extração do pigmento, e que favorecesse a obtenção de concentrado adequado aos processos posteriores de purificação e emprego da bixina;

Avaliar a solubilidade da bixina em diferentes solventes;

Adequar o processo analítico para determinação de pequenas quantidades de bixina;

Preparar um padrão de bixina para referência nos procedimentos analíticos;

Obter por recristalização bixina purificada para ser usada como referência no monitoramento das frações obtidas nos processos de separação;

Avaliar os parâmetros de eluição na coluna preparativa para isolamento e purificação de bixina proveniente de um concentrado enriquecido de bixina;

O presente trabalho está dividido em mais seis capítulos, além deste conforme descrito a seguir:

Capítulo 2- Revisão Bibliográfica.

Neste capítulo são abordados aspectos relacionados aos corantes, suas principais aplicações, caracterização dos principais compostos do urucum, técnicas de extração e separação da bixina contida no pigmento, assim como aspectos analíticos e também, aqueles voltados à adsorção e cromatografia, como conceitos e fundamentos pertinentes a esta técnica.

Capítulo 3- Material e Métodos

São descritos neste capítulo os procedimentos operacionais, a metodologia analítica empregada para o monitoramento dos experimentos, como também aqueles constantes na literatura. Considerações iniciais antecedem a descrição de algumas metodologias, no sentido de mostrar os motivos que levaram a elaboração de alguns ensaios realizados.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão.

Aqui serão relatados os resultados obtidos e que servirão de base para dar continuidade a futuros trabalhos. Ao final dos ensaios individuais, ou conjunto de resultados são discutidos aspectos relacionados às observações obtidas dos experimentos.

Capítulo 5 - Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Neste capítulo serão apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 6 - Bibliografia

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ADITIVOS NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES.

A incorporação de substâncias como aromatizantes, antiespumantes, antioxidantes, flavorizantes e espessantes na composição de formulações industriais é freqüente em muitos processos produtivos. Existe atualmente nas indústrias de alimentos uma forte tendência pela substituição de corantes e aditivos sintéticos por produtos naturais, por serem estes considerados seguros e menos susceptíveis a efeitos adversos como alergias e ocorrência de danos à saúde. Os corantes obtidos do urucum destacam-se neste cenário por apresentarem um amplo espectro de aplicação. Neste trabalho, a revisão da literatura enfocou particularmente duas grandes frentes, pela sua importância e especificidade. Na primeira, as aplicações na área da indústria de alimentos, principalmente como corantes e mais recentemente pelo seu potencial como antioxidantes. Na segunda, as aplicações médico-farmacêuticas da bixina fazendo uso do seu poder antioxidante no tratamento de enfermidades causadas pela ação de substâncias oxidantes próprias do metabolismo ou externas a este. A seguir é apresentada uma breve revisão bibliográfica nestas duas frentes.

2.1.1 PESQUISAS NA ÁREA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

A fabricação e o preparo de alimentos têm se modificado muito ao longo dos anos, particularmente nas últimas três décadas. No passado, os alimentos provinham da região onde eram produzidos ou de regiões muito próximas. Atualmente muitos alimentos produzidos em regiões longínquas necessitam freqüentemente de aditivos para manter a sua qualidade. Além disso, a variedade e a apresentação dos alimentos são preocupações constantes das indústrias alimentícias. Estes fatores têm motivado as indústrias de alimentos a utilizarem quase que exclusivamente agentes químicos para conservar, colorir ou aromatizar os alimentos, com objetivo de atrair cada vez mais os consumidores (Antunes e Araújo, 2000).

Depois da segunda guerra mundial, com o surgimento dos derivados sintéticos, um grande número de corantes obtidos de fontes naturais foi substituído. Da mesma forma, o

emprego de conservantes e aromatizantes sintéticos apresentou um grande crescimento. Diferente dos corantes naturais, seus sucedâneos sintéticos possibilitam fácil padronização, associado ainda a uma maior disponibilidade. Entretanto, a utilização de corantes artificiais nos alimentos tem sido questionada, especialmente pelo uso de compostos derivados de petróleo (Da Silva et al., 1987; Rosalen et al., 1991). Na década de 70 pesquisas constataram que muitos dos corantes sintéticos empregados na indústria apresentavam-se como potenciais causadores de doenças degenerativas como câncer (Sandi et al., 2003).

A crescente divulgação quanto aos efeitos nocivos destes corantes tem contribuído para a substituição por produtos naturais. Em 1990, o FDA proibiu o emprego de alguns daqueles corantes nos Estados Unidos, por exemplo, o corante Red Dye n° 3. Restrições similares também foram impostas na Europa, proibindo-se o uso para o consumo humano (Sandi et al., 2003; Robbins, 1995). Esta mudança por parte de órgãos governamentais muito tem contribuído para o retorno e conseqüente aumento da demanda dos produtos naturais.

Os produtos naturais por serem constituídos de uma mistura de numerosos compostos de estrutura complexa são freqüentemente mais caros, isto porque requerem etapas de concentração e purificação normalmente mais elaboradas,. Outro aspecto que também contribui para seu elevado valor deve-se a reduzida concentração normalmente presente na sua matriz de origem, o que acarreta seu elevado preço.

Uso como corante.

Os principais corantes naturais de aplicação na indústria de alimentos são: os carotenóides, as antocianinas, a clorofila, a riboflavina, as betalaínas e os caramelos. Outro grande grupo de corantes que tem se destacado devido aos benefícios que trazem a saúde, face à comprovada ação antioxidante que apresentam são os flavonóides. Deste grupo, as antocianinas existem em uma ampla variedade de cores, seja; em tons de azul, magenta e púrpura, ou ainda tonalidades que vão do vermelho ao amarelo. Já foram, identificadas mais de 250 diferentes antocianinas. Contudo, apenas um pequeno número delas são usadas como aditivos em alimentos. São normalmente corantes cuja cor é bastante influenciada pelo pH.

Diferentemente das antocianinas, nas betacianinas e betaxantinas a cor é estável numa faixa de pH de 4,0 a 7,0. As primeiras são vermelhas enquanto as últimas amarelas. A betalaína extraída da beterraba, por outro lado apresenta-se como uma outra classe de corante natural, a qual é sensível ao oxigênio e a luz (Kuntz, 1998).

Emprego como conservante.

A associação de carotenóides com outros compostos antioxidantes tem-se mostrado eficaz na conservação de óleos ou emulsões. Haila et al.(1996); Gordon e Sotirios (2003) pesquisaram o efeito de diversas associações de tocoferóis e carotenos concluindo que a combinação de luteína e gama tocotrienol foi mais eficaz que o emprego isolado de gama tocoferol na inibição da formação de hidroperóxido no processo de auto-oxidação de triglicérides. Da mesma forma a associação da bixina com o referido tocol mostrou-se igualmente eficaz.

Gordon e Sotirios (2003) pesquisaram as propriedades antioxidantes de alguns carotenóides e o sinergismo destes compostos com outros antioxidantes na conservação de óleos comestíveis e suas emulsões. Observaram que a norbixina associada ao α e δ tocoferol aumentou a ação antioxidante destes tocóis na conservação do óleo de oliva. Sugerem ainda, que a presença do grupo carboxílico na molécula da norbixina pode contribuir para retardar a auto-oxidação ao complexar íons metálicos pró-oxidantes ou outras espécies de iniciadores polares. Também, que os carotenóides que contêm oxigênio como grupo polar são melhores antioxidantes que aqueles hidrofóbicos.

2.1.2 PESQUISAS NA ÁREA DA SAÚDE (MÉDICO-FARMACÊUTICA)

Oxidação e o metabolismo celular.

Os organismos aeróbios empregam o oxigênio para geração de energia em seus diversos metabolismos. O processo bioquímico de produção de energia no interior da célula ocorre via oxi-redução. Cerca de 95 a 98 % do oxigênio absorvido pelo processo de respiração é usado para produzir energia (ATP), porém 2 a 5% tornam-se radicais livres como os superóxidos ou peróxidos, decorrente da redução incompleta do oxigênio.

Em condições saudáveis a natureza dotou o organismo humano com um enorme potencial antioxidante por meio de várias enzimas e vitaminas. Um desequilíbrio a favor dos oxidantes em relação aos antioxidantes conduz ao stress oxidativo.

Entre os antioxidantes presentes no plasma sanguíneo, a bilirrubina, os ácidos úrico e ascórbico são considerados os principais, além da ação de proteínas como a albumina. A bilirrubina, antioxidante muito eficaz especialmente na membrana celular, consome dois

radicais hidroperóxidos sendo oxidada a biliverdina que posteriormente é reduzida regenerando bilirrubina. Contudo, quando ligada à albumina, a bilirrubina é cerca de dez vezes menos eficiente que a vitamina C, esta, muito eficaz no bloqueio de peróxidos hidrossolúveis. A albumina se destaca pela sua capacidade de ligar-se aos íons do cobre prevenindo a peroxidação lipídica como também protege importantes estruturas como os grupos sulfídricos de membranas das células endoteliais e eritrócitos.

O ácido úrico produzido no catabolismo das purinas elimina os radicais superóxidos como também intermediários oxigenados do hemo com alto estado de valência do ferro e adicionalmente prevenindo a oxidação do ácido ascórbico. Segundo Aguilar Silva et al. (2002), diferentes mecanismos de defesa estão presentes nos distintos organismos vivos,

Antioxidantes no combate ao stress oxidativo.

Vários estudos têm sido realizados no sentido de avaliar o potencial protetor de compostos antioxidantes relacionados aos efeitos nocivos da oxidação. Durante os processos bioquímicos, espécies reativas de oxigênio e outros radicais com alta energia são às vezes formados. Estes, uma vez presentes, podem interagir com vários constituintes das células, incluindo lipídios, carboidratos, proteínas e DNA, causando a perda de suas funções específicas na célula.

Fontes externas de radicais livres e fatores ambientais podem também iniciar um processo de stress oxidativo sobre as células e tecidos humanos. Dentre estes fatores podem ser citados; exposição a produtos químicos, radiações, esforço e poluentes. As células possuem seus próprios sistemas naturais de defesa efetuados por enzimas como a superoxi-redutase, glutaciona-peroxidase e a catalase, as quais neutralizam e destroem estes “erros” de alta energia provenientes do metabolismo oxidativo. Segundo Bast et al. (1998), os antioxidantes, entre os quais alguns carotenos, atuam de forma a combater os referidos radicais livres.

Produtos naturais como fontes de antioxidantes.

Diversos produtos naturais são reconhecidos por possuírem características antioxidantes, razão pela qual, têm sido bastante empregados seja na conservação de alimentos ou na formulação de fármacos. Já há mais de 50 anos, substâncias antioxidantes têm despertado interesse pelo seu potencial em reduzir os danos celulares causados por

radiação ionizante. Tradicionalmente os radioprotetores são definidos como agentes administrados antes da exposição, enquanto os agentes terapêuticos são administrados após a exposição (Weiss et al., 2003).

Segundo os autores a aplicação com esta finalidade, para varias situações de exposição humana não têm sido muito explorada. Estes pesquisadores fizeram um levantamento da eficiência de diversos antioxidantes endógenos, especificamente nutrientes antioxidantes e fitoquímicos, avaliando a especificidade de cada grupo seja, no tratamento profilático durante radioterapia de câncer, ou mesmo como preventivo.

Muitos são os compostos naturais com potencial oxidante, entre eles destacam-se: polifenóis, tocotrienóis e tocoferóis (vitamina E); alguns aminoácidos, com destaque para a cisteína, primeiro antioxidante estudado em vivo como protetor contra radiação ionizante; a vitamina C, como também os flavonóides e os fitoquímicos. Ainda, dentre estes se incluem os carotenóides, do qual fazem parte a bixina, o licopeno, a astaxantina e a vitamina A, aos quais se têm dado grande enfoque nos dias atuais.

Weiss et al. (2003) fizeram um levantamento de inúmeras substâncias potencialmente antioxidantes, dentre elas encontra-se a bixina. Outras aplicações farmacológicas são citadas como, por exemplo, o emprego destas substâncias como agentes foto protetores utilizadas em tratamentos radioterápicos.

Carotenóides como antioxidantes.

Pesquisas médicas têm mostrado que a grande ingestão de vegetais está associada com a redução dos riscos de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares. Sendo os vegetais a maior fonte de carotenóides e devido ao seu potencial antioxidante, os benefícios que estes compostos trazem à dieta alimentar têm sido temas de estudo de muitos pesquisadores.

É consistente a hipótese dos benefícios associados ao consumo de vegetais e a redução dos riscos de enfermidades crônicas relacionadas à ingestão de uma dieta de carotenóides, reportam Qing et al. (2002), após examinarem diversas pesquisas.

Embora nem todos os estudos tenham mostrado evidências, muitas destas pesquisas observaram uma indireta relação entre a concentração de carotenos no plasma sanguíneo e os riscos de doenças cardiovasculares e mortalidade pelo câncer. Além disso, os autores reportam que o efeito protetor contra câncer de pulmão foi observado para um elevado consumo de tomates, alface, cenoura, margarinas e queijo.

Segundo Lima et al. (2003), o efeito antioxidante da bixina e norbixina tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio, cujo dano é causado principalmente pela lipoproteína LDL oxidada, a inibição da oxidação, resulta na proteção do endotélio.

Lima et al. (2001) induziram hiperlipidemia em coelhos, com uma dieta contendo colesterol. Acrescida a esta ração, foram testados os carotenóides bixina, norbixina e o flavonóide quercetina, todos provenientes de urucum. Após 28 dias de tratamento, foi determinada dosagem sorológica para determinação do colesterol de alta densidade o *High density lipoprotein* (HDL) e triglicerídeos. Concluíram os autores que a bixina, apresentou a maior redução de colesterol (40 %), em relação ao padrão, superior à redução obtida com a norbixina (25,35 %) e quercetina (35,07 %). Observaram ainda que a bixina apresentou a menor redução do HDL, sendo isto uma vantagem, visto que o HDL transporta o colesterol da circulação sanguínea para o fígado, onde é metabolizado.

A administração oral de bixina (200 mmol / Kg de peso) a ratos submetidos a uma radiação (1,5 a 3,0 Gy) mostrou eficácia na inibição dos efeitos causados pela radiação, não acarretando aberrações cromossômicas nas cobaias estudadas, desempenho comparável ao alfa-tocoferol já consagrado para esta finalidade. Também foram testados a curcuma e o ácido elágico (Threziamma et al., 1998).

Zhang et al. (1991) estudaram o efeito de inibição da peroxidação, avaliando alguns carotenos, entre estes, o beta-caroteno, a castaxantina, a luteína, o alfa-tocoferol, o licopeno e a bixina, constatando a eficácia na inibição dos conseqüentes efeitos de transformações neoplásticas induzidas quimicamente. De todos os carotenóides testados, o alfa tocoferol foi o mais ativo inibidor da peroxidação lipídica, seguido pela bixina.

Albanes e Hartman (1999) reportam que recentes revisões de dados epidemiológicos mostraram a existência de uma estreita relação inversa entre o consumo de frutas e vegetais

ricos em carotenóides e a incidência de casos específicos de câncer de pulmão, esôfago, estômago, colo-retal, cervical e de garganta.

2.2 ESTABILIDADE DOS CORANTES NATURAIS

Diferentemente dos corantes sintéticos, alguns corantes naturais são oxidados facilmente, potencializando assim sua ação antioxidante na mistura. Dentro deste grupo os carotenóides são extremamente reativos e conseqüentemente instáveis devido a sua longa cadeia de duplas ligações conjugadas QING et al., (2002). Fatores como luz, calor e oxigênio potencializam processos de degradação (Najar et al.,1988).

O pH também afeta a estabilidade de muitos corantes naturais, da mesma forma que a presença de determinados íons metálicos com reconhecidas características catalíticas, como ferro, alumínio, cobre ou mesmo magnésio, cuja ação catalítica é menor. Estes catalisadores podem aumentar a taxa de decomposição de alguns pigmentos, acarretando em conseqüência a perda de coloração. Os carotenóides particularmente são extremamente susceptíveis a estes efeitos (Kuntz, 1998).

A reduzida estabilidade dos produtos naturais se deve em parte à função que desempenham no metabolismo do organismo vegetal ou animal onde estão presentes. Desta forma, muitos compostos estão em constante transformação, em resposta a fatores externos como luz, calor oxigênio entre outros.

Speranza et al. (1990) estudaram a interação entre o oxigênio singlete e apocarotenóides, entre eles a bixina, norbixina e seus isômeros. Reporta a autora que este estudo é de fundamental relevância para entender os mecanismos de ação que desempenham estes compostos na fotossíntese dos carotenóides, como também no seu efeito foto-dinâmico. Este estudo foi realizado pelo monitoramento espectrofotométrico da solução de diferentes apocarotenóides, mantida a uma temperatura constante de 35° C, na presença do 3,4-(4-metil-1-naftil) ácido propiônico 1,4 endoperóxido, empregado como gerador de oxigênio singlete, alternativo à ação fotoquímica. Esta escolha foi tomada no sentido de evitar reação fotoquímica paralela, como a trans-isomerização.

2.3 CAROTENÓIDES

Os carotenóides são uma extensa classe estrutural de compostos caracterizados pela presença de uma cadeia poliênica conjugada. As variações estruturais encontram-se na extremidade da cadeia podendo apresentar anéis ou terminação poliênica. Na Figura 1 é apresentada a estrutura central poliênica, a seqüência de unidades terpenóides e algumas das mais comuns terminações de cadeia encontradas nos diversos carotenóides, Schwartz , 2003.

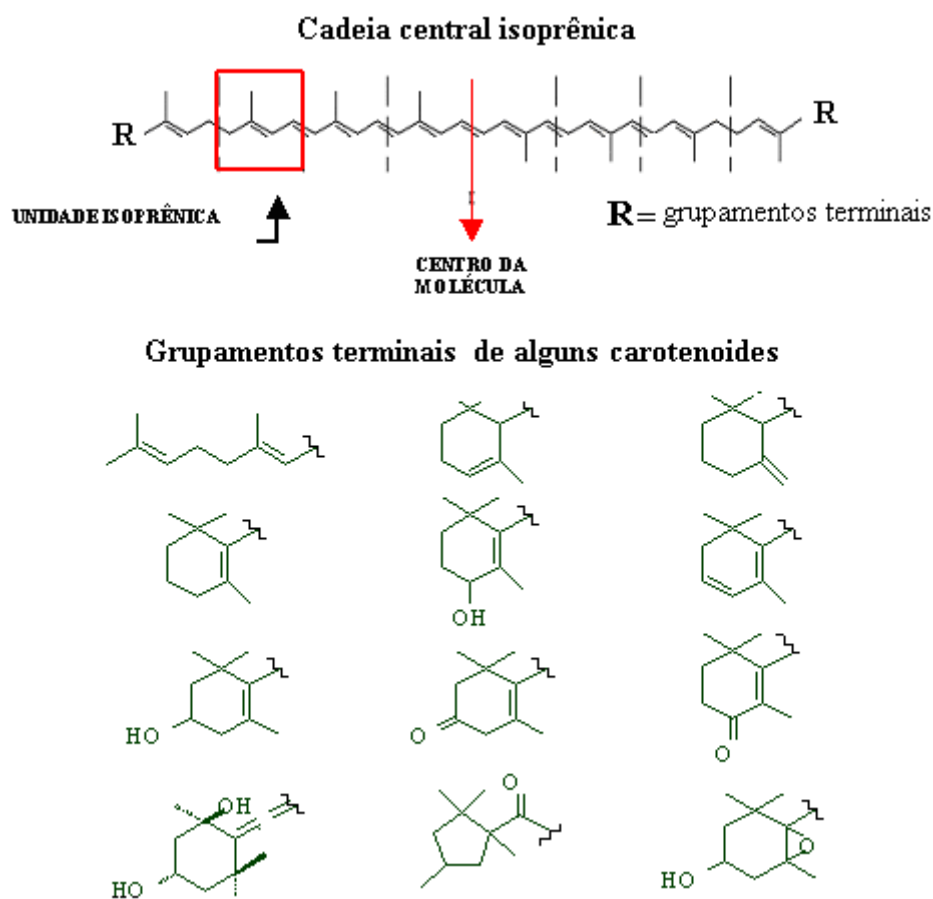


Figura 1- Estrutura básica dos carotenóides. Fonte: Schwartz ,2003.

Os carotenóides são usualmente tetraterpenóides C_{40} constituídos de oito unidades isoprenóides, C_5 , unidas. A estrutura linear básica é simétrica e pode apresentar-se com uma ou ambas as extremidades cíclicas. Nestes compostos, as unidades de isopreno, apresentam no meio da molécula, nas posições 1:6, dois grupamentos metílicos, enquanto todos os outros

grupos metílicos da cadeia lateral ocupam a posição 1:5. Ciclização e outras modificações, tais como: hidrogenação, desidrogenação, migração da dupla, redução ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de função oxigenada ou combinação destes processos dão origem a um extenso número de estruturas. Suas distintas características devem-se a presença das ligações duplas conjugadas na cadeia, que servem como absorvedores cromóforos de luz e que, atribuem a estes compostos cores que variam do amarelo ao vermelho (Rodríguez-Amaya, 2001).

2.3.1 BIOSÍNTESE DOS CAROTENÓIDES

As unidades isoprenóides formam a estrutura básica de todos os terpenóides, dos quais fazem parte os carotenóides. A associação desta matriz “monômero” leva à formação de compostos C10, C15, C20. A dimerização do composto C20 leva ao fitoeno (C40), o primeiro composto da família dos carotenos. As transformações sucessivas, como também as prováveis rotas de formação dos inúmeros carotenos encontram-se esquematicamente representadas na Figura 2, onde a reação (1) corresponde à (1) desaturação, (2) ciclização, (3) hidroxilação, (4) epoxidação, (5) rearranjo epóxido-furanóxido.

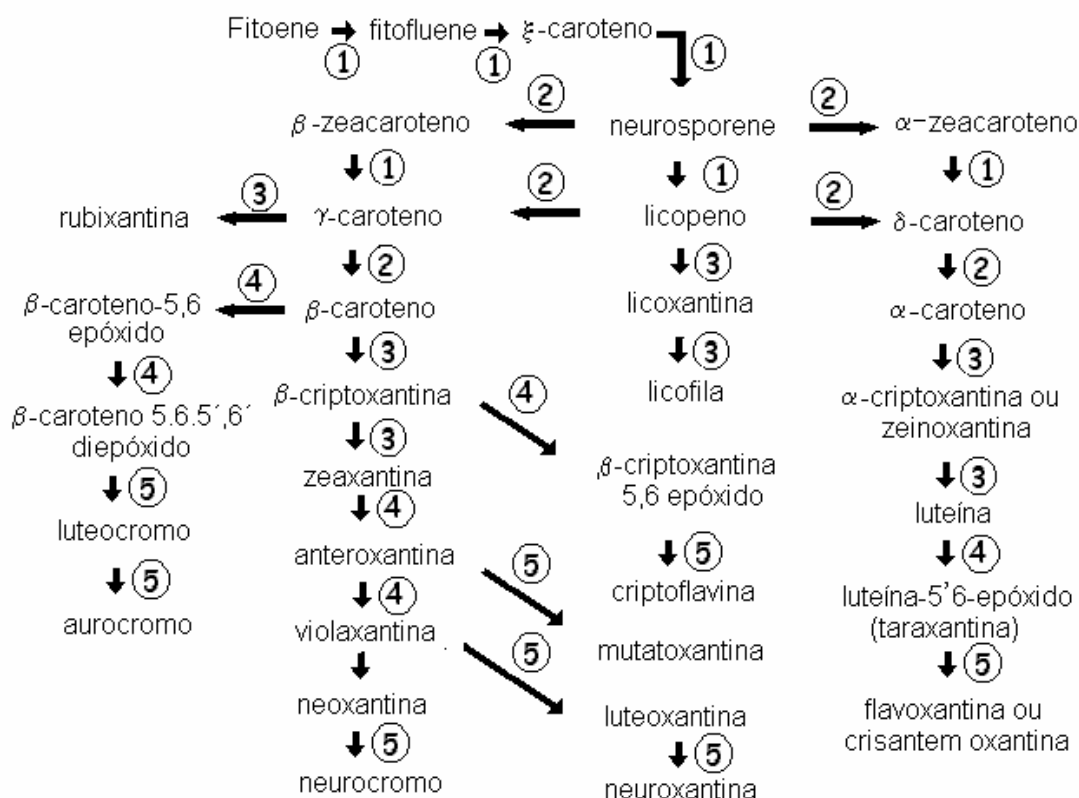


Figura 2 - Últimos estágios da biossíntese de carotenóides e suas possíveis transformações. Fonte: Rodriguez –Amaya, 2001.

2.3.2 OCORRÊNCIA DOS CAROTENÓIDES-DISTRIBUIÇÃO NA NATUREZA

Mais de 700 carotenóides já foram identificados e estão amplamente distribuídos no reino vegetal e animal. Podem conter somente carbono e hidrogênio como os carotenos e o licopeno, ou ainda oxigênio como as xantofilas, a exemplo da capsantina na páprica; a zeaxantina e a luteína do milho. Os carotenóides representam uma extensa família de produtos naturais. São encontrados nos cloroplastos das plantas fotossintéticas, nos cromoplastos das flores, frutos e folhas, como também em bactérias, fungos, algas e insetos, Chaudhry, 2003.

Como as plantas sintetizam continuamente os carotenóides, estes estão normalmente acompanhados de pequenas quantidades de alguns dos seus precursores biosintéticos, os quais ocorrem freqüentemente associados aos derivados do componente principal. A fucoxantina é o mais abundante carotenóide encontrado na natureza, pelo fato de estar presente em algas fotossintéticas encontradas em grande quantidade nos oceanos.

Embora os animais sejam incapazes de sintetizar os carotenóides, estes são normalmente encontrados em algumas espécies, como resultado de sua dieta, podendo

encontrar-se seletivamente absorvido e acumulado de forma inalterada ou levemente modificado. A astaxantina é o principal carotenóide responsável pela cor de alguns peixes como o salmão e a truta, estando presente também em crustáceos como o camarão, a lagosta e o caranguejo. Por outro lado a tunaxantina é o carotenóide que se encontra em maior quantidade nos outros peixes. Os carotenos, ecnenone e castaxantina, encontrados em menor quantidade, são provenientes de transformações intermediárias na dieta destes animais, Rodrigues-Amaya, 2001.

2.3.3 FUNÇÃO DOS CAROTENÓIDES

Os carotenóides são fundamentais na dieta dos animais. Em vários mamíferos eles participam dos processos bioquímicos a exemplo da conversão do beta caroteno em vitamina A, Fontana et al., 1997.

A presença de carotenóides nas plantas sempre despertou a atenção de pesquisadores. Karrer e Jucker, (1950) destacaram a existência de muitos estudos, entre estes a possível associação dos carotenóides com os mecanismos de respiração das plantas. As pesquisas mostravam uma constante proporção entre os carotenóides (caroteno e xantofila) e a clorofila nas folhas das plantas, suspeitando-se daí que estes atuavam como filtro para a clorofila. Nenhum resultado, entretanto, foi conclusivo neste sentido.

A atuação dos carotenos como sendo transportadores de oxigênio, também foi explorada, visto a existência de um grande número de carotenóides epóxidos presente nos tecidos celulares. Contudo, poucos resultados foram conclusivos na ocasião. Hoje é sabido que, nas plantas, os carotenóides funcionam como pigmentos absorvedores de luz, transferindo esta energia para a clorofila no mecanismo da fotossíntese. Os carotenóides também agem como filtros de radiação ultravioleta, protegendo as plantas da foto-oxidação, prevenindo as células de danos provocados pelo oxigênio singlete. Ainda, em situações de stress ou ferimentos, ou sujeitos a severa exposição à luz, estes compostos protegem as plantas de futuras infecções ou dano oxidativo (Chaudhry ,2003).

Segundo Rodrigues-Amaya (2001), a caratogenesis que ocorre nos frutos e vegetais, durante o processo de maturação é acompanhada pela decomposição da clorofila enquanto os cloroplastos são transformados em cromoplastos. A simples transformação de um cloroplasto dá lugar a um aumento expressivo na quantidade e número de carotenóides. Nas folhas verdes

ocorrem muitos carotenóides hidroxilados livres e nos frutos maduros os carotenóides encontram-se normalmente esterificados com ácidos graxos. No entanto no Kiwi, o carotenol permanece livre mesmo após a maturação do fruto (Rodrigues-Amaya, 2001).

Uma extensa relação de fontes naturais; plantas, animais, vertebrados e invertebrados e alguns carotenóides neles identificados são apresentadas por (Karrer e Jucker, 1950).

No ser humano é reportado existir uma relação inversa ao risco de câncer associado à presença na dieta, de determinados carotenos como o licopeno e β -carotenos, identificado com frequência em tecidos e órgãos como: tireóide, fígados, rins, coração, testículos, tecido adiposo e pâncreas, e que a luteína e a zeaxantina acumuladas na retina atuam fundamentalmente como fotoprotetores das células contra radicais originados do oxigênio pela ação da luz (Qing, 2002).

2.3.4 APOCAROTENÓIDES

Um grupo derivado dos carotenóides, os apocarotenóides, é oriundo da clivagem oxidativa dos carotenos. Algum destes carotenóides tem elevado valor econômico como pigmentos ou por incorporar sabor ou aroma aos alimentos. Segundo Schwartz et al. (2001) as plantas produzem um grande número destes compostos que tem entre outras prováveis funções atrair insetos. A formação dos apocarotenóides deve resultar de mecanismos não específicos tais como: co-oxidação, lipoxigenase ou foto-oxidação. Enzimas capazes de romper os carotenóides em pontos específicos da molécula estão provavelmente envolvidas na síntese de um grande número destes compostos.

Cada dupla ligação em um carotenóide é suscetível à oxidação. A cada ruptura e conseqüente oxidação de uma ligação dupla, dois novos carotenos (apocarotenóides) são gerados. A Figura 3 exemplifica a oxidação de um caroteno simétrico como o β -caroteno. Neste caso, existem nove possíveis produtos formados, como resultado do rompimento e conseqüente oxidação de uma única ligação dupla.

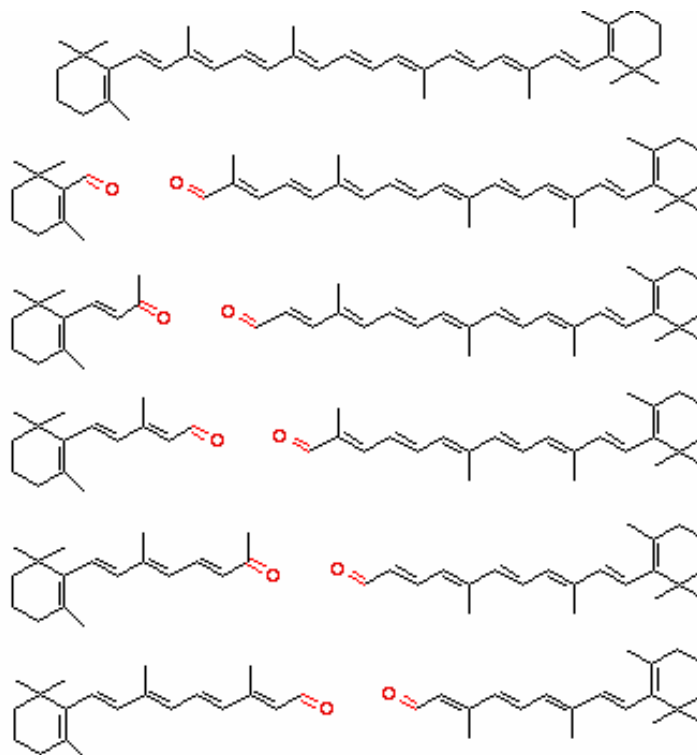


Figura 3- Degradação oxidativa do β caroteno (cisão oxidativa), Fonte: Schwartz (2003).

Outro exemplo da ruptura oxidativa citada anteriormente é apresentado na figura 4 que mostra a produção do pigmento crocina a partir da degradação da zeaxantina. A cor vermelha alaranjada característica do açafrão é devida ao apocarotenóides, crocina. Os produtos de clivagem derivados das extremidades são convertidos a picrocrocina e ao safranal (C_{10}) que são componentes importantes do sabor e do aroma do açafrão.

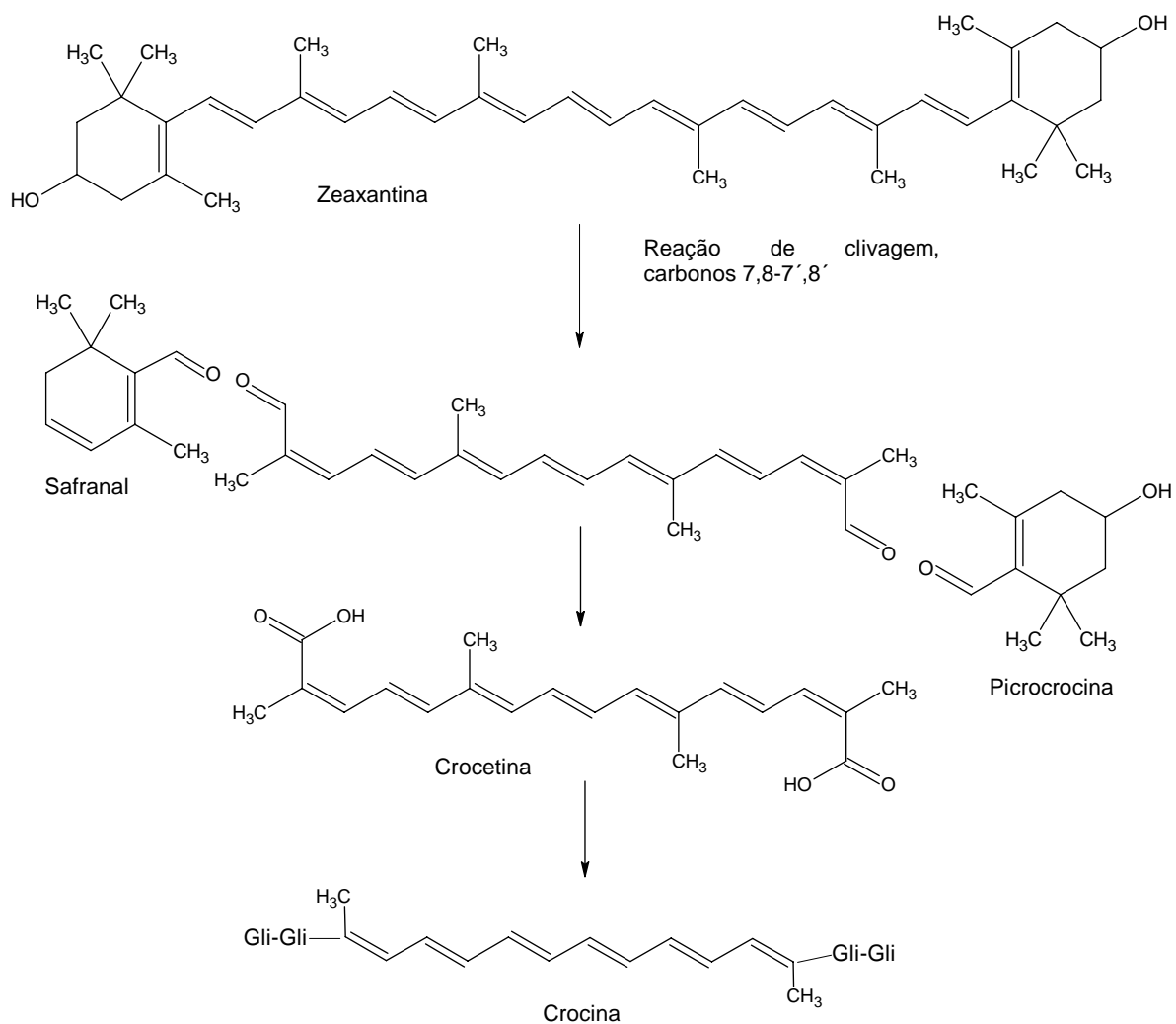


Figura 4 - Provável rota de formação da crocina via cisão oxidativa da molécula da zeaxantina, Fonte: Bouvier (2003).

Na Figura 5 é mostrada a rota de biosíntese do locopeno, precursor na biosíntese da bixina.

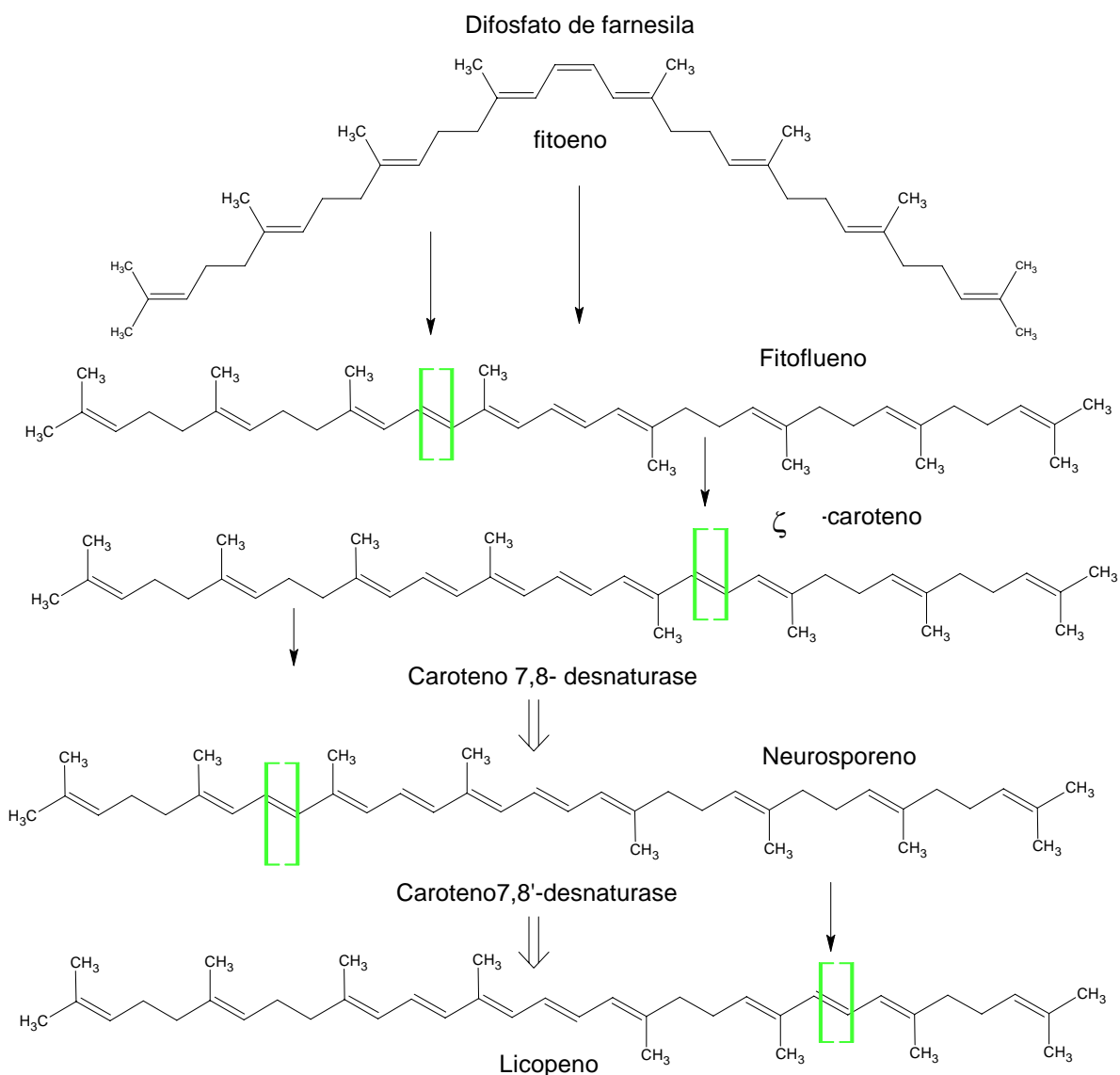


Figura 5 - Rota de biosíntese do licopeno - enzima caroteno 7, 8-desaturase.

Fonte: Schwartz (2003).

2.3.5 ISOMERIZAÇÃO

Os carotenóides devido à intensa insaturação estão sujeitos não só a oxidação, mas também à isomerização. Calor, luz, ácidos ou adsorção em superfícies ativas promovem a isomerização da forma cis, para a configuração mais estável, a forma trans. Segundo Karrer e Jucker (1950), a isomerização pode ocorrer pelo refluxo com um solvente, fusão dos cristais,

tratamento com iodo ou com ácidos ou ainda pela ação da luz. Alguns efeitos normalmente observados em decorrência da isomerização são relacionados abaixo:

- Redução da intensidade da cor;
- Aumento da solubilidade;
- Aumento do ponto de fusão (compostos cis apresentam menores pontos de fusão que os correspondentes trans);
- Menor coeficiente de absorvidade (os coeficientes de extinção molar dos compostos cis são menores que dos seus correspondentes trans);
- Os produtos de isomerização são freqüentemente caracterizados pelo aparecimento de um novo pico na região do UV;
- Deslocamento da banda de absorção (o isômero trans absorve em um comprimento de onda maior que seu precursor). Obs. Estes ensaios são citados para uma série de 18 carotenos, entre eles a Bixina em CS₂, (Karrer & Jucker, 1950). Por exemplo, a solução de bixina no referido solvente absorve nas respectivas regiões espectrais: (Trans-em 526,5 nm, e Cis-em 523,5 nm).

2.4 BIXINA

A cis-bixina (monometiléster do diácido carboxílico (norbixina) é o constituinte que ocorre em maior concentração no arilo da semente do urucum (*Bixa orellana* L.), representando cerca de 80% da bixina presente. Além do isômero cis (metil-hidrogênio 9'-cis-6,6'diapocaroteno 6,6'dioato), também está presente a forma trans, sendo este mais estável que o isômero cis. A trans isomerização acontece parcialmente quando o pigmento é submetido a processo de aquecimento (Galindo-Cuspinera, 2002).

Quando submetida à hidrólise em meio alcalino, a bixina perde uma molécula de metanol produzindo a norbixina, pigmento de cor vermelho intensa.

A bixina foi citada pela primeira vez em 1825 por BOUSSINGAULT, sua cristalização foi obtida com sucesso em 1878 por ETTI, a análise elementar e determinação de sua fórmula empírica foram realizadas em 1917 por HEIDUSCHKA E PANZER e em 1928–1933 KUHN e colaboradores prepuseram a fórmula estrutural a qual foi confirmada posteriormente por KARRER e colaboradores através da síntese total da per-hidronorbixina (Karrer e Jucker, 1950).

São poucos os carotenóides carboxílicos conhecidos. Além da bixina, foram identificados a crocetina, nas flores (estames) do açafrão (*Crocus sativus* L.), uma iridácea e a azafranina na raiz do açafrão da terra (*curcuma longa*) uma zingiberácea (Karrer e Jucker, 1950; Jaramilo, 2003). Os pigmentos extraídos destas espécies, da mesma forma como aqueles do urucum têm grande aplicação na indústria de alimentos.

Segundo Jondiko e Patteenden (1989), a bixina foi o primeiro cis carotenóide isolado a partir de fontes naturais. Fazem parte ainda da família relativamente pequena dos apocarotenóides naturais cuja formação se dá via degradação oxidativa dos carotenóides C₄₀: a crocetina, o β-apo-10'-carotenal, a β- citraurina e o ácido abscísico.

Na Figura 6 são apresentadas as estruturas moleculares da cis e trans bixina, cis e trans norbixina e o principal produto corado de decomposição (monometil éster do ácido 4, 8, dimetil tetradecahexaenedióico) frequentemente designado por C₁₇.

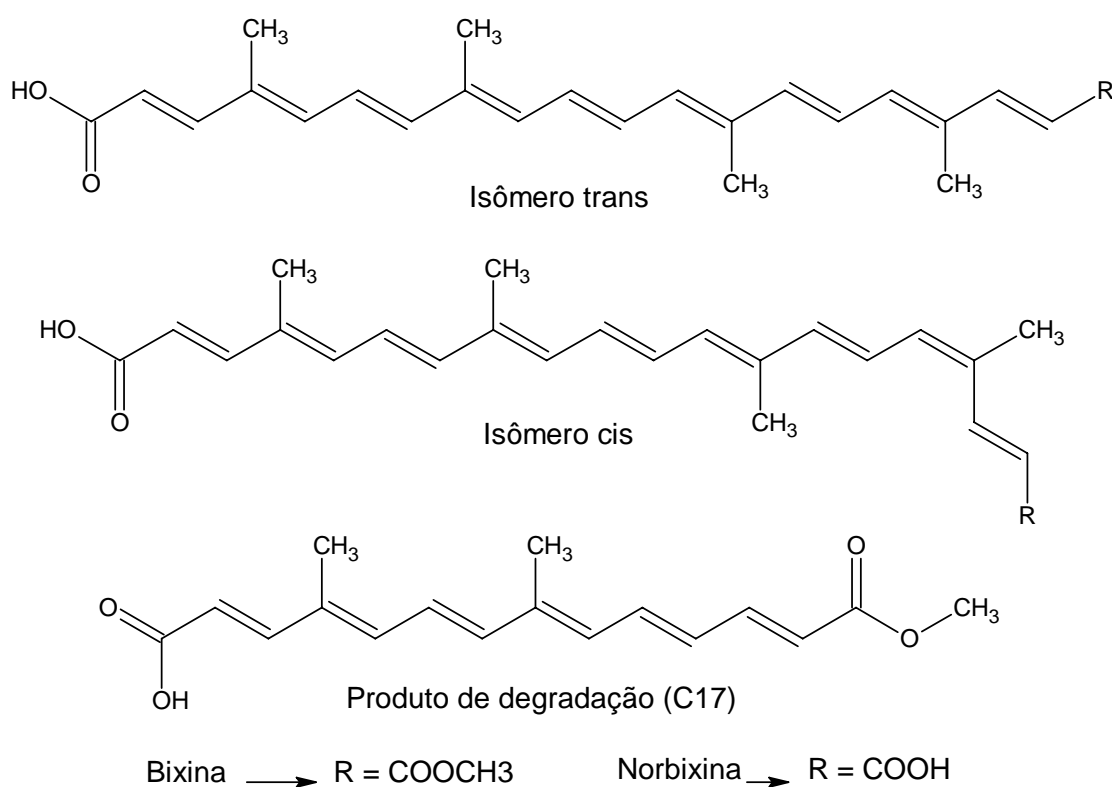


Figura 6 - Estrutura dos carotenóides bixina e norbixina, cis e trans e do principal produto de degradação. Fonte Scotter (1995).

A bixina é indexada no Color index como CI No 75120, e pela Comunidade Econômica Européia como EEC nº E160b e CI Natural Color 4. (Marmion, 1991).

Na Tabela 1 são apresentados alguns dados referentes à bixina e norbixina.

Tabela 1 - Dados e propriedades da bixina e norbixina.

	Nº CAS	PM	Fórmula empírica	Ponto de Fusão (°C)
Cis Bixina	6983-79-5	394,5	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	198 (e); 189-190,5 (c); 196.8 (b); 217 (a)
Trans bixina	39937-23-0	“		204.0-206.6 (c); 216-217(d)
Cis norbixina	626-76-6	380,5	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	240 (c) decompõe.
Trans norbixina	542-40-5	“		250 (c) decompõe
Urucum	1393-63-1	-----		

(Lewis,1993); (b) (McKeown., 1961); (c) (Reith & Gielen, 1971); (d) (Karrer & Junker, 1950); (e) (Lide, 1995); CAS Chemical Abstract Service.

2.5 ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA PARA PRODUÇÃO DE CORANTES

A biotecnologia pode ser um eficiente caminho para produção de corantes em grande quantidade. A cultura de tecidos e plantas, fermentação e manipulação genética têm sido pesquisadas com frequência com vistas à produção de pigmentos. No entanto, extensivos testes de segurança devem ser realizados antes que possam ser considerados seguros para uso em alimentos. Os tecidos de plantas têm sido muito frequentemente estudados como alternativa para a produção de pigmentos.

Carotenóides, antocianinas e betalaínas já têm sido produzidos em cultura de células de plantas, entretanto, a produção contínua aplicando-se as técnicas disponíveis atualmente parece impossível de ser colocada em prática, pois muitos dos pigmentos não são excretados pela célula, mas estocados dentro dela. Até o momento nenhum pigmento grau alimentício foi produzido em grande escala por processos envolvendo cultura de células.

Algas celulares simples e fungos são as melhores opções para novos corantes biotecnologicamente produzidos. Desenvolvimentos recentes têm sido realizados com treze carotenos via fermentação em reator, pelo fungo *Blakeslea trispora* Collins e Downham (2000). Outro exemplo desta nova vertente são os corantes monascus, vermelho e amarelo, estáveis ao calor, obtidos da fermentação de arroz pelo fungo *Monascus purpureus* e *Monascus anka*. Contudo estes corantes não são permitidos nos Estados Unidos e na Europa, pois podem conter compostos potencialmente tóxicos a exemplo da cumarina, produzida durante o processo de fermentação.

A bixina, devido ao seu crescente consumo, tem despertado interesse de pesquisadores, no sentido da busca por uma fonte alternativa para a sua produção. Embora o mecanismo de biosíntese desta substância ainda não tenha sido elucidado. É sustentado que o carotenóide C40, mais provavelmente o licopeno, seja o precursor da bixina. Com base na estrutura similar entre a bixina e a crocetina, pigmento do açafrão, a reação poderia envolver a metil transferase e a dehidrogenase em uma série de reações precedidas sequencialmente pelo licopeno. A suposta rota é sustentada pela análise de derivados de decomposição do licopeno que se encontram acumulados em traços na semente do urucum.

A recente caracterização de dioxigenases de plantas que atuam na ruptura de cromóforos carotenóides tem reforçado a hipótese da referida biosíntese. Já existem pesquisas bem avançadas que conduzem à produção de bixina via manipulação genética. Câmara et al. (2003) identificaram no vegetal três genes responsáveis pela produção de bixina. Devido à maior facilidade de manipulação genética em organismos inferiores, foi testada a inserção simultânea dos três genes em uma bactéria (*E. coli*), geneticamente modificada, para produzir licopeno. O êxito alcançado determinou o passo seguinte, conseguir reproduzir esta rota de biosíntese em outro organismo. Sendo o tomate uma fonte rica em licopeno, a rota proposta considera a inserção de cada um daqueles genes em distintos tomateiros. Posteriormente, através do cruzamento destas plantas poder-se-ia gerar novos tomateiros produtores de bixina.

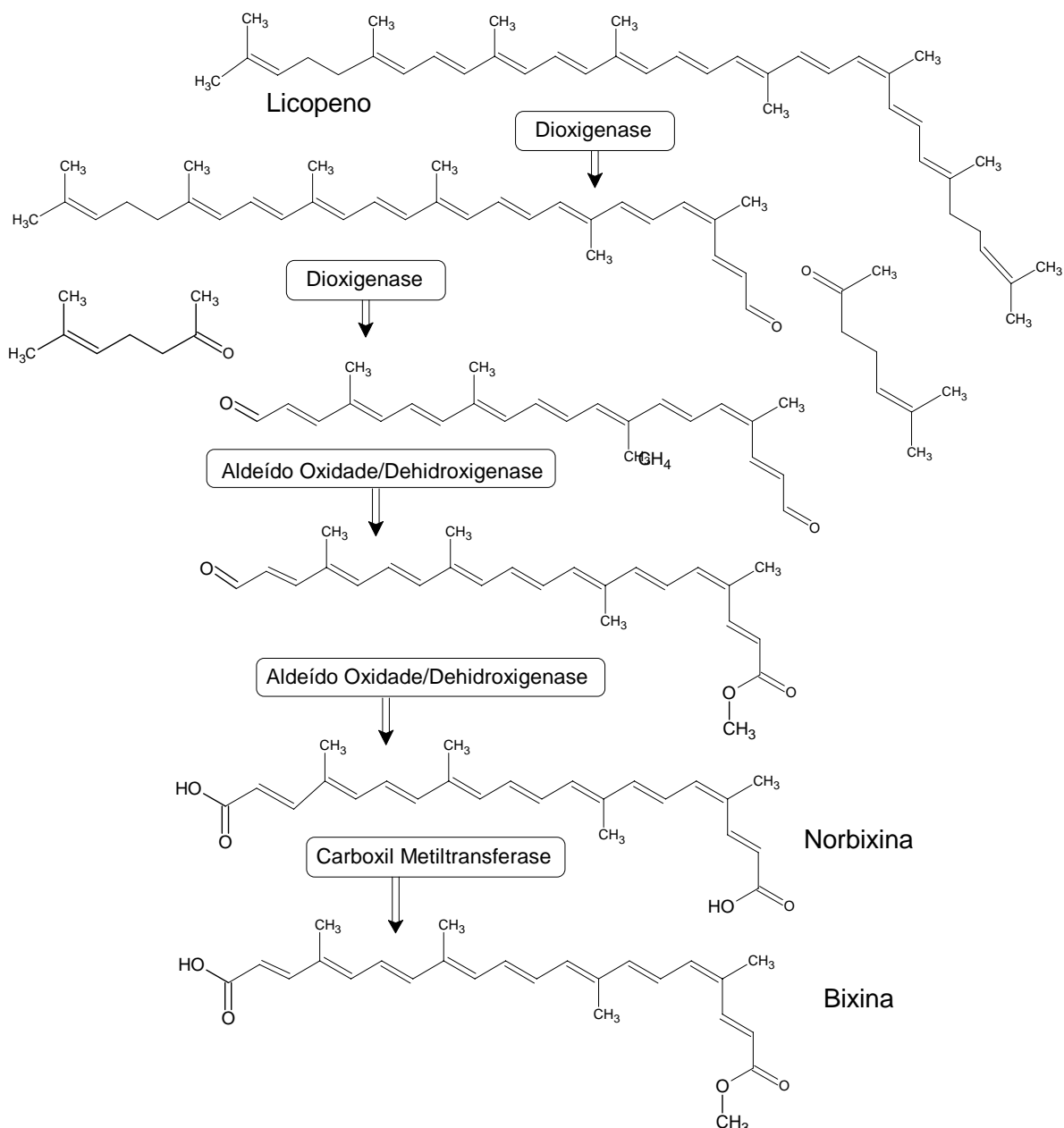


Figura 7 - Rota proposta da biosíntese da bixina a partir do licopeno.

Fonte: (JAKO et al, 2002).

2.6 DERIVADOS SINTÉTICOS DE CAROTENÓIDES

Nas aplicações farmacêuticas a eficácia de atuação de uma droga pode ser potencializada pelos seguintes fatores: aumento da transferência de massa na membrana celular, reatividade do princípio ativo e o potencial de redução este, de fundamental

importância na peroxidação lipídica, particularmente em relação aos danos causados às células e tecidos pela foto-sensitização provocada por radiação ionizante.

Além do tocoferol ($E^\circ = + 0,48V$), os carotenóides e polifenóis se destacam como importantes bloqueadores fisiológicos de radicais livres. Os ascorbatos atuam com menor potencial de redução ($E^\circ = + 0,23V$) sendo, portanto mais eficientes na desativação do oxigênio singlete do que o tocoferol.

Experimentos mostram que a atividade antioxidante do ácido ascórbico envolve transferência de hidrogênio melhor que de elétron. Tanto os tocoferóis quanto o ácido ascórbico apresentam atuações similares como antioxidantes.

A natureza lipofílica dos tocoferóis propicia fácil acesso às regiões lipídicas das membranas celulares e das lipoproteínas, condição não atendida pelo ácido. Isto porque a vitamina C é muito solúvel em água, mas praticamente insolúvel em hidrocarbonetos e gorduras. Por outro lado, seus derivados anfifílicos podem ser facilmente dissolvidos tanto em água quanto em fases orgânicas. Considerando que a atividade como antioxidante, tanto do ácido ascórbico quanto dos seus derivados são praticamente as mesmas, fica evidente a importância de se produzir derivados lipofílicos (hidrófobos) do ácido ascórbico (Lo Nostro, 1997).

Ainda, segundo a autora, estes compostos têm grande relevância quando se destinam às aplicações como: reduzir os danos causados por radicais livres, conservação de alimentos, drogas ou cosméticos. É observado que: a especificidade e eficiência de atuação como também a velocidade de absorção através da parede celular, são dependentes, entre outros fatores, das características estruturais, assim como do tamanho da cadeia lipídica.

Neste sentido, a busca por compostos naturais destinados à área farmacêutica e à aplicação como conservantes de alimentos tem merecido especial. A obtenção de um éster, derivado de bixina com o ácido ascórbico, é citado por Girardin et al. (2000), que conduziram a síntese, via catálise enzimática, pelo emprego da lipase *Cândida Antartica*. Os autores visualizam sua utilização como potencial agente antioxidante, na mesma linha dos ésteres graxos insaturados do ácido ascórbico ou mesmo como os derivados do tocoferol, cujo sinergismo de suas combinações tem sido exaustivamente estudado.

Citam os autores que conversão de 25% na reação de esterificação foi obtida quando realizada à pressão atmosférica e 50 % quando a pressão do sistema foi reduzida para 200mbar. Os experimentos foram conduzidos à 65° C por 144 h. A substituição da bixina pela norbixina reduziu a conversão de 50% para apenas 8%. A reação foi monitorada por Thin Layer Chromatography (CCD) empregando placa de sílica gel MERCK e fase eluente composta de uma mistura de clorofórmio/ metanol /ácido acético/água 80: 10: 8: 2, tendo apresentado os seguintes valores para o fator de retenção (Rf): 0,00 para o ácido L-ascórbico, 0,36 para o éster de bixina, 0,8 para a norbixina e 0,94 para a bixina.

A obtenção destes derivados tem sido conduzida no sentido de melhorar suas características de solubilidade, estabilidade ou mesmo com vistas a potencializar seu caráter antioxidante de forma a melhor adequar sua aplicação para fins específicos. Tanto a bixina quanto a norbixina apresentam baixa solubilidade na maioria dos solventes. A bixina é normalmente empregada para produtos com base lipídica, enquanto que em produtos com base aquosa emprega-se freqüentemente a norbixina.

Associação de substâncias antioxidantes têm sido exploradas no sentido de otimizar a ação do coquetel no tratamento de várias enfermidades. Blot et al. (1993) verificaram a eficiência da associação da vitamina E com o beta-caroteno e o selênio, atestando os benefícios na redução aos riscos de câncer. Atualmente existe no mercado uma associação destes antioxidantes (POLYANTOX), comercializada como suplemento alimentar.

O emprego de mono e diéteres de glicerina, tendo como radicais, compostos antioxidantes tais como derivados do ácido ascórbico ou derivados deste ácido com ácidos graxos, a exemplo de palmitatos, tem sido empregado como conservante em óleos, cosméticos entre outros. Trine et al. (2001) sintetizaram um triglicerídeo contendo três importantes antioxidantes (através da reação do ácido beta-apo-8-carotenóico, ácido selenocaprílico, um derivado ácido do tocoferol (Trolox®) e a glicerina). A ligação covalente destes três antioxidantes, a um transportador fisiologicamente ativo como a glicerina poderia potencializar a atividade deste novo antioxidante.

Fuhrhop et al. (1997) desenvolveram uma membrana poliênica rígida fazendo reagir um derivado de bixina, seu cloreto de ácido com um derivado porfirínico, o meso-tetrakis (o-aminofenol) porfirina. O monômero produzido foi então polimerizado em solução hidro-metanólica através da irradiação por um período de 5 a 240 minutos, com uma lâmpada de

tungstênio de 300 W. Reportam os autores que a membrana polimérica apresentava-se como vesículas singulares, de espessura molecular e configuração esférica, apresentando ainda propriedades únicas. Sugerem os pesquisadores, que as vesículas aniônicas, contendo quatro cadeias laterais rígidas, compostas por ácidos carotenóicos, ligadas à posição central, diferentes derivados sensíveis de base porfirínica, poderiam ser empregados em processos de separação de cargas por indução pela luz, como receptor de elétrons externo. Segundo o autor foram testados derivados de bixina e norbixina, com derivação no núcleo da porfirina, esta derivada com zinco. Derivados de porfirina entre eles: a ciclo-guanidinporfirina; a diaminoetil, tetrametil, bisdietilporfirina e a-aminofenilporfirina foram também avaliados. Para tornar a bixina reativa, efetuou-se a conversão no seu derivado, cloreto de acila, pela reação prévia com cloreto de tionila em meio de tetrahidrofurano (THF).

2.7 URUCUM

Quando os conquistadores espanhóis chegaram ao Novo Mundo conheceram muitas plantas cujos extratos eram empregados pelos Maias e Aztecas. Uma destas plantas, o urucum, existente ao longo da América tropical era usado como extrato para tingir tecidos e pintar o corpo, além de ser utilizada junto à vanilina na formulação de uma bebida a base de cacau. O nome científico do urucum, *Bixa orellana* foi dado por Francisco Orellana, após uma expedição na região na Amazônica Setentrional (Giuliano, 2003; Sandi et al., 2003).

A planta, (*Bixa orellana* L.) da família das Bixaceae recebe diferentes denominações populares ao redor do mundo: Urucu, urucum e açafoa (Brasil), atole, achiote e bija (Peru, Colômbia e Cuba), achiote, bija, onoto (Venezuela), urukú (Paraguai), rocou e rocoyer (República Dominicana e Guiana francesa), rocuyer (França), changuaricá, pumacué e K'uzub, (México). Outras denominações encontradas na literatura são: uñañé, eroyá, chagerica, orelana, ranota, annatto e lipstick (USA) (Sandi et. al., 2003; CATÁLOGO Rural, 2003).

É um arbusto com altura entre 2,0 a 4,0 m, podendo atingir até 6,0 m dependendo das condições de clima e idade da planta. Cresce em altitudes de até 1000m, contudo, desenvolve-se melhor em zonas relativamente baixas, de 100 a 500m., suportando temperaturas de 24° a 35° C. Seus frutos são cápsulas ovóides “cachopas”, cobertas por espinhos flexíveis, em cujo interior encontram-se de 30 a 50 sementes. Oriundo da América Tropical acredita-se que tenha sido uma das primeiras plantas “domesticada’ pelos índios da região, provavelmente

para fins cerimoniais, a partir da *Bixa excelsa*, árvore silvestre da família das (Bixáceae), (Sandi et al., 2003; Vazquez-Yanes, 1999)”. A Figura 8 mostra flores, frutos e sementes de urucum,

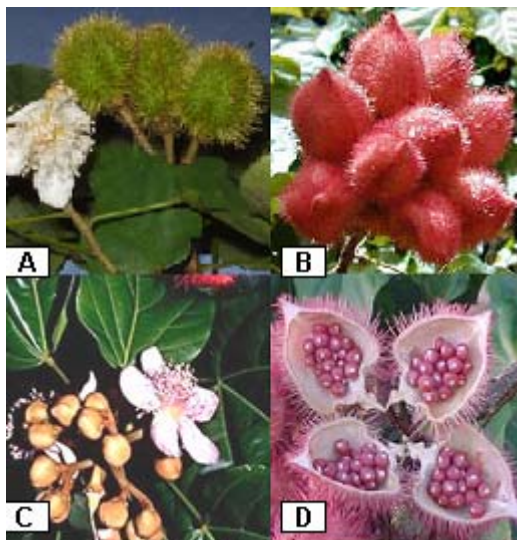


Figura 8: Fotos de urucum: A: fruto verde; B: cachopa com frutos maduros; C: em floração; D: fruto aberto com sementes expostas.

Almeida et al. (1995) estudaram a micropopagação do urucuzeiro submetendo gemas adventícias a diferentes concentrações de auxina. Segundo os autores, por serem as plantas geralmente formadas a partir de sementes, não apresentam grande uniformidade nos plantios, com variações em relação ao teor de bixina, à resistência às pragas e à produtividade. Devido a isto, a micropopagação vegetativa aparece como método viável para obtenção de lavouras produtivas e uniformes uma vez que, constituídas de clones, herdam as mesmas características genéticas da planta matriz fornecedora do material propagativo. Apresenta ainda como vantagem a geração de milhares de plantas clonais, isentas de problemas fito-sanitários, podendo ainda ser multiplicado em qualquer época do ano.

O urucum é empregado com frequência como condimento na culinária asiática, africana e européia. Foram os espanhóis os responsáveis pela expansão do consumo deste produto ao redor do mundo, o que levou a um aumento de sua produção já no século XIX. Sua maior aplicação está concentrada na indústria de alimentos, onde é empregado como corante (Sandi et al., 2003).

Nos últimos anos o potencial do mercado internacional do urucum teve um grande impulso. Como o produto natural é substituído para corantes sintéticos, considerados

cancerígenos, a proibição ao uso destes aditivos nos Estados Unidos, Japão e alguns países da Europa, fez com que o urucuzeiro ganhasse importância nas regiões produtoras, Almeida et al. (1995). Atualmente, o urucum é uma das maiores fontes naturais de corantes e pigmentos vermelhos.

Entre os corantes naturais, o urucum figura como o segundo em importância econômica depois do caramelo (Mercadante et al., 1998). O cultivo do urucum destina-se exclusivamente a comercialização do corante presente na semente, podendo chegar no máximo a 4,5 % em massa, nas sementes de boa procedência. A produção de pigmento, contudo, deixa a semente como subproduto. Esta semente foi avaliada no sentido de tornar o cultivo daquela espécie mais lucrativo, procurando, por exemplo, explorar a sua possível aplicação como ração animal.

Bressani et. al. (1983) conduziram estudos nesse sentido, efetuando análises das sementes com enfoque especial para seu valor nutricional. Os resultados revelaram: elevado teor de fibras totais (16%); alto de teor de fósforo e baixo de cálcio e elevada quantidade de proteína, (13 a 17 %), das quais, lisina e tripitofano em quantidades majoritárias e, em menor quantidade: metionina, isoleucina, leucina fenilamina e treonina. O conteúdo total de proteína corresponde a cerca de 65 % daquele encontrado na caseína, usada como referência. Reportam os autores, que a deficiência de aminoácidos, particularmente metionina faz desta farinha um produto de baixo valor biológico. Também foi constatada a baixa digestibilidade da proteína, 57% comparada a 94 % para a caseína. Sugerem os Autores que mais de 50% das fibras podem ser eliminadas por peneiramento da farinha trazendo conseqüentemente um aumento da digestibilidade.

A coloração vermelha da semente está diretamente relacionada ao percentual de bixina. Quanto maior a concentração de norbixina, maior a tendência para o amarelo. Tanto as sementes, quanto os extratos processados são comercializados com base no teor de bixina ou norbixina. As sementes da Jamaica, por exemplo, apresentam teores normalmente mais elevados de bixina, 3% em média, contra menos de 2% daquelas produzidas na Índia. Por outro lado, sementes provenientes do Caribe são intensamente vermelhas, o que eleva o seu valor no mercado. A composição do extrato varia segundo o método empregado no processo de extração e concentração, visto que a bixina isomeriza com o calor, aumentando o percentual de trans-bixina, como também, hidrolisa em meio alcalino dando lugar a norbixina, (Robbins, 1995; REVISTA de Fitoterapia, 2003).

O consumo de urucum tem aumentado muito nas últimas décadas. Excluídas as demandas internas, o comércio internacional médio anual de urucum é estimado em cerca de 10000 toneladas, sendo dois terços desta produção na forma de semente bruta e o restante como extrato. A América Latina produz 60 % de todo o urucum consumido no mundo, seguido pela África com 27% e a Ásia 12%. Os preços da semente dependendo da produção e da variedade oscilaram de US\$ 2000 a US\$660 por tonelada entre 1985 a 1995. Estes preços também são proporcionais ao conteúdo de bixina, o qual em alguns casos deve ser maior que 2,7 % (Giuliano, 2003). Só o Peru, maior produtor mundial, exportou em 1990, cerca 2000 toneladas, equivalente à demanda mundial em 1970. Sua produção em 2000 subiu para 4482 toneladas. Outros grandes exportadores são a Bolívia, Brasil, Equador, México, República Dominicana, Colômbia, Kenia, Sri Lanka, Senegal, Costa do Marfim e Índia. Em menores quantidades também é produzido: na Nicarágua, Jamaica, Paquistão, Malásia, Filipinas, Tanzânia e Angola (Sandi et. al., 2003; PROCESSOS de Comercialização e Mercados, 2003; May, 1997).

Segundo Mello e Lima (1989), existe uma expectativa para o Brasil destacar-se no cenário mundial como maior exportador de urucum. Cultivado por muitos anos, é encontrado nos estados do Acre, Amazonas, Pará e também nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba e Piauí. Atualmente, outros estados, como Rio de Janeiro e São Paulo têm se dedicado no cultivo deste vegetal. Contudo, apesar da expectativa, o produto brasileiro apresenta em sua maioria teores reduzidos de bixina. Entretanto, sua maior produção é destinada ao mercado interno. Em 1991 e 1994 a produção situou-se na ordem de 8000 e 9000 toneladas respectivamente. Neste período, apenas 2504 toneladas foram exportadas (Carteira de Comercio Exterior (CACEX)). Apesar de ser amplamente cultivado existem poucas pesquisas, particularmente, referentes ao melhoramento genético, que levem ao aumento da produtividade por área de cultivo ou que conduza a maior produção de sementes por fruto, como também a um aumento no teor de bixina das sementes.

O urucum é importado em grande quantidade pelos Estados Unidos, maior importador mundial, seguido pela Inglaterra, maior importador europeu, como também pela China, França, Alemanha, Japão e Argentina. Destaca-se a Dinamarca no cenário mundial como o maior processador do pigmento, (PROCESSOS de Comercialização e Mercados, 2003; Robbins, 1995; May 1997).

2.7.1 PRINCIPAIS APLICAÇÕES PARA O PIGMENTO

O pigmento extraído do urucum é um corante com ampla aplicação em diversos ramos industriais. A Organização Mundial da Saúde reconhece sua nula toxicidade tanto para o consumo humano como para sua aplicação na pele. O produto é registrado pela União Européia sob a denominação de **E160 b**.

O maior segmento consumidor destes corantes é a indústria de derivados lácteos, sendo empregado para colorir queijos, manteigas, iogurtes e margarinas. Tem aplicação também em produtos derivados de carne como: salsichas, salames e defumados; derivados de pescados; molhos de salada; cereais matinais, caramelos, sorvetes, como também em achocolatados, refrigerante, e licores (SANDI *et. al.*, 2003).

A norbixina é o único pigmento natural que reage com a caseína. Esta característica torna este corante exclusivo no segmento de queijo e produtos lácteos (Collins, 1992).

Em cosmética, o pigmento encontra aplicação como: na formulação de bronzeadores, na forma de extrato oleoso; produtos de maquiagem como: batons e pós-faciais; produtos para cabelos como: tintura e xampus, como também em sabonetes. Na indústria têxtil é empregado para tingir algodão, lã e especialmente a seda, conferindo a esta um efeito especial difuso, amarelo-laranja. Também tem sido empregado como pigmento na indústria de couro bem como na fabricação de tintas e vernizes, graxas para sapato e ceras para pisos (Sandi et al., 2003; REVISTA de fitoterapia, 2003).

Encontra-se na literatura informações relacionadas ao emprego na medicina, como composto adstringente, bactericida, como poderoso agente antioxidante, eficaz no combate aos radicais livres, ou ainda para controle de taxas de colesterol e redução dos níveis de triglicérides no sangue.

Estudos homeopáticos indicam seu uso para o tratamento de cardite e endocardite. Outras qualidades medicinais atribuídas referem-se ao emprego no tratamento de hemorragias, dispepsias e queimaduras da pele (CATÁLOGO Rural, 2003; Newman, 2002). Em Newman (2002) encontra-se a relação de um grande número de aplicações medicinais do urucum, incluídas as referências.

Além do emprego da semente devido ao seu pigmento, faz-se também uso das folhas e raiz, explorando suas propriedades terapêuticas. O extrato etanólico das folhas é citado como

antídoto eficaz em caso de envenenamento por mandioca, como também um potente antiofídico. (Sandi et. al., 2003).

Várias são as propriedades atribuídas à planta e que são exploradas pela medicina tradicional das quais são mencionadas: ser efetivo contra diarreia, amigdalite, no tratamento de doenças peitorais, também como estimulante, diurético, febrífugo, expectorante, cicatrizante, afrodisíaco e laxante (CATÁLOGO rural, 2003; Sandi et al., 2003;Giuliano, 2003).

2.7.2 COMPOSIÇÃO DA SEMENTE

Frega et al. (1998) identificaram na fração lipídica, extraída com hexano, a presença de tocotrienóis, destacando-se elevada concentração do delta tocotrienol, 140-147 mg/100g de extrato seco, maior do que aquelas normalmente encontradas em qualquer outra espécie vegetal. Reportam ainda não ter sido encontrado nenhum tocoferol.

Mercadante et al. (1997), isolaram 5 cinco apocarotenóides e identificaram a estrutura de três outros até então desconhecidos, presentes no arilo da semente de urucum. O metil (7Z, 9Z, 9'Z)-apo-6'-licopenoato, o metil (9Z,)-apo-8'-licopenoato, e o metil 1(all-E)-apo-8'-licopenoato, foram os três novos carotenóides encontrados. Os compostos; metil (all-E)-8'-apo-betacaroten-8'-oate e o metil (all-E)-apo-6'-licopenoate, não tinham antes sido encontrados no urucum.

Mercadante et. al. (1999) isolaram três outros apo carotenóides do urucum (*Bixa orellana* L.): o 6-geranilgeranil-8'-metil-6,8'-diapocaroten-6-8'-dioato; o 6'-geranilgeranil-6'-metil-(9Z)-6,6'-diapocaroten-6-6'-dioato e o 6-geranilgeranil-6'-metil-6-6'-diapocaroten-6-6'-dioato. Reportam os autores ter sido esta, a primeira vez que foi encontrado o geranilgeraniol esterificado com um ácido carboxílico carotenóico.

Muitas outras informações referentes à composição química da semente, raiz e folhas do urucum, são encontradas na literatura. Contudo, talvez pelas diferentes procedências das plantas, métodos analíticos empregados, ou ainda a custa da própria instabilidade apresentada por alguns de seus componentes, os percentuais variam bastante.

A análise da semente inteira apresenta 17,5% de lipídeos sendo; ácido linolênico, α linoléico e oléico. Possui ainda 10,6% de aminoácidos, 6 dos 8 aminoácidos essenciais

contemplados no padrão ideal da OMS. As cinzas (5,4%) apresentaram alto conteúdo de fósforo, ferro e zinco, com reduzido teor de cálcio. Além da bixina e norbixina outros carotenos são encontrados em menores quantidades no arilo da semente do urucum entre eles; isobixina, beta caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e a orellina, de cor amarela. Das folhas foram isolados os compostos apigenina, luteolina, hipoaletina e isoscutelareína, como também seus heterosídeos cosmosiína, além dos derivados bisulfatados apigenina e luteolina-7-bisulfato e hipoaletina-8-bisulfato. Foram também isolados os diterpenos; farnesilacetona, geranilgenaniol e geranil formato. No óleo essencial foi detectada a presença de dois sesquiterpenos o ishwarano e bixageneno, além de ácido gálico e pirogalol (REVISTA de fitoterapia, 2003).

Segundo Amsar (2002) além da bixina encontram-se também nas sementes de urucum; bixeina, bixol, crocetina, iswarane, ácido elágico, ácido salicílico, treonina, ácido tomentósico, triptofano e fenilalanina. A semente bruta apresenta como composição típica; 40 a 45 % de celulose, 3,5 a 5,5 % de açúcares, 0,3 a 0,9% de óleo essencial, 3% de óleo fixo, 1,0 a 4,5% de pigmento, 13 a 16 % de proteína como também alfa e beta caroteno além de taninos e saponinas, (Taylor, 2002; Amsar, 2002).

Galindo-Cuspinera et al. (2002) empregando técnica de *head space* e Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS) determinaram a presença de inúmeros compostos voláteis em extratos aquosos e lipossolúveis de urucum. A identificação foi realizada por comparação com dados de biblioteca NIST e índice de Kovats como também pelo tempo de retenção com padrões conhecidos. Mais de 100 compostos foram detectados e cerca de 50 identificados, entre eles: acetato de bornila, α -cariofileno, copaene, α -cubebene, (+)ciclosativene, geranilfenilacetato, 1-heptanetriol, 3-metil piridina, 4-metil piridina γ -elemene, β -humuleno, isodene, β -pineno, selina-6-em-4-ol, δ -selinene,(-) espatulenol, e o (+) ylangene.

Separação, análise e identificação dos constituintes.

Vários trabalhos enfocam a separação e identificação dos compostos presentes no extrato de urucum. Entretanto, a maior parte deles exploram particularmente aspectos analíticos, e não a otimização de um processo exclusivo para produção da bixina, o componente de maior valor econômico.

Arima e Angelucci (1980) testaram dois métodos de separação de carotenóides por cromatografia preparativa. Reith e Gielen (1971) determinaram algumas propriedades físicas da bixina, norbixina e seus isômeros, tais como: ponto de fusão e coeficientes de extinção molar em diferentes solventes. Pesquisas referentes à separação e identificação ainda empregam com certa frequência a CCD. Entretanto, devido a uma série de vantagens apresentadas, o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), vem sendo a técnica mais explorada nos dias atuais para a separação e identificação de componentes do extrato do urucum. (Rousseff, 1988).

Mercadante et al. (1999) reportam o isolamento e elucidação da estrutura de três novos diapocarotenóides, além dos outros 4 apo carotenóides e 5 diapocarotenóides já identificados pelo mesmo grupo de pesquisa em 1997.

A cromatografia em coluna e a CCD foram métodos historicamente empregados para isolamento e análises de muitos carotenóides. Contudo, os avanços das técnicas de espectroscopia, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa têm contribuído muito para a elucidação da estrutura destes compostos. Por outro lado, os constantes avanços na HPLC e da espectrofotometria têm contribuído de maneira significativa para o isolamento e quantificação destes carotenos (Qing, 2002). Desta forma, a determinação do teor de bixina se faz normalmente por técnicas espectrofotométricas ou por cromatográfica líquida de alta eficiência HPLC. Não obstante, ambos os processos analíticos dependem de um padrão de referência de alta pureza.

Particularmente no caso da bixina ou norbixina, devido à reduzida estabilidade à estocagem não se dispõe de um padrão analítico no mercado. Sendo assim, recorre-se a extração e purificação, com posterior caracterização e determinação da pureza do padrão obtido. Um aspecto determinante neste procedimento refere-se à técnica escolhida, normalmente a espectrofotométrica. Segundo Carvalho (1993), as técnicas empregadas são adaptações de procedimentos aplicados à análise dos extratos (FAO/WHO, 1982; Lara, 1984; Yabiru & Takahashi, 1991).

Observa-se nesta metodologia que o conhecimento do coeficiente de absorvidade é determinante, para fidelidade dos valores de concentração que serão calculados com base neste coeficiente. A análise conduzida em solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio apresenta uma série de inconvenientes visto que, o processo envolve a reação de hidrólise da

bixina. Por ser função da cinética, a cor desenvolvida pela solução, correspondente a norbixina formada, depende de diversos fatores tais como: tempo decorrido entre a leitura e preparação da solução, concentrações do álcali e da própria amostra como também da temperatura. A interdependência daqueles fatores acarreta uma série de incertezas quanto aos valores de absorbância medidos. Outro aspecto que deve ser considerado, refere-se à própria instabilidade da solução, bastante significativa em soluções diluídas, e que leva à rápida degradação do produto no decorrer da análise.

A determinação da concentração da bixina em um solvente orgânico é mais adequada, visto que pode ser realizada imediatamente após a solubilização da amostra, apresentando também, leituras de absorbância mais estáveis. Com relação aos valores do coeficiente de absorvidade empregado também ocorrem controvérsias. Segundo Carvalho (1993), o valor do coeficiente de absorvidade publicado pela FAO (1975), para extratos em soluções de NaOH é de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2850 \pm 40$ a 453 nm. Todavia, em outra publicação da FAO (1982), utiliza para cálculo $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3473$ a 453 nm. (Também o valor do referido coeficiente para extrato em clorofórmio foi alterado, de 3230 ± 80 em 470nm (FAO, 1975) para 2826 ± 80 em 1982).

Simpson et al. (1993) realizaram o isolamento e purificação da bixina em coluna preparativa empregando fase reversa C-18. Após uma prévia purificação em coluna preparativa empacotada com sílica hypersupercel e empregando como fase móvel uma mistura contendo 25 % de acetona e 75% de hexano foi possível eliminar os componentes minoritários. Posteriormente para isolamento da bixina, uma primeira eluição, com uma solução de acetonitrila/água 50%, permitiu a retenção da bixina e remoção da norbixina. Por fim, percolando a coluna com uma solução 40:60, a bixina retida foi removida do adsorvente e isolada.

A cromatografia em camada delgada foi por muito tempo um instrumento empregado na investigação de compostos extraídos de uma matriz vegetal. Mc Keown (1961) empregando cromatografia em papel, impregnado com N, N-dimetilformamida, e utilizando como fase móvel uma mistura de ciclohexano, clorofórmio, dimetilformamida e ácido acético isolou e identificou seis principais componentes presentes na semente de urucum: as duas formas isômeras da bixina (cis (lábil) e trans.); ambas norbixina e metilbixina (formas lábeis) como também seus correspondentes isômeros estáveis, os compostos de forma trans.

Reith e Gielen (1971) determinaram algumas propriedades da α e β norbixina e α e β bixina, tais como: coeficientes de extinção molar (em clorofórmio), como também ponto de fusão, confrontando com valores disponíveis na literatura. Para realização desta pesquisa empregaram cromatografia em camada delgada (celulose sem prévio tratamento), para isolamento e purificação das amostras ensaiadas.

A cromatografia líquida de alta eficiência HPLC apresenta-se como solução para aquelas análises que envolvem riscos de decomposição fotoquímica e por oxidação a que estão sujeitos muitos compostos naturais. Isto é particularmente observado na separação de bixina. Rousseff (1988) desenvolveu e otimizou um processo analítico para determinação de pigmentos de urucum e tumérico presentes em corantes alimentícios. Destaca que esta técnica analítica reduz os efeitos de decomposição, visto que o tempo decorrido para a separação é reduzido e também o processo se desenvolve no interior da coluna, na ausência de luz e em um solvente degaseificado. A cromatografia líquida, pelas características mencionadas tem sido a técnica mais indicada para análise destes produtos.

O crescente interesse despertado pelos carotenóides, e a necessidade do seu monitoramento em pequenas concentrações no plasma sanguíneo têm conduzido a constante procura por técnicas analíticas capazes de determinar com precisão quantidades muito reduzidas destes carotenóides. Segundo Qing (2002), técnicas modernas de detecção associadas à HPLC tem contribuído para aumentar a sensibilidade das determinações. O detector por varredura eletroquímica (Eletrochemical array detection (EC)) empregado na determinação de carotenos, (hidrocarbonetos e oxigenados) tem viabilizado analisar micro-quantidades provenientes de plasmas, células da mucosa bucal, tecido cervical ou da próstata, a um limite de detecção que chega a ordem de 50 fmol. O método que emprega detecção foto térmica a laser (Thermal lens spectroscopy (TLS)) tem provado ser ultra-sensível, sendo aplicado por isto com sucesso em pesquisas biomédicas apresentando limite de detectabilidade de até 70 pg/ml para criptoxantina, sensibilidade esta, cerca de 100 vezes superior à detecção por ultravioleta. A espectrometria de massa apresenta limite em torno de 500fmol para um caroteno individual. Técnica mais recente como a ionização por desorção a laser tem sido empregada para limites de detecção na ordem de fmol e a ressonância magnética nuclear (RNM) possibilita análise com amostras na ordem de até nanograma. Esta técnica, entretanto, requer amostra muito pura, diferente da requerida nas técnicas de detecção por UV visível ou espectrometria de massa (Qing, 2002).

2.7.3 TOXIDEZ

Na aplicação como corante, normalmente se faz uso de um extrato bruto do urucum. Diante de uma mistura de substâncias, cuja composição está sujeita as mudanças decorrentes das condições do processo empregado para sua extração ou mesmo durante a fase de concentração, a avaliação, da estabilidade à estocagem ou a análise dos efeitos deste pigmento, relacionando sua ação terapêutica, pode levar a conclusões imprecisas.

Sempre que se faz menção ao pigmento do urucum, maior atenção é dada à bixina; por ser este o componente que ocorre em maior concentração, como também por ser o principal responsável pela sua cor vermelha. No entanto, muitos compostos presentes nas sementes, já foram identificados. Desta forma, controvérsias quanto à toxidez podem estar relacionadas a alguns daqueles compostos que ocorrem em menor quantidade no pigmento.

Aranez e Bayot (1998), relataram que o extrato do urucum é genotóxico. Contudo, os ensaios foram realizados com extratos brutos, obtidos com clorofórmio e éter de petróleo, o que pode ter comprometido os resultados.

Nish et al. (1991) estudaram as implicações dos efeitos causados pelo pigmento de urucum tais como urticária e angiodema desenvolvido por alguns pacientes. Concluíram, entretanto que este efeito estava provavelmente relacionado a duas proteínas presente na semente as quais foram encontradas em pequenas concentrações nos extratos. Estas proteínas mostraram-se tóxicas àqueles pacientes estudados.

Scotter (2000) pesquisou os produtos de degradação térmica proveniente da semente de urucum encontrando tolueno e m-xileno e um produto de decomposição, de cor amarela, o qual é tratado na literatura pertinente como C₁₇, como algumas das substâncias produzidas neste processo.

Em publicação do National Toxicology Program (NPT), Instituição americana que conduz estudos toxicológicos encontra-se um levantamento de diversas pesquisas publicadas, referentes à estudos toxicológicos, relacionados ao urucum, bixina e norbixina tendo como objetivo, verificar possíveis atividades carcinogênicas, genotóxica e mutagênicas envolvendo ratos, camundongos e cachorro. A pesquisa realizada com ratos empregou extrato lipossolúvel, e hidrossolúvel. Os valores para dose letal (LD) oral encontrados foram respectivamente LD>50g/kg para o primeiro extrato e LD>35g/kg para o segundo. Também

são reportados resultados de experimentos realizados com seres humanos nos quais foram avaliados o efeito da ingestão destes compostos e a associação a sintomas como alergias, urticária e angiodema. Foram identificadas reações alérgicas positivas para alguns indivíduos após ingestão do extrato de urucum. Alguns destes pacientes apresentaram urticária ou angiodema, porém, nenhuma das pesquisas foi realizada com placebo, o que torna imprecisa qualquer afirmação.

Segundo Preston e Rickard (1980), em 1970, a ingestão diária permitida pela FAO/OMS era de 1,25 mg/kg de massa corpórea. Uma década depois, segundo Paumgarten et al. (2002), um Comitê de especialistas da FAO/WHO, (Joint Expert Commmittee on Food Additives (JECFA)) (1982), considerando os dados toxicológicos disponíveis sobre o extrato de urucum, estabeleceu valores mais baixos para a ingestão diária aceitável (IDA) fixada em (0,065 mg/kg/dia).

Ainda, Segundo Preston e Rickard (1980), estudos metabólicos mostraram que os pigmentos do urucum são facilmente metabolizados. Os níveis de pigmento no plasma reduzem em menos de 24 h. Estudos *in vitro* sugerem ainda que o fígado seja responsável por esta função. Atualmente diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de comprovar outras propriedades atribuídas ao urucum tais como sua atividade hipoglicêmica.

Levy et al. (1997) pesquisaram o tempo de retenção no plasma, tanto da bixina (cis e trans), quanto da norbixina (cis e trans). Sete voluntários ingeriram uma única dose de 16mg de corante alimentício. Foi observado que a bixina é totalmente eliminada, no máximo, após oito horas, contra 24 h para norbixina.

Segundo Thresiamma et al. (1998) a bixina apresentou ação anti-mutagênica inibindo significativamente a frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas, induzidas pela radiação gama, nas células da medula óssea de camundongos e de linfócitos de ratos em cultura. As cobaias em estudo foram expostas à radiação gama de intensidade 1,5-30 Gy e receberam via oral, dose de 200mmol de bixina /kg de peso. Foram também estudados outros antioxidantes como o ácido elágico (200mmol/Kg) e a curcuma (400mmol/kg). Os resultados obtidos foram comparáveis com a administração de alfa-tocoferol (200mmol/kg.).

2.7.4 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO

As características finais do pigmento dependem não só das condições de conservação dos produtos, mas principalmente do processo de extração, o que reflete na qualidade final do produto. Desta forma muitos países importam as sementes in natura. Tendo em vista que o mercado importador exige um percentual mínimo de 2,5 % de bixina, a existência de variedades cultivadas com somente 1,6 a 2.1 % de bixina tem levado muitos países a mudarem sua estratégia de mercado (May et al., 1997). A Índia, por exemplo, têm ampliado a exportação de pigmento processado de forma a aumentar o valor agregado (Robbins, 1995).

Os corantes de urucum podem ser encontrados no mercado em diferentes formas: em solução aquosa, solúvel em óleo ou ainda, na forma de emulsão ou em suspensão (Sandi et al., 2003). Vários são os processos adotados para obtenção do pigmento. O método tradicional de extração dos corantes do urucum consiste na enérgica agitação das sementes em água fria. Uma vez separada a semente e decantada a suspensão, seca-se a pasta. Esta pasta é comercializada in natura ou misturada a um óleo comestível. O referido processo acarreta baixo rendimento no teor de bixina, devido ao prolongado tempo de secagem (Sandi et al., 2003).

Preston e Rickard (1980) descrevem os principais métodos de extração; a extração em óleo, a extração em solventes orgânicos e a extração em meio aquoso alcalino, como também variantes destes processos. Em um dos processos as sementes são tratadas com solução alcalina, a frio ou a sob leve aquecimento. A solução alcalina obtida, contendo o corante solúvel, é acidificada o que leva a precipitação de um pigmento rico em norbixina. Desta forma é obtido um concentrado vermelho com elevado teor daquele componente. A extração com solventes orgânicos têm sido também uma alternativa para a obtenção de produto com elevada concentração bixina. Destacam-se entre os solventes empregados: a acetona, o álcool etílico, o propilenoglicol e também o clorofórmio. Este processo, no entanto apesar de conduzir a um produto com elevado rendimento, apresenta alguns problemas, devido ao elevado custo para recuperação dos solventes, ou a possibilidade de deixar resíduos tóxicos que pode inviabilizar seu emprego como corantes para alimentos. Outra forma também empregada pela indústria faz uso de óleos vegetais como solventes, produzindo extratos lipossolúveis.

Extrações com fluido supercrítico, particularmente empregando dióxido de carbono são reportadas na literatura, contudo esta técnica extrativa continua restrita a escala laboratorial, Chao *et al.* (1991) conduziram extrações de sementes de urucum com CO₂ a diferentes pressões e temperatura, (207 bar/50° C, 310° bar/ 60° C e 345 bar/50° C). Analisaram posteriormente os extratos, empregando técnicas de CCD, Ressonância magnética nuclear (RNM) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CGMS. Obtiveram maior concentração de pigmentos totais a 345 bar/50° C (19 mg/g de extrato). Em outro ensaio amostras de bixina e norbixina puras submetidas às mesmas condições de extração não acusaram a presença na análise por CG-MS, evidenciando baixa solubilidade, quando o óleo estava ausente.

A presença de grupamentos carboxílicos ácidos nestes compostos foi apontada como provável razão da inexistência de espectro de massa, uma vez que sua elevada polaridade poderia ter favorecido forte retenção daqueles compostos na coluna empregada. A espectrometria de massa mostrou, contudo a presença de muitos compostos terpênicos entre eles, em maior concentração o diterpeno geranilgeraniol.

Degnan *et al.* (1991) determinaram a solubilidade em CO₂ supercrítico dos compostos puros; bixina, norbixina e metilbixina como também de pigmento bruto, obtido de sementes inteiras de urucum. Observaram que a concentração de bixina solúvel em CO₂, proveniente do extrato de semente era cerca de 10 vezes superior em massa quando comparada ao ensaio de solubilidade de bixina com 97 % de pureza. Por outro lado, a concentração do óleo de urucum era cerca de 100 vezes aquela da concentração de bixina. Nas Tabelas 2, 3 e 4, são apresentados os dados de solubilidade em CO₂ supercrítico: da bixina, do pigmento de urucum e do óleo de urucum respectivamente.

Tabela 2 – Solubilidade da bixina em CO₂ supercrítico.

Solubilidade da bixina 97% (mg bixina/g de CO ₂)	
3000 psi, 40°C	7000 psi, 55°C
0.0010 ± 0,0001mg	0,0033 ± 0,0002

Tabela 3– Solubilidade do pigmento de urucum em CO₂ supercrítico.

Solubilidade do pigmento na semente inteira (mg de bixina /g de CO ₂)	
3000 psi, (40°C)	7000 psi, (55°C)
0,013 ± 0,001mg	0,027 ± 0,002

Tabela 4- Solubilidade do óleo de urucum em CO₂ supercrítico.

Solubilidade do óleo de urucum (mg/g de CO ₂)			
Pressão (psi)	40°C	50°C	55°C
3000	0,3	0,5	0,6
3850	1,3	1,7	2,0
4500	1,5	1,9	2,3
7000	1,7	2,1	2,5

Processos alternativos, como operações mecânicas envolvendo moinhos de bolas ou então em leito de jorro, onde as sementes de urucum sofrem atrição e impacto umas com as outras conduzem a um pigmento em forma de pó ultrafino. Os produtos resultantes de operações puramente mecânicas apresentam baixos teores de bixina, visto que a camada que envolve a semente de urucum represente cerca de 6% do peso da semente, e pouco mais de 2% da semente é devido à bixina (Carvalho, 1989).

Alves (2002) estudou a extração de bixina das sementes de urucum empregando moinho de bolas. Observou que o aumento de duas para quatro horas no tempo de processo, aumentou o rendimento de extração de 4,86 % para 14,83 % e que a fração granulométrica de 100 a 250 mesh apresentava os maiores teores de bixina.

Apesar da elevada sensibilidade à degradação em presença de ar e calor, algumas técnicas empregam a concentração de extratos através da secagem com fluxo de ar quente. Tavares et al. (1999) estudaram a influência dos parâmetros; vazão de ar e carga de semente de urucum no processo de extração mecânica em um leito de jorro monitorando a produtividade do processo e os teores de bixina do concentrado. Massarani et al. (1992) conduziram experimentos de extração de pigmentos de urucum simultâneo à secagem, em um equipamento de leito de jorro de configuração cônica, avaliando a eficiência desta operação conjunta. Passos et al. (1997) estudaram a secagem do extrato de urucum em leito de jorro, a

50° C avaliando a degradação térmica ocorrida durante o processo. Constataram ser pouco significativa a perda quando comparadas à operação conduzida a 105° C.

Deve-se ainda destacar uma alternativa de extração mecânica muito comum que emprega a farinha de milho (fubá). Este é agitado com a semente, de forma que, por abrasão o pigmento é removido, ficando incorporado à farinha de milho. O produto assim obtido tem emprego na culinária e é popularmente conhecido como colorau.

2.7.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO

A estrutura poliênica dos carotenóides torna estes compostos extremamente sensíveis à oxidação. Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de avaliar não só a influência dos parâmetros que favorecem ou catalisam estes efeitos, como também determinar a cinética de decomposição ou ainda identificar os produtos provenientes da decomposição. Efeitos do calor, oxigênio, luz, presença de água têm servido de base para muitas pesquisas. Desta forma, as condições de armazenamento do produto são fatores determinantes na conservação deste corante.

Kanjilal et al. (1996) monitoraram a concentração do produto em diferentes condições de estocagem, observando que as sementes conservadas à temperatura ambiente apresentavam redução na concentração de bixina de até 50 % contra 25 %, quando estocada em freezer. Observaram também que a bixina purificada (90%), tornava-se muito vulnerável a decomposição. Por outro lado, as perdas de bixina foram reduzidas quando dispersa em óleo vegetal, tanto quando estocada em freezer ou mesmo mantida a temperatura ambiente.

Glória et al. (1995) avaliaram a atividade da água sobre a estabilidade da bixina, associando parâmetros como luz e ar. Foi observado neste ensaio, que a bixina é mais estável em condições de média a elevada atividade de água.

Carvalho et al. (1993), avaliaram a estabilidade a estocagem de um corante sólido de urucum armazenado em embalagens plásticas co-extrudadas, aluminizadas e não aluminizadas, constituídas de distintos polímeros, as quais apresentavam diferentes níveis de permeabilidade ao oxigênio. As amostras foram mantidas em temperatura e umidades constantes. Concluíram neste trabalho que embalagens com taxas de permeabilidade ao oxigênio de até 42 cm³ (CNTP) /m³/dia a 25° C conferem adequada proteção ao produto durante um ano a 30° C a 90 % de umidade relativa e na ausência de luz.

O principal produto de decomposição da cis-bixina, isolado inicialmente por Mc Keonw (1962) foi mais tarde identificado pelo mesmo pesquisador em 1963 como sendo o éster monometílico do ácido 4,8- dimetil-tetradecahexanenediíco, o qual foi denominado C₁₇. A Figura 9 mostra o esquema da provável rota de degradação da 9'-cis-bixina (I) acompanhada dos produtos de decomposição formados, o m-xileno (II) e o composto corado C₁₇ (III). Segundo Scotter et al. (1994) o tolueno também ocorre junto como produto de degradação.

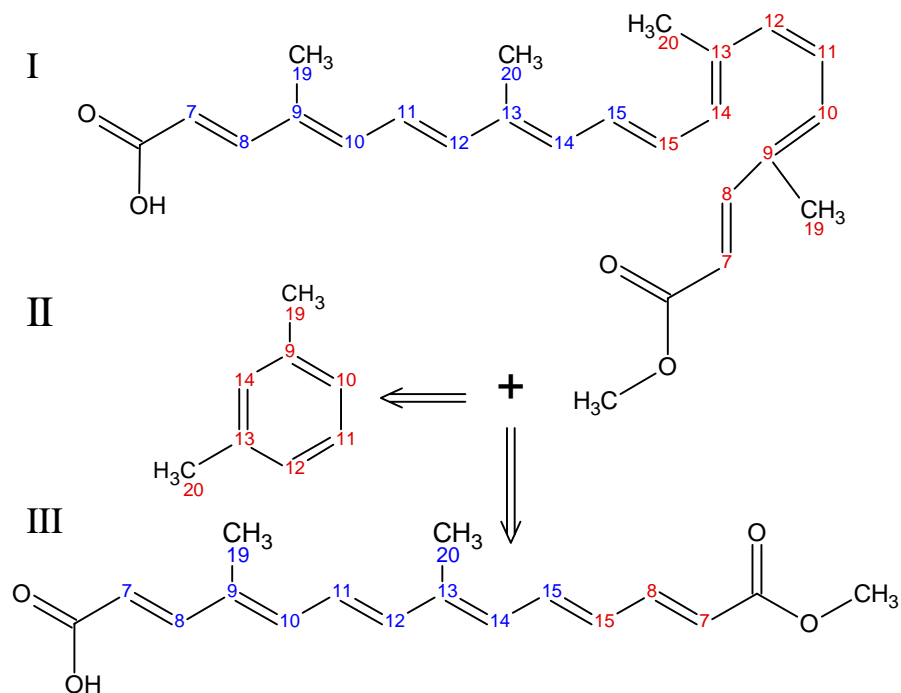


Figura 9- Degradação térmica da 9' cis-bixina. Fonte: SCOTTER et al. (1995).

Scotter et al. (2000) conduziram análises em varias amostras comerciais de pigmentos, com o objetivo de monitorar a concentração de produtos de degradação (tolueno e m-xileno) provenientes da bixina e norbixina. Concluíram os autores que a presença de C₁₇ é um forte indicativo do emprego de elevada temperatura de extração. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, usando a técnica do *head space*. Em outra pesquisa Scotter et al. (2001) avaliaram a cinética de degradação térmica da 9'-cis-bixina, monitorando os produtos de degradação. Reportam que a degradação é complicada pela ocorrência de muitas reações competitivas de isomerização, as quais se desenvolvem a diferentes taxas ao longo do equilíbrio. Isto é posteriormente agravado pela simultânea e irreversível formação do composto C₁₇, (com produção associada do m-xileno), o qual pode sofrer posterior degradação produzindo mais m-xileno e também tolueno. Ainda, observaram os autores que a formação de m-xileno ocorre mais facilmente e em menor extensão o tolueno.

Com objetivo de dispor de padrão analítico, não disponível comercialmente, Scotter et al. (1994) isolaram e purificaram a cis e trans bixina assim como seus compostos de hidrólise, os isômeros da norbixina. As amostras foram analisadas, identificadas e caracterizadas empregando-se HPLC por fase reversa com detecção por feixe de fotodiodo. A espectrometria de massa, RNM H, infravermelho e espectrofotometria no UV, também foram empregadas como técnicas analíticas.

Najar et al. (1988) monitoraram a degradação da bixina, proveniente de um extrato bruto, sob efeito da luz. Amostras com massas idênticas de bixina, solubilizadas em clorofórmio foram submetidas a diferentes intensidades de radiação, na presença de oxidantes e/ou (ar ou peróxido de benzoíla) e/ou antioxidante (palmitato de ascorbila). Após 12 dias de ensaio, a 24° C, os dados obtidos foram confrontados com amostras, não submetidas àqueles fatores. Concluíram os autores, que a ação luz afeta muito mais a degradação que o oxigênio. Na Tabela 5 são reportados os dados obtidos pelo Autor na qual são apresentados as condições experimentais empregadas e os valores encontrados para a taxa de decomposição, o período de meia vida e o percentual de bixina de cada experimento após o décimo segundo dia de avaliação.

Tabela 5– Determinação da Taxa de Decomposição da bixina

Experimento	Condição experimental	$K \times 10^{-2}$ (dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	Bixina após 12 dias (%)
1	Ar, iluminação ^a 100W, 1380 lux	17,4	4	73,1
2	Ar, escuro	0,9	75	98,2
3	N ₂ , 100W iluminação ^a , 1380 lux	12,0	6	76,2
4	N ₂ , escuro	–	–	100,0
5	Ar, iluminação 40 W , 430 lux,	2,4	28	83,9
6	Ar, iluminação 100 W , 1380 lux, 10% palmitato de ascorbila	5,7	12	85,9
7	Ar, iluminação 40 W, 430 lux, 10% palmitato de ascorbila	1,4	49	94,7
8	Ar, 40W iluminação, 430 lux, 20% palmitato de ascorbila.	1,2	58	96,0
9	Ar, escuro 10% palmitato de ascorbila	0,9	77	88,5
10	Ar, escuro 2,5 % palmitato de ascorbila	8,0	9	81,0

(a) Lâmpada de tungstênio (Osran Catálogo, 1985). Os tubos foram expostos à fonte de luz à distância de 17,5 cm, (b) % em w/v., (d) (Scooter, et al., 2001).

A preocupação quanto à possibilidade dos corantes apresentarem contaminação com microorganismos incorporados durante as fases de processamento e embalagem levou Otake et al. (1993) a avaliar o emprego de irradiação como forma de esterilização de uma amostra de urucum. Submeteu a amostra, previamente contaminada com *Bacillus subtilis* a um feixe de elétrons (2,5 KGy a 40 KGy). Conclui que o emprego de radiação levou a uma redução na cor do pigmento muito inferior à provocada pelo emprego de esterilização térmica. Concluindo assim ser uma alternativa viável.

2.7.6 ESTABILIZAÇÃO/CONSERVAÇÃO

Ainda que não se consiga total estabilização de compostos carotenóicos, cuidados especiais, tomados para inibir sua degradação e conseqüentemente assegurar maior tempo de conservação destas substâncias são aconselhados para a preservação de suas características originais. Portanto é fundamental o acondicionamento em temperaturas reduzidas como as de um freezer, além da total proteção contra radiação luminosa.

Uma atmosfera de nitrogênio é recomendada durante as fases de isolamento, processamento e embalagem do produto, no sentido de evitar o efeito nocivo do oxigênio sobre a cadeia poliênica de muitos carotenóides. A incorporação de antioxidantes como palmitato de ascorbila, butil-hidroxitolueno (BHT) ou pirogalol, é outra prática por vezes adotada, quando da formulação de alimentos ou fármacos contendo estes compostos (Fontana et al., 1997).

O encapsulamento tem sido uma medida adotada para proteger substâncias de reduzida estabilidade. As ciclodextrinas; hexa, hepta e octa-maltosacarídeos cíclicos derivados do amido, também conhecidos como: α , β e δ cilodextrinas, com sua conformação tubular tronco cônica, têm sido exploradas com o propósito de encapsular moléculas lipossolúveis. A superfície externa, circundada por grupamentos hidroxílicos torna esta molécula solúvel, particularmente em água. Na cavidade apolar, formada no interior de uma molécula de ciclodextrina, compostos lipossolúveis são facilmente ocluídos. Uma vez alojados, ficam mais protegidos de agentes nocivos como calor, oxigênio, radiação como também da interação com outras substâncias. Alquilação, carboxilação ou hidroxialquilação são também efetuadas como forma de modificar as ciclodextrinas, no sentido de aumentar suas propriedades de hidrossolubilidade e capacidade de incorporação de substâncias lipofílicas.

Outra vantagem associada a esta oclusão molecular refere-se à possibilidade de controle de liberação de um princípio ativo, que pode ser conseguido de forma lenta e progressiva, dentro do organismo consumidor. Segundo Fontana et al. (1997), a estratégia de encapsulamento, além da liberação modulada do princípio ativo retido na cavidade funcional da ciclodextrina, propicia mecanismo protetor de alta eficiência justamente contra os fatores ambientais que são altamente destrutíveis à estrutura nativa e livre dos carotenos: vapores ácidos ou oxidantes, luz, calor e oxigênio. A combinação destes fatores leva, indubitavelmente, à geração de alterações estruturais, as quais, não obstante a manutenção da cor, ainda que alterada, podem não mais responder pela propriedade biológica otimizada desejada.

2.8 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR ADSORÇÃO

A adsorção é aplicada em processos de separação no qual certos componentes de uma fase gasosa ou líquida são seletivamente transferidos para a superfície sólida de um adsorvente. Este processo permite conduzir separações por vezes muito difíceis ou mesmo impossíveis de serem conseguidas por técnicas mais convencionais como a destilação ou sistemas baseados em membranas (Knaebel, 1995).

Distintas são as interações presentes em um processo adsorptivo. A adsorção física é causada principalmente por forças de van der Waals e forças eletrostáticas entre moléculas do adsorbato e átomos que compõem a superfície do adsorvente. Sendo assim, um adsorvente é primeiramente caracterizado pelas propriedades de sua superfície tais como área superficial e polaridade (Suzuki, 1990). Da mesma forma diferentes forças de interação estão presentes entre as moléculas do soluto e a fase solvente. São quatro as mais importantes formas de interação entre moléculas do solvente e soluto, as quais têm grande contribuição na cromatografia líquida: dispersão, dipolo, pontes de hidrogênio e interações dielétricas (Snyder et al., 1979).

Os processos cromatográficos estão embasados em fenômenos de adsorção. A cromatografia é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, decorrente de diferentes interações de duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (Cass et al., 2001).

Segundo Qing et al. (2002), o isolamento de carotenóides usualmente emprega cromatografia em coluna ou CCD, enquanto a etapa de purificação final é conduzida posteriormente por HPLC. De um modo geral, pode-se dizer que, a cromatografia líquida e a CCD são as técnicas mais aplicadas, quando os compostos em estudo são moléculas complexas e susceptíveis a degradação por outros procedimentos que envolvam processos de aquecimento. Quando, entretanto, a substância isolada está sujeita a oxidação, alguns cuidados são normalmente tomados, evitando sempre que possível sua exposição ao ar. Neste aspecto a CCD está mais sujeita aos referidos danos, por expor o composto a uma grande superfície. A incorporação de antioxidantes à solução contendo os compostos de interesse é uma solução por vezes adotada, para minimizar os efeitos nocivos da oxidação tanto durante as fases de extração quanto na etapa final de análise (Fontana et al., 1997).

2.9 CROMATOGRAFIA

A cromatografia em coluna foi primeiramente empregada em 1906 pelo botânico russo M.S.TSWETT para isolar pigmentos de plantas. Outra configuração, a forma aberta denominada cromatografia em camada delgada, *Thin-Layer Chromatography* (CCD), foi introduzida no início da década de 50 por KIRCHNER e posteriormente popularizada por STAHL, (Snyder et al., 1979).

Citam Cass et al. (2001), que o primeiro tratamento matemático da teoria da cromatografia foi desenvolvido em 1952 por Martin e Synge, rendendo a estes pesquisadores o premio Nobel.

Três tipos de fluidos com amplas diferenças de propriedades físico-químicas; líquidos e gases, de baixa e alta densidade (incluídos aqui os gases no estado supercrítico) podem ser empregados como fase móvel (Guiochon, 1993). A Cromatografia líquido-sólido, ou cromatografia por adsorção é o mais antigo método cromatográfico empregado. Sua clássica forma concebida por Tsweet, também conhecida por cromatografia em coluna ainda hoje é amplamente empregada. São quatro os mecanismos de separação ou processos responsáveis pela retenção do soluto pela fase estacionária. Estes em consequência conduzem a quatro métodos básicos: além do líquido-sólido têm-se: líquido-líquido (partição), a troca iônica e a exclusão por tamanho.

No primeiro grupo, a interação do soluto com a fase estacionária ocorre diretamente nos sítios do adsorvente sólido. Na segunda modalidade a superfície ativa da fase estacionária compõe-se de um líquido. Este líquido pode estar simplesmente adsorvido a superfície do suporte sólido ou imobilizado, ligado quimicamente ao suporte. Na troca iônica, a fase estacionária contém grupos iônicos, catiônicos e aniônicos ligados ao suporte. Por fim na última modalidade, também denominada de cromatografia em gel, a fase estacionária compõe-se de partículas com poros de distintas dimensões que impedem determinados solutos de permearem através destes poros, fazendo com que percolem mais rápido a coluna (Snyder et al., 1979).

Outra modalidade, distinta das anteriores, a cromatografia por afinidade conduz a um processo de separação muito mais seletivo. A presença de um composto ou terminal reativo ligado à fase estacionária permite uma ligação diferenciada, selecionando de forma específica um composto. Desta forma, por exemplo, a ligação de um anticorpo à fase estacionária possibilita a retenção de um antígeno específico ao ser percolado através da coluna. A remoção do adsorbato é conseguida após a eluição da coluna com uma solução que possua condições de diminuir a interação antígeno/anticorpo, tais como; maior força iônica, pH, a presença de um tenso ativo ou um solvente com diferente polaridade.

Quando na cromatografia líquida a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, recebe a denominação de cromatografia por fase normal. Na cromatografia por fase reversa a fase estacionária apresenta polaridade menor que o solvente. Os adsorventes mais empregados na cromatografia por fase normal são a sílica e a alumina, enquanto para a fase reversa são empregadas fases polares quimicamente ligadas, tendo como grupos ativos terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino ou apolares, contendo terminações hidrocarbonetos, dentre estes os mais comuns são C₈ e o C₁₈.

A cromatografia por fase reversa é tipicamente mais eficiente e apresenta maior versatilidade e reprodutibilidade. Embora muitos compostos orgânicos apresentem limitada solubilidade em água, isto não é problema quando se trata de processo analítico, visto que as massas normalmente necessárias para a análise são muito pequenas. Por outro lado, quando a solubilidade é excepcionalmente baixa ou ainda, quando o analito apresenta instabilidade frente à água, pode-se optar pelo uso de solventes polares não aquosos ou alternativamente usar-se a cromatografia em fase normal (Snyder et al., 1997).

Na cromatografia por fase normal, os eluentes freqüentemente empregados são solventes orgânicos. Além da sílica, ou ocasionalmente alumina, empregada como fase estacionária, fases quimicamente ligadas, com elevada polaridade, como ciano, dióis ou amino, suportados em sílica são por vezes empregadas. Este método de separação tem sido normalmente realizado para separar compostos neutros ou, em menos freqüentemente, compostos ionizáveis. Para otimizar a separação de compostos orgânicos, ácidos ou básicos, a mudança da polaridade pode ser conseguida com a incorporação de: água, um ácido ou uma base orgânica na composição do solvente. A separação por fase normal também é conveniente nas seguintes situações: e quando maiores quantidades de amostra são requeridas, quando é necessário melhorar a sensibilidade à detecção, e quando do isolamento de uma banda cromatográfica, para posterior identificação.

Neste aspecto são mais baratas que as fases reversas, e comportam também maior carga de amostra, sendo inclusive mais estáveis frente a extremos de pH. Por estas qualidades são preferidas em processos de cromatografia preparativa. Outras vantagens devem ser destacadas na cromatografia por fase normal: Boa seletividade para compostos com diferentes números de grupos funcionais, e ótima diferenciação entre misturas isômeras. Contudo, no que se refere à seletividade para homólogos mostra-se ineficaz frente à fase reversa (Snyder et al., 1979; 1993; 1997).

2.9.1 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

A técnica cromatografia tem sido com freqüência empregada para separar substâncias contidas em misturas complexas. Processos contínuos em contracorrente são normalmente empregados para separar compostos obtidos de processos biotecnológicos. Encontra-se também presente em processos separação e purificação da indústria petroquímica, farmacêutica e química fina. Alguns parâmetros são de fundamental importância na cromatografia preparativa são eles: seletividade, eficiência, capacidade de carga da fase estacionária e velocidade máxima do processo. Determinados aspectos econômicos devem também ser considerado: produtividade (quantidade de produto por unidade de tempo e por quantidade de fase estacionária); consumo de eluente; custo tanto do eluente quanto da fase estacionária; diluição do produto, além do custo de recuperação do solvente na etapa posterior de isolamento do extrato.

Quando a eficiência de uma corrida cromatográfica não é suficientemente para conduzir a uma boa separação, tem-se como opção aumentar o diâmetro da coluna ou empregar diâmetro menor das partículas. Contudo, esta prática leva a um aumento da pressão. Uma solução alternativa é conduzir o extrato pré-purificado a um posterior reciclo.

A cromatografia preparativa pode servir para o isolamento na ordem de miligramas, para elucidação de estrutura ou, para o isolamento de amostra na ordem de gramas a quilogramas que poderão ser destinadas à pesquisas sistemáticas ou para síntese. No primeiro caso é importante a eficiência de separação. No segundo, é de fundamental interesse a quantidade isolada por tempo de operação (Snyder et al., 1993).

Quantidades maiores de material purificado usualmente requerem condições de operação diferentes daquelas aplicadas em processos analíticos (Snyder et al., 1979). Num processo de separação cromatográfica, os parâmetros; resolução, velocidade de separação, carga de amostra e capacidade do adsorvente estão inter-relacionados. Ao se fazer a otimização de um dos parâmetros, normalmente comprometemos os outros. Enquanto na cromatografia analítica, velocidade e resolução são imprescindíveis e, a quantidade de amostra desprezada, na cromatografia preparativa o foco é voltado para a massa purificada, de forma que deve ser enfatizada a capacidade da coluna. Este requisito, para ser alcançado usualmente, compromete a velocidade e/ou a resolução. O fator de retenção k' na cromatografia analítica experimenta insignificante alteração em função da massa de amostra, uma vez que esta se apresenta muito diluída ($<1\text{mg/g}$). Para otimizar a separação de massas maiores o processo é conduzido em colunas com diâmetros maiores onde se emprega sobrecarga de amostra, maior que $1\text{mg} / \text{g}$ de fase estacionária. Nesta condição, os valores de k' são reduzidos na ordem de 10% ou mais, comparados àquele obtido no processo analítico. Isto em consequência leva à redução da eficiência da coluna. Ainda assim, é preferível a sobrecarga de concentração (em massa) àquela de volume. Ainda, na operação em sobrecarga pode-se aumentar a eficiência aumentando-se o comprimento da coluna. Contudo, a mais eficaz alternativa para melhorar a eficiência repousa no ajuste da seletividade. Segundo Snyder et al. (1979), embora α e k' reduzam com o aumento da quantidade de amostra, a resolução nestas condições é pouco afetada pelo aumento da velocidade da fase móvel. Desta forma, pode-se processar uma maior massa por unidade de tempo com adequada resolução, operando-se com uma maior vazão através da coluna.

A purificação em escala piloto de um determinado princípio ativo contido em um extrato, é frequentemente obtida por cristalização. Este processo, entretanto ainda que leve a obtenção de um produto de elevada pureza, pode demandar muito tempo. A cromatografia preparativa flash traz como vantagem a supressão da lenta fase de cristalização acima citada. Desta forma esta técnica tem sido extensivamente empregada em processos de síntese, onde pureza e rendimento são críticos. Nestes processos como também no isolamento de um princípio ativo contido em uma matriz complexa, a técnica de purificação via cristalização normalmente não conduz a bons resultados. Por outro lado, a cromatografia flash leva a resultados consistentes possibilitando a obtenção de produtos com elevada pureza, os quais em muitos casos são facilmente cristalizados em uma etapa posterior.

A cromatografia flash, também conhecida como cromatografia à média pressão foi introduzida por W.C.STILL em 1978 e caracteriza-se pela aplicação do eluente a uma coluna cromatográfica preparativa, normalmente operada pressurizada. É uma forma rápida e eficiente de separação cromatográfica e de custo relativamente baixo. Com o emprego desta técnica é possível purificar desde pequenas massas de substância até cerca de 10 gramas em menos de 15 minutos, sendo ideal para preparação de padrões de elevada pureza ou mesmo para a purificação de maiores quantidades de produtos, de elevado valor, provenientes de um meio reacional. Esta técnica está correlacionada diretamente aos resultados da cromatografia de placa (CCD). Sendo assim, para otimizar as condições de separação, um adequado ajuste da composição da fase eluente conduz a melhor condição de operação da coluna. Para uma eficaz separação é desejável que o componente que se deseja isolar apresente um fator de retenção (Rf) de 0,35 e uma diferença entre os componentes adjacentes maior que 0,15.

Na cromatografia flash utiliza-se normalmente sílica de 40 a 60 microns de diâmetro, o que permite elevadas taxas de fluxo e eficiente separação, operando em pressões de 40 a 100 psi. Estas condições permitem um fácil *scaleup* de uma planta de pesquisa para uma planta piloto ou mesmo industrial. Adsorvente de maior diâmetro de partícula (63-200 microns) também são empregados, apresentando, contudo baixa resolução. Por outro lado partículas de diâmetro menores que 40 microns não apresentam grandes ganhos na resolução. O fator de retenção (Rf) obtido na CCD correlaciona-se diretamente à separação na coluna, sendo o primeiro inversamente proporcional ao fator de retenção na coluna flash, medido em unidade de volume de coluna.

Uma variante operacional da cromatografia em coluna que tem se destacando atualmente é o leito móvel simulado. A principal vantagem apresentada por este processo de separação refere-se à obtenção de frações puras, com baixa diluição. No entanto, apresenta como desvantagem a impossibilidade de separar misturas complexas, separando-se apenas duas correntes. Existe ainda uma restrição isocrática de diluição por constante permuta de solvente. Nesta tecnologia de separação. O adsorvente encontra-se em colunas separadas (de 6 a 12) as quais são conectadas em série formando um circuito. Na parte superior de cada coluna estão presentes 4 válvulas de três vias, através da qual se permuta a alimentação do extrato bruto, o eluente, o refinado (composto menos retido) e o extrato purificado obtido (o mais retido). A cada ciclo, só uma válvula está ativa em cada coluna. A seqüencial troca das correntes no circuito simula o movimento da fase estacionária.

2.9.2 VARIÁVEIS E PARÂMETROS OPERACIONAIS NA CROMATOGRAFIA

O conhecimento e adequado controle de determinados parâmetros relacionados aos processos de separação cromatográficos são de extrema relevância na condução de um processo de separação cromatográfica. Alguns destes parâmetros serão tratados abaixo.

Força do solvente e polaridade.

A força do solvente bem como a polaridade deste são parâmetros de fundamental importância em um processo de separação cromatográfica. Segundo Sewell et al. (1994), as três mais comuns medidas de polaridade são o parâmetro de força de solvente de SNYDER ϵ^o , o parâmetro de solubilidade de HILDEBRAND δ e o parâmetro de polaridade de solvente P'' .

As interações das moléculas do soluto com as moléculas do solvente resultam de quatro tipos de forças: dispersão, dipolo, pontes de hidrogênio e interações dielétricas. Quanto maior estas forças atuando em conjunto, maior a atração entre solvente e soluto. A polaridade de um solvente ou de um soluto é caracterizada pela presença das referidas interações. De forma que, quanto mais polar mais intensas serão as interações resultantes, sendo, portanto a força do solvente definida por ϵ^o , diretamente relacionada à sua polaridade. Solventes polares preferencialmente atraem e dissolvem solutos polares. Na cromatografia por fase normal ou adsorção, a força do solvente aumenta com a polaridade deste, ocorrendo o inverso na fase reversa. No apêndice são mostrados os valores de polaridade para diferentes solventes.

Polaridade de uma mistura de solventes.

A polaridade P' de uma mistura de solventes é a média ponderada dos valores de polaridades dos solventes puros P_a e P_b relacionada às suas frações volumétricas na mistura ϕ_a e ϕ_b :

$$P' = \phi_a P_a + \phi_b P_b \quad (1)$$

O incremento em 10 % na fração volumétrica de um dos solventes acarretará, por exemplo, uma mudança na polaridade anterior m $0,1 \times (P_b - P_a)$, (Snyder et al., 1979).

Seletividade do solvente.

Uma vez selecionada a fase móvel, e sua composição volumétrica resultou em um valor de k' adequado à separação, pode ocorrer que duas ou mais bandas ainda estejam se sobrepondo. Diante disto, uma mudança na seletividade deve ser pesquisada, de forma a otimizar a separação.

De acordo com Snyder et al. (1979), isto é facilmente alcançado, pela mudança da seletividade da fase móvel, porém com a manutenção da força do solvente, o que se consegue, procedendo à variação na composição da fase móvel. Se por exemplo, tivermos uma mistura de solventes: A (hexano), não polar, ($P_a \leq 1$) e B (clorofórmio) polar, tal que a proporção empregada na mistura tenha conduzido a um valor de polaridade P' e conseqüente k' adequados a um determinado perfil de separação, pode-se mudar a seletividade do solvente, pela substituição de um dos componentes da mistura, por exemplo, B por C (éter etílico). A força do solvente será a mesma se mantivermos constante o produto ($\phi_b P_b$), parcela a ser substituída na equação (1).

A concentração volumétrica do solvente C na nova mistura deverá ser:

$$\phi_c = \phi_b \left(\frac{P_b}{P_c} \right) \quad (2)$$

O emprego de misturas solvente que possua maior polaridade em relação a outro permite um adequado ajuste de polaridade da fase eluente. A escolha dos solventes componentes da mistura, quanto o percentual destes na composição determina a polaridade da

fase móvel que, em consequência interferem diretamente na taxa de eluição dos compostos a serem separados. Na cromatografia líquida por fase normal, quanto maior a polaridade do sistema solvente mais rápida a eluição dos compostos polares, ocorrendo o inverso na cromatografia por fase reversa.

Quando se processa a troca de um solvente da mistura com objetivo de alterar a seletividade é conveniente ajustar o percentual do novo solvente mantendo, porém a mesma força da mistura anterior. Encontra-se na literatura, nomogramas que facilitam este procedimento. Entretanto, na cromatografia por fase normal, quando se misturam fases móveis de mesma força, a força da mistura resultante freqüentemente muda para um valor mais elevado, de forma que, são requeridos mais experimentos para se obter a mistura adequada. Grandes mudanças de seletividade podem ser obtidas pela apropriada troca de um dos solventes da mistura. Por exemplo, a substituição em uma mistura de um solvente polar B (ex. metanol), por outro homólogo C (propanol) pode não alterar muito a seletividade, pois ambos são solventes doadores de prótons. Por outro lado, a troca por um solvente receptor de próton como o éter etílico, favoreceria a interação com solutos doadores os quais teriam forte interação com a nova fase móvel. No caso de um solvente que tenha um grande momento de dipolo como o diclorometano, moléculas com fortes grupos de dipolos passariam a fase móvel.

Rohrschneider (1973) classificou os solventes segundo propriedades que afetam a seletividade como; a acidez, basicidade e polaridade. Estes parâmetros foram empregados para a elaboração de um diagrama triangular, conhecido como solvent-selectivity triangle (SST) em cujos vértices situa-se cada uma das três propriedades puras. De forma que, uma determinada região interna ou delimitada pelo diagrama corresponde a uma mistura solvente que associa propriedades, proporcional ao percentual de cada um dos componentes da mistura. Os solventes mais empregados foram enquadrados em oito classes, sendo que cada classe, ocupa uma região específica dentro do diagrama de acordo com a sua propriedade como solvente associada às três características citadas. Sendo assim, têm-se os seguintes grupos: I- receptores puros (éter e amina); II. doadores-receptores (álcool) e VIII doadores puros (clorofórmio). Os outros grupos são solventes que apresentam propriedades intermediárias.

Segundo Snyder et al. (1993), vários processos têm sido propostos para a classificação da seletividade de solventes. Estes trabalhos e outros esquemas para escolha da seletividade

do solvente, assumem a possibilidade de separar força e seletividade de um solvente. Muitos destes esquemas relacionam as forças de atração entre solvente e moléculas do soluto, com ênfase nas interações de dipolares e ligações de hidrogênio. Assim a classificação de um determinado solvente como possuidor de uma característica pura pode conduzir as distorções. Isto em consequência conduz a distinção de diferentes solventes em termos de sua relativa acidez por pontes de hidrogênio, basicidade e momento de dipolo.

A classificação do álcool como ácido, da dioxana como básica e o nitrometano como dipolar, desconsiderando que na verdade eles são capazes de experimentar mais de um tipo de interação pode conduzir a misturas com propriedades um pouco diferentes da esperada. O álcool, por exemplo, é certamente, dipolar, prótico e um bom receptor de prótons.

Na classificação da seletividade de um solvente por aproximação (modelo solvatocrômico) os valores da dipolaridade de um solvente, pontes de hidrogênio e basicidade foram obtidos por metodologia espectroscópica e outras técnicas específicas, processadas no sentido de medir cada forma isolada de interação, diferente daqueles obtidos pela interação do solvente com um composto tomado como referência.

Os valores dos parâmetros: α - que representa a capacidade do solvente de interagir como doador de hidrogênio frente a um soluto básico, β - representando a capacidade do solvente de agir como receptor de hidrogênio diante de um soluto prótico e π^* a capacidade do solvente de interagir com um soluto por fatores de polarização e dipolo, foram desenvolvidos dentro do contexto de relações de energia de solvatação (LSERs), *Linear Solvation Energy Relationships*.

$$\log k' = SP_0 + m\delta_H^\Sigma + S(\pi^* - d\delta_{KT}) + a\alpha + b\beta \quad (3)$$

onde:

k' = um fator de capacidade cromatográfica;

SP^0 = fator do soluto (interceptação do);

δ_H = parâmetro de solubilidade de Hildebrand;

$d\delta_{KT}$ = fator de correção de polarizabilidade (capacidade de polarização);

m, s, a e b estão relacionados aos testes de dimensão do soluto, basicidade, acidez e dipolaridade/polarizabilidade respectivamente.

Somados os valores de α , β e π^* , para cada solvente, as fração dos coeficientes de interação, α/Σ , β/Σ e π^*/Σ expressam os coeficientes de (acidez), (basicidade) e (dipolaridade) respectivamente. Organizados em um diagrama triangular, permitem ajuste de seletividade de uma determinada mistura solvente nos mesmos moldes propostos por outros diagramas triangulares empregados para este fim.

Encontra-se em Snyder, et. al (1979;1997) exemplo destes diagramas.

Fator de separação.

O fator de separação α_{12} entre duas substâncias 1 e 2 mede a seletividade para duas bandas adjacentes em um cromatograma, e representa a facilidade com que estas substâncias podem ser separadas, estando relacionado ao equilíbrio entre o soluto nas fases adsorvidas e aquele presente na solução. Tem analogia a volatilidade relativa numa coluna de destilação e é representado por:

$$\alpha_{12} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{sendo,} \quad k_1 = \frac{y_1}{x_1} \quad \text{e} \quad k_2 = \frac{y_2}{x_2}, \quad (4)$$

onde: y_i e x_i são as frações molares na fase líquida e na fase sólida respectivamente e k_i a constante de equilíbrio entre as duas fases, similar ao coeficiente de partição no equilíbrio (Wankat, 1986).

Retenção na cromatografia.

O adequado controle na retenção de um composto em relação a outro, em um processo cromatográfico é a chave para o sucesso de separação. Na cromatografia em coluna a retenção é uma medida quantitativa da migração, sendo definida pela razão entre a velocidade da amostra e a velocidade da fase móvel,

$$R = \frac{u_x}{u_o}, \quad (5)$$

podendo ser também expresso em função do tempo de retenção da amostra em relação ao solvente por,

$$R = \frac{t_o}{t_r}, \quad (6)$$

em que t_r é o intervalo de tempo entre a injeção da amostra e o pico máximo e t_o é o tempo de eluição de um soluto não retido (Cass et al., 2001).

Na cromatografia em camada delgada a retenção, designada como Rf , é o quociente da distância de migração do soluto desde a linha de base, pela distância percorrida pela fase eluente, no mesmo intervalo de tempo (Stahl, 1969).

Quando uma amostra, transportada pela fase líquida, entra em contato com a fase estacionária ocorrerá a distribuição entre as duas fases de acordo com o valor do coeficiente de distribuição. Tanto maior a afinidade do soluto com a fase estacionária, mais retida a amostra e, de acordo com a equação (4), $k_1 = \frac{y_1}{x_1}$, maior o valor de x_1 . Conseqüentemente menor será o valor do coeficiente k_1 . Desta forma a amostra permanecerá mais tempo no interior da coluna. O soluto adsorvido, ao ser percolado por um solvente puro, restabelece novamente o equilíbrio de distribuição, desorvendo e difundindo-se neste novo solvente, sendo então transportado por ele até encontrar um adsorvente com superfície livre sobre a qual reabsorverá. O processo se repete até o soluto sair da coluna. As diferentes taxas de migração são, portanto devidas ao tempo (t_s) que as diferentes espécies permanecem na fase estacionária. Sendo assim, um soluto com baixo coeficiente de distribuição, terá um menor número de moléculas na fase estacionária, num mesmo intervalo de tempo, que um outro soluto que apresente maior afinidade com aquela fase. Desta forma, este último migrará mais rápido da coluna. Temos então que, o tempo de retenção é inversamente proporcional ao coeficiente de distribuição (Sewell et al., 1994).

$$R_m \propto \frac{1}{k} \quad (7)$$

O tempo total de retenção é a soma do tempo que o soluto permaneceu na fase estacionária mais aquele em que esteve na fase móvel.

$$t_R = t_m + t_s \quad (8)$$

Volume de retenção.

A retenção numa coluna está relacionada à fração de moléculas presentes na fase móvel e aquele presente na fase estacionaria. O quociente entre a velocidade de deslocamento da banda de soluto e a velocidade da fase móvel, é definido como fator de retardo R :

$$R = \frac{\overline{u_x}}{\overline{u_m}} \quad (9)$$

onde,
$$\overline{u_x} = R\overline{u_m} \quad (10)$$

Desde que as moléculas do soluto só migram quando estão na fase móvel, a velocidade com que o soluto se desloca através da coluna depende diretamente do número de moléculas presentes na fase móvel. Sendo assim R também pode ser definido como:

$$R = \frac{n_s}{n_s + n_m} \quad (11)$$

onde n_s corresponde à fração de moléculas na fase estacionária e n_m a fração na fase móvel. A relação $\frac{n_s}{n_m}$ é definida como fator de capacidade k' (Snyder et al., 1997). Logo fazendo-se as substituições podemos ter R expresso em função do fator de capacidade.

$$R = \frac{1}{1 + k'} \quad (12)$$

Podemos também relacionar os parâmetros; velocidades da banda e da fase móvel ao fator de capacidade tal que:

$$u_m = u_x(1 + k') \quad (13)$$

Ainda, como a velocidade de deslocamento da banda e da fase móvel, está relacionada ao comprimento da coluna através dos respectivos tempos de retenção, tem-se que:

$$\overline{u_x} = \frac{L}{t_R} \quad (14)$$

$$\bar{u}_m = \frac{L}{t_m} \quad (15)$$

Substituindo-se as equações. 14 e 15 na equação.13 teremos:

$$t_R = t_m(1 + k'). \quad (16)$$

Por definição, a concentração de soluto nas fases sólidas C_s , e na fase móvel C_m é obtida pelo quociente da fração de moléculas do soluto nas fases sólida e móvel respectivamente em relação ao volumes das correspondentes fases V_s e V_m , assim:

$$C_s = \frac{n_s}{V_s} \quad (17)$$

$$C_m = \frac{n_m}{V_m} \quad (18)$$

$$n_s = C_s V_s \quad (19)$$

$$n_m = C_m V_m \quad (20)$$

$$k = \frac{n_s}{n_m} \quad (21)$$

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} \quad (22)$$

Ainda, como o coeficiente ou constante de distribuição é definido por:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (23)$$

, ao se efetuar a substituição na equação 22 teremos:

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} \quad (24)$$

Substituindo-se (23) em (16) tem-se:

$$t_R = t_m \left[1 + K \frac{V_S}{V_m} \right] \quad (25)$$

Como o volume retido pode ser expresso pelo produto da vazão de percolação pelo tempo de retenção $V_R = Ft_R$. Dividindo-se a equação 25 por F, teremos:

$$V_R = V_m + KV_S \quad (26)$$

De acordo com Sewell et al. (1994), em cromatografia por adsorção, o volume da fase estacionária V_S , não é um parâmetro de fácil determinação, visto que a adsorção é um fenômeno de superfície a equação (26) no caso da cromatografia por adsorção pode ser escrita como:

$$V_R = V_m + K_A A_S, \quad (27)$$

onde K_A e A_S são coeficiente de adsorção e área superficial respectivamente.

A seleção do solvente, com relação à seletividade e força, é fator determinante no desempenho da separação cromatográfica, possibilitando melhor controle no parâmetro de retenção. A otimização da mistura solvente pode ser facilmente conduzida inicialmente pela técnica da cromatografia em camada delgada CCD, visto que são os mesmos os mecanismos de retenção envolvidos. Desta forma, os valores de R_f encontrados na CCD podem ser usados para prever os valores de k' para a cromatografia líquida, empregando-se na coluna a mesma fase estacionária (Snyder et al., 1979). A equação abaixo (28) relaciona ambos os parâmetros:

$$k' = \frac{(1 - R_f)}{R_f} \quad (28)$$

Ainda, uma vez que na cromatografia flash o fator de retenção é o recíproco do volume de coluna, (CV), é interessante que o composto de interesse tenha baixo RF na CCD. Desta forma, o composto apresentará na coluna preparativa, maior tempo de contato em relação àqueles compostos com maior RF, o que conduzirá à maior resolução. Da mesma forma para dois compostos adjacentes, uma grande diferença nos CV é desejável. Ainda, quanto maior a diferença no CV, maior a capacidade de carga da coluna.

Por exemplo, se temos na CCD, um $R_f=0,2$ para um determinado composto teremos que passar pela coluna um volume cinco vezes maior que volume do solvente contido na coluna, de forma a deslocar este componente da coluna (Still, 1978).

2.9.3 RELAÇÕES DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

As relações de equilíbrio entre o soluto adsorvido na fase estacionária e fase móvel apresentam especial importância no estudo da capacidade de um adsorvente, o que é normalmente feito na forma de gráficos. A quantidade de um determinado soluto adsorvido na fase estacionária depende da concentração presente na fase móvel. A relação entre a quantidade adsorvida, q e a concentração na fase móvel C a temperatura constante é denominado isoterma de adsorção a temperatura T . (Suzuki, 1990).

$$q = q(C) \quad \text{a } T. \quad (29)$$

Outras formas de expressar estas relações de equilíbrio também são empregadas. As isosteres apresentam curvas para um grau específico de carga, em função da pressão parcial ou ponto de orvalho, contra o recíproco da temperatura absoluta. Enquanto os gráficos denominados Isobares relacionam as cargas adsorvidas, como função da temperatura, para uma dada pressão parcial ou outra forma de medida de concentração. Estes dois tipos de gráficos oferecem vantagem de linearidade em certos sistemas possibilitando facilidade de extrapolação, (Knaebel, 1995).

Isotermas de adsorção.

Segundo Ruthven (1984), Brunauer e colaboradores classificaram as isotermas para adsorção física em cinco classes. O modelo teórico mais simples para adsorção, as isotermas de Langmuir, originalmente desenvolvidas para representar quimiosorção em monocamada, assume as seguintes restrições:

- as moléculas são adsorvidas e fixadas a um número bem definido de sítios ativos,
- cada sítio pode fixar uma única molécula de adsorbato,
- todos os sítios são energeticamente equivalentes,
- interações entre moléculas adsorvidas não estão presentes.

Diferente da adsorção em fase gasosa, na adsorção em fase líquida, ambos, soluto e solvente competem pelos sítios ativos do adsorvente (Wankart, 1986). Para soluções diluídas, o efeito do solvente pode freqüentemente ser ignorado e a equação de equilíbrio para uma solução mono-componente tem a forma:

$$q = \frac{q_{max} \cdot K_A c}{1 + K_A c}, \quad (30)$$

onde; q representa a quantidade adsorvida, q_{max} é a capacidade de saturação da monocamada, K_A a constante de equilíbrio de adsorção e c a concentração da fase móvel. (Wankart, 1986).

Um outro tipo de isoterma freqüentemente empregada é do tipo Freundlich.

$$q = KC^{1/n}. \quad (31)$$

Segundo Suzuki (1990), por não impor limite de capacidade de adsorção, esta equação é somente aplicada em soluções abaixo da concentração de saturação, pois em condições de saturação ocorrem fenômenos de condensação ou cristalização, não sendo mais significativos os fenômenos de adsorção.

Outras isotermas como as de (Brunauer-Emmett-Teller) BET e também as isotermas de (Brunauer-Deming-Deming-Teller), (BDDT) são mais aplicadas àquelas situações onde a adsorção se dá com total preenchimento dos poros através de múltiplas camadas (Knaebel, 1995).

Quando a isoterma é linear, K é constante, isto é, independe da concentração. Neste sentido, durante o deslocamento da banda através da coluna, devido ao homogêneo gradiente de concentração através do leito resulta uma máxima concentração no centro do pico, conduzindo a um pico simétrico (gaussiano). Isto significa que o pico desloca-se integralmente na mesma velocidade. O alargamento da banda e formação de cauda se dá quando diferentes fenômenos de difusão estão presentes. O pico cromatográfico produzido quando o sistema apresenta isoterma do tipo Langmuir (perfil côncavo em relação à abscissa) conduz normalmente a picos com cauda posterior ao deslocamento do pico. Enquanto para isotermas anti-Langmuir, a cauda situa-se à frente do pico. No primeiro caso, quanto maior a interação do soluto com a fase estacionária e mais fraca com a fase móvel, mais intenso será este comportamento. Na Figura 10 são apresentados exemplos de picos característicos e as correspondentes isotermas.

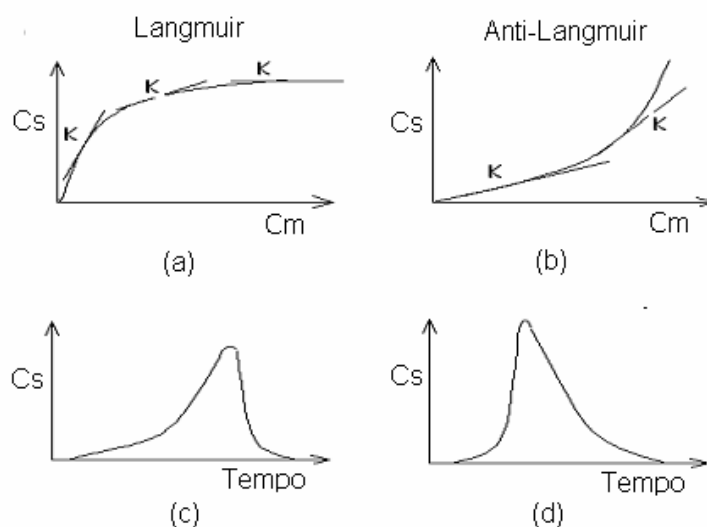


Figura10- Isotermas: (a) Langmuir, (b) anti-langmuir e (c) e (d) os cromatogramas relacionados

Como a taxa de deslocamento dada pela equação 12, é inversamente proporcional à equação 23, para a isoterma Langmuir o valor da constante K diminui com o aumento da concentração de adsorbato na fase sólida. Em consequência, a migração através da coluna não é homogênea. Onde a concentração é mais baixa, teremos um maior valor de K . Desta forma, como o centro da banda está mais concentrado moverá mais rapidamente, alcançando a frente da banda e deixando uma cauda atrás desta. Situação inversa ocorre com um sistema que apresente uma isoterma anti-Langmuir (Sewell et al., 1994).

2.9.4 DESLOCAMENTO DO SOLUTO ATRAVÉS DE UM LEITO EMPACOTADO

O fluido contendo o soluto percola através dos espaços interpartículas (macro-poros) difundindo pelo filme externo às partículas. Neste ponto, pode ocorrer adsorção na superfície externa ou difusão para o interior dos poros contendo fluido estagnado. As partículas de dimensões inferiores ao diâmetro dos poros interagem com os sítios ativos disponíveis através de mecanismos físicos, forças elétricas ou reações químicas. Enquanto adsorvido, o soluto pode difundir-se sobre a superfície. O processo inverso conduz o soluto ao filme externo e posteriormente ao fluido em movimento na coluna. Neste processo, uma dada molécula pode adsorver e dessorver muitas vezes no interior e superfície de uma mesma partícula.

Retornando ao fluido em movimento, o soluto difunde para outra partícula e todo o processo se repete. Desta forma, ao longo do processo, o soluto apresenta desde a velocidade do fluido em movimento na coluna até a velocidade zero, quando se encontra adsorvido. A separação ocorre devido ao movimento diferencial dos solutos ao longo da coluna (Wankat, 1986).

A migração diferencial ou o movimento de um composto individual através da coluna depende do equilíbrio de distribuição de cada composto entre as fases móvel e estacionária.

Vários fatores contribuem na cromatografia, para a migração diferencial como também para o alargamento da banda, são eles: a difusão de eddy ou múltiplas trajetórias; a transferência de massa nas fases móvel, estagnada e estacionária, e a difusão longitudinal, esta, apresentando efeito significativo apenas em condição de reduzida velocidade do fluido na coluna (Snyder et al., 1979). Contudo, na cromatografia líquida a grande diferença nas propriedades físicas tais como, coeficiente de difusão e viscosidade determinam efeitos marcantes na transferência de massa nas fases móvel e estacionária (Sewell, 1994).

Durante o processo de deslocamento da banda, alguma fração de soluto permanece por mais tempo retida que outras. Desta forma, para um simples componente, nem todas as moléculas de soluto eluem em um mesmo tempo. Algumas moléculas eluem numa fração de tempo menor enquanto outras demandam um pouco mais de tempo (Sewell, 1994). Isto é observado na forma Gaussiana apresentada por um cromatograma. A assimetria na forma do pico também conhecida como cauda, decorre do atraso (*tailing*) ou adiantamento (*fronting*) da frente de soluto ao se deslocar na coluna.

Segundo Snyder et al. (1997), a formação de cauda em um cromatograma pode ter origem de diversas fontes, a Tabela abaixo relaciona algumas possíveis fontes.

Tabela 6 - Fatores responsáveis pela má definição de um pico cromatográfico.

Causa de assimetria de picos
Coluna danificada; frita bloqueada ou com vazios.
Alargamento ou sujidade na entrada da coluna
Sobrecarga de amostra
Solvente inadequado
Efeito de extra-coluna
Efeito de retenção secundária (silanol) ou química
Tamponamento inadequado ou inapropriado
Contaminação com metais pesados

O efeito de sujidades (soluto fortemente retido) pode ser eliminado procedendo-se uma prévia purga, com um solvente que possua elevada interação com a fase estacionária. O alargamento de banda aumenta normalmente com o tempo de retenção.

2.9.5 MEDIDAS DE EFICIÊNCIA NA CROMATOGRAFIA

Resolução.

Para a determinação da resolução de bandas adjacentes, consideram-se as larguras das bandas W_i na linha de base como mostra a Figura 11, como também seus respectivos tempos de retenção t_i de acordo com a equação abaixo:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{(W_1 + W_2)}, \quad (32)$$

Esta equação se aplica sempre que as bandas estiverem bem resolvidas (separadas). A determinação manual da largura da banda na linha de base envolve a construção de tangentes de cada lado da banda, sendo a largura desta a distância entre a intersecção daquelas tangentes com a linha de base. Uma forma mais prática e que leva a resultados mais precisos faz uso da largura da banda a meia altura da linha de base. Esta alternativa faz uso da equação 33 é mais conveniente não exigindo extrapolação das linhas tangentes aos pontos de inflexão, sendo também mais exata.

$$R_s = \frac{1.18(t_2 - t_1)}{(W_{0,51} + W_{0,52})} \quad (33)$$

Contudo cálculos de R_s aplicando-se estas equações não são confiáveis quando apresentam valores menores que “1” (Snyder et al., 1997). Na prática, um valor de $R_s = 1$ corresponde a uma separação na ordem de 94 %, isto é 94% do pico é puro e os outros 6% restantes estariam contaminados com o componente de banda adjacente sobreposta (Sewell et al., 1994).

Na Figura 11 é apresentado um pico cromatográfico típico onde são mostrados: a largura a meia altura (B), a largura na base (C), o tempo de retenção e a altura do pico (D).

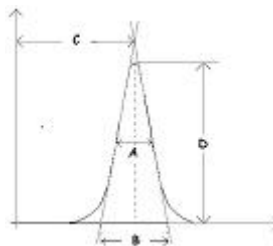


Figura 11 – Pico cromatográfico típico.

A presença de bandas adjacentes, parcialmente sobrepostas em um cromatograma, é ilustrada na Figura 12, onde T_1 e T_2 correspondem aos tempos de retenção dos picos 1 e 2, W_1 e W_2 as larguras dos picos e $W_{1/2}$, largura dos picos a meia altura.

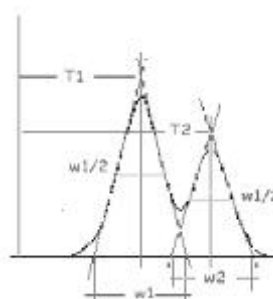


Figura 12 Cromatograma com banda adjacentes.

Assimetria de pico.

A assimetria de um pico é a medida do quociente $\frac{CB}{AC}$ conforme mostra a Figura (13).

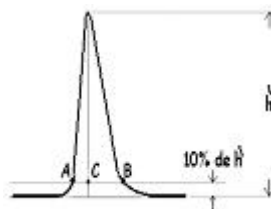


Figura 13–Pico cromatográfico assimétrico.

Número de pratos teóricos.

A eficiência de uma separação cromatográfica está relacionada à forma e boa definição dos picos. Quanto mais estreito, simétrico e alongado o pico, mais eficaz é a coluna. O alargamento da banda cromatográfica está normalmente relacionado ao aumento do tempo

de retenção, implicando na redução da eficiência. A eficiência de uma coluna é freqüentemente expressa pelo número de pratos teóricos (N), ou pela altura equivalente de um prato teórico (HETP) ou simplesmente H (Sewell et al.,1994). Cada prato corresponde a estágio de equilíbrio do soluto entre as duas fases. Na cromatografia em coluna, o número de pratos teóricos é calculado a partir do cromatograma. Vários são os métodos disponíveis para a determinação de N. O método absoluto, mais indicado para picos assimétricos faz uso da variância do segundo momento central σ_t^2 sendo expresso pela equação:

$$N = \frac{(t_R)^2}{(\sigma_t)^2}, \quad (34)$$

onde: t_R é a medida do tempo de retenção do pico. Quando os picos são simétricos pode-se empregar uma das três equações abaixo:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{t_w} \right)^2, \quad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{t_{1/2}} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 2\pi \left(\frac{h'' t_R}{A} \right)^2, \quad (35)$$

onde: t_w é a distância na linha de base entre a interseção das tangentes anteriores e posteriores do pico. $t_{1/2}$ é a largura do pico a meia altura e, h' e A são respectivamente a altura e área do pico.

Segundo Snyder (1979), estas formas de cálculo são empregadas com picos com assimetria de até 1,2. Acima deste valor os erros são significativos.

Altura equivalente de um prato teórico.

Relaciona o número de pratos e o comprimento da coluna. Este parâmetro serve para comparar a eficiência entre colunas de diferentes comprimentos. Por definição:

$$H = \frac{L}{N} \quad (36)$$

Altura do prato reduzido.

Correlaciona a altura de um prato teórico com o diâmetro de partículas e serve para comparar a eficiência entre colunas de diferentes comprimentos empacotadas com partículas de diferentes diâmetros.

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (37)$$

Este parâmetro permite estimar o desempenho de uma coluna em função de condições experimentais.

Como a velocidade da fase móvel através da coluna pode também afetar seu desempenho, outra correlação reduzida pode ser empregada como ferramenta de avaliação, sendo definida como velocidade reduzida:

$$v = \frac{ud_p}{D_m} \quad (38)$$

Sendo u a velocidade da fase móvel e D_m o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel (Snyder et al., 1979).

2.9.6 OTIMIZAÇÃO DE UMA COLUNA-CONTROLE DA RESOLUÇÃO

A equação:

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right)(\alpha - 1)\sqrt{N} \left[\frac{k'}{(1 + k')} \right], \quad (39)$$

relaciona parâmetros cromatográficos à resolução. Os parâmetros presentes na equação podem ser alterados para melhorar a resolução de uma coluna. O aumento no fator de separação resulta no deslocamento de uma banda em relação a outra, não alterando de forma significativa as alturas dos picos para moderadas mudanças no valor de α . Por outro lado, um incremento no valor de N , conduz a um estreitamento das bandas e também um aumento na altura dos picos, enquanto o tempo de separação não sofre grande alteração pela variação tanto de α quanto de N . Em contrapartida, variação no parâmetro k' produz significativo efeito na resolução, contribuindo para grandes mudanças na separação. Um decréscimo no valor de k' acarreta deficiência na separação, enquanto um incremento conduz a um significativo aumento na resolução. Quando o valor de k' é baixo para uma condição inicial de separação, deve-se aumentá-lo numa faixa ideal de $1 \leq k' \leq 10$. Nenhuma outra mudança nas condições de separação conduz a um aumento na resolução com tão reduzido esforço (Snyder et al., 1979). A forma de controle de k' se faz pela mudança da força do solvente, a

qual interfere diretamente na retenção do soluto à fase estacionária. Em conseqüência, um aumento na retenção corresponde a um aumento da resolução.

Num processo de separação cromatográfica o fator de retenção não deve ser muito reduzido. Isto é, a interação do soluto com a fase estacionária não deve ser muito pequena. Por outro lado, se esta interação for demasiadamente grande acarretará alargamento de picos. Na cromatografia por fase normal, o aumento do fator de retenção é conseguido pela redução da polaridade da fase móvel (Snyder et al., 1997).

Sobreposição de pico com sobrecarga de amostra.

Quando se aumenta a sobrecarga da coluna ocorre o alargamento de pico, e dependendo da extensão desta sobrecarga, ocorrerá a sobreposição de bandas. Esta sobreposição de bandas pode comprometer a eficiência de separação no que se refere à pureza do soluto a ser recuperado. Segundo Sewell et al. (1994), a sobrecarga excessiva também conduz ao afastamento das bandas.

Porém, quando maior quantidade de material purificado é requerido, é conveniente proceder-se a sobrecarga de amostra. Ainda que ocorra a sobreposição de bandas um adequado corte da fração de interesse possibilita obter um produto altamente purificado além de maior produção por unidade de tempo, àquela que seria possível se operada a coluna no limite ideal de carga.

Valores baixos de resolução acarretam picos mais altos e mais largos acarretando erro na determinação da pureza quando se procede ao cálculo de área. Na cromatografia preparativa, segundo Sewell et al. (1994), um valor de resolução $R = 1$ permite uma separação na ordem de 94 % de pureza, os restantes 6% correspondem à contaminação pelo componente do pico adjacente. O aumento da resolução leva conseqüentemente a um aumento da pureza do produto a ser isolado.

Forma do pico - Cauda ou sobreposição?

Quando dois solutos apresentam baixa retenção relativa, deve-se otimizar a resolução pela adequação do solvente, no sentido de melhorar a seletividade e conseqüentemente a resolução. A eficiência na separação será notada pela formação de um vale entre os dois picos. Dependendo porém da concentração relativa entre ambos os solutos e da insuficiente seletividade do solvente, o não aparecimento de um vale mais sim o surgimento de um ombro

no cromatograma pode sugerir erroneamente se tratar de assimetria. Nestas condições é conveniente melhorar a resolução para se certificar do fato. Se finalmente, o aumento da resolução levar ao aparecimento de um vale, trata-se de um componente em menor concentração, encoberto pela banda do soluto que se encontra em maior concentração, exigindo, portanto otimizar a mistura solvente para melhorar a separação. Entretanto se a forma da banda não se modifica com o aumento da resolução tem-se a comprovação de assimetria (Sewell et al., 1994). Ainda, segundo o Autor, no caso de picos sobrepostos, a posição dos verdadeiros centros das bandas de dois componentes não corresponde à posição aparente para os picos combinados. Quando se reduz a sobreposição dos picos, com aumento da resolução, não só os centros das bandas convergem para as posições reais como também as alturas dos picos convergem para seus valores verdadeiros, inferiores aqueles que se destacavam quando sobrepostas estavam as bandas.

2.9.7 PERMEABILIDADE EM UMA COLUNA CROMATOGRÁFICA

A avaliação da permeabilidade de uma coluna é importante no sentido de reproduzir colunas com as mesmas características de separação quando mantidos todos os parâmetros de dimensão de coluna e material de empacotamento. Reproduzir a mesma condição de empacotamento conduzindo a colunas que apresentarão similares desempenhos de separação. A equação abaixo,

$$t_o = \frac{15000L^2\eta}{Pd_p^2f} \quad (40)$$

relaciona o tempo morto t_o aos parâmetros: comprimento da coluna L , viscosidade da fase móvel η , diâmetro de partícula d_p e a perda de carga através do leito. O valor atribuído a f , será de 1, 2 ou 4 se as partículas apresentarem poros irregulares, esféricos ou empacotamento pelicular respectivamente. Segundo Snyder et al. (1979), a redução na permeabilidade da coluna efetivamente reduz o desempenho da coluna em algumas aplicações, resultando em tempos maiores para uma dada separação.

2.9.8 DESEMPENHO DE UMA COLUNA

Segundo Snyder et al. (1979), o desempenho de uma coluna, tem sido tradicionalmente definido pelo número de pratos. Embora útil, este parâmetro por si só não fornece informações suficientes para avaliar de forma apropriada a sua utilidade. Vários fatores contribuem para o desempenho de uma coluna, devendo portanto ser avaliados, são eles: resistência ao fluxo ϕ ,

$$\phi = \frac{0,1\Delta P t_o d_p^2}{10^9 \eta L^2}, \quad (41)$$

onde d_p é igual ao diâmetro das partículas (μm), ΔP , a perda de carga (bar), L , o comprimento (m), t_o o tempo de retenção para o soluto não retido (em segundo), η a viscosidade da fase móvel (cP).

2.10 ADSORVENTES

Quase todas as aplicações atuais da cromatografia líquida preparativa estão limitadas ao emprego de sílica ou a alumina. Estes adsorventes apresentam similares propriedades de retenção, sendo preferencialmente retidos os compostos mais polares. Por um número de razões práticas, muitas separações são hoje conduzidas mais freqüentemente com sílica. Esta apresenta maior capacidade de carga, é menos sujeita a catalisar reações indesejáveis durante a separação e existe disponível em uma ampla variedade de forma e características de superfície. Apresentam pequena diferença, normalmente para menos, na retenção relativa quando comparada à alumina. Em alguns casos são similares, em outros a diferença não chega a 30 % do valor desta última. Compostos ácidos são mais intensamente retidos em alumina, às vezes de forma irreversível, como também aromáticos de anéis maiores apresentam elevada retenção. Outro fator que leva ao emprego da sílica é a sua baixa acidez, diferente da alumina (normalmente básica). Deve-se evitar a exposição à alumina daquelas amostras sujeitas a catálise ácida ou básica, pois reações indesejáveis podem ser catalisadas. Neste sentido, a sílica, apesar de apresentar acidez, pH 5,0, tem reduzido efeito catalisador comparado à alumina básica cujo pH é 12 (Snyder et al., 1979).

A superfície específica da sílica pode variar de 300 a 900m²/g dependendo da densidade. Os produtos mais densos têm poros mais finos e maior área superficial (Knaebel, 1995).

A sílica apresenta polaridade máxima quando, após ter sido exposta a água, é aquecida até 170° C. Isto se deve ao fato de que a água fisicamente adsorvida geralmente presente na superfície é removida deixando ativo um grande número de grupos silanol. O tratamento térmico da sílica resulta conseqüentemente em mudança nas propriedades adsorptivas. Contudo, o aquecimento acima de 200° C leva a perda total da habilidade de separar compostos polares (Sewell et al., 1994).

2.10.1 CARACTERÍSTICAS DO ADSORVENTE

Atributos como capacidade, seletividade, regenerabilidade, compatibilidade, além de custo, são importantes na seleção de um adsorvente, Entretanto, raramente um adsorvente reúne todas estas características (Knaebel, 1995).

Seletividade.

Um adsorvente altamente seletivo é requisito primário para um processo de separação econômico, mas também, a elevada capacidade de carga e vida útil são aspectos de grande importância.

Porosidade do adsorvente.

Uma elevada superfície específica de uma partícula favorece a uma grande capacidade de adsorção. A criação de uma elevada superfície interna, pela presença de poros proporciona um excepcional aumento da área superficial de um adsorvente. O tamanho dos micro-poros determina a acessibilidade das moléculas do soluto à superfície de adsorção, de forma que a curva de distribuição de poros é uma outra importante propriedade para caracterização da adsorptividade de um adsorvente. Alguns adsorventes possuem além dos micro-poros, macroporos de grande dimensão, resultado do processo de granulação de pós ou cristais finos dentro dos *pelets* ou de origem da textura da matéria prima (Suzuki, 1990).

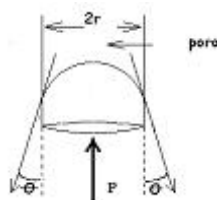
Uma variedade de métodos para produção de sílica gel têm sido descritos. No processo de hidrólise do silicato alcalino com um ácido, o ácido silícico liberado polimeriza,

condensando em aglomerados aproximadamente esféricos formados por uma rede de SiO_4 tetraédricos ligados entre si, apresentando diâmetro de 20 a 200 Å . Após a secagem, os aglomerados formam uma estrutura micro-porosa, cuja dimensão dos poros é determinada principalmente pela dimensão original das micro-partículas. A ligação entre as partículas ocorre com a eliminação de hidroxilas vizinhas às partículas. A presença de grupos hidroxilas não eliminados atribui à sílica diferentes graus de polaridade (Ruthven, 1984).

Determinação da porosidade de uma partícula.

➤ Porosímetro de mercúrio.

Uma forma prática para determinação da porosidade é realizada com frequência com porosímetro de mercúrio (Ruthven, 1984). A partícula porosa é imersa no mercúrio. Este penetrará nos poros até que a pressão aplicada ao fluido atinja o valor de equilíbrio da força de tensão necessária para vencer a força de tensão capilar, tanto maior quanto menor o diâmetro do poro. Segundo a equação abaixo é possível verificar o princípio de funcionamento. A Tabela 7 relaciona a pressão necessária à penetração, de acordo com o diâmetro de poros.



$$P \pi r^2 = 2 \pi r \sigma \cos \theta$$

Figura 14 - Esquema representativo de um poro.

Tabela 7 - Relação da pressão de equilíbrio do mercúrio

com o diâmetro dos poros de um adsorvente.

Pressão (atm)	10	100	10^3	10^4
Raio (Å)	2.2×10^4	2200	220	22

➤ **Método de adsorção de nitrogênio – BET.**

Quando a adsorção do nitrogênio é efetuada na temperatura do nitrogênio líquido (77,34 K), ocorre a adsorção na superfície dos poros e posterior condensação no seu interior. A espessura da camada adsorvida (t) e o tamanho dos poros onde ocorre a condensação dependem da pressão parcial do nitrogênio na superfície. Da isoterma de adsorção, obtida pelo método gravimétrico ou pelo método a volume constante pode-se determinar a distribuição cumulativa do tamanho dos poros. Segundo Suzuki (1990), varias equações são propostas relacionando a espessura da camada adsorvida e a pressão. Entre elas, a relação de HALSEY é uma das mais importantes:

$$t \left(\frac{\circ}{\text{A}} \right) = 4,3 \left[5 / \ln \left(\frac{p_s}{p} \right) \right]^{1/3}, \quad (42)$$

onde p_s é a pressão de saturação.

Ainda, segundo Suzuki (1990), quando a adsorção ocorre em multicamadas na superfície do adsorvente, as moléculas sobrepostas àquelas diretamente ligadas à superfície apresentam diferentes forças de interação. A adsorção por monocamada é formada pelo mesmo conceito de adsorção do tipo Langmuir, enquanto aquelas acima das monocamadas são equivalentes à condensação de moléculas do adsorvato, dando lugar à equação de BET (Brunauer, Emmett and Teller, 1938).

$$\frac{q}{q_m} = K_B p_r / [(1 - p_r)(1 - p + K_B p_r)], \quad (43)$$

onde: p_r é a pressão relativa, K_B a constante de equilíbrio e q_m a quantidade adsorvida na superfície (monocamada). O valor de q_m obtido da isoterma pode ser convertido para área superficial, multiplicando-se pela área superficial do nitrogênio, igual a 3480m²/g.

2.11 POROSIDADE DE UM LEITO

O espaço disponível em um leito empacotado corresponde à soma dos espaços inter-partículas α (porosidade do leito) e aqueles presentes no interior das partículas (intra-partícula) ε , que correspondem à fração de espaços vazios no interior da partícula. Estes, pelas suas dimensões podem ser micro ou macro-poros. Em média, apenas 2% da superfície disponível encontra-se externa as partículas, estando a maior capacidade no interior dos poros.

A fração de volume de poros que uma partícula pode penetrar é denominada K_d . Se a molécula é pequena e tem acesso a todos os poros o valor de K_d é igual a 1. O volume de eluição V_e acessível à moléculas de reduzida dimensão será então:

$$V_e = V_o + V_i = \alpha V_{col.} + (1 - \alpha) \epsilon V_{col.} \quad (44)$$

Para moléculas de grandes dimensões que não têm acesso aos poros internos da partícula, seu volume de eluição será:

$$V_e = V_o = \alpha V_{col.} \quad (45)$$

As equações (42) e (43) permitem determinar V_o , α , V_i , através de experimentos com grandes moléculas e um experimento com moléculas pequenas. Moléculas de dimensões intermediárias podem penetrar alguns dos poros interpartículas, de forma que, para estas moléculas K_d pode ser determinado de:

$$K_d = \frac{(V_e - V_o)}{V_i} \quad (46)$$

Cromatografia por gel permeação ou exclusão são baseadas exclusivamente nas diferenças de K_d (Wankart, 1986).

Segundo Snyder et al. (1979), a porosidade total de um leito cromatográfico pode também ser expressa por:

$$\epsilon_{tot} = \frac{4F_c t_o}{\pi d_c^2 L} \quad (47)$$

onde F_c é o fluxo (cm³/seg) e d_c o diâmetro da coluna.

Através da análise da literatura, verificou-se a existência de uma lacuna de publicações voltadas à obtenção de bixina com elevada pureza, que é o objeto deste trabalho.

A seguir serão apresentados os equipamentos, reagentes e metodologia empregados no desenvolvimento do presente trabalho.

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os reagentes, equipamentos e a metodologia empregada para a execução dos experimentos. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.

3.1 SEMENTE DE URUCUM

Foram empregadas neste trabalho sementes de urucum, cedidas pela empresa CHR Hansen Indústria e Comércio LTDA – Valinhos SP.

Teor de bixina.

As sementes foram analisadas pelo método da hidrólise, segundo Kato et al. (1992).

Armazenamento.

Após seu recebimento, porções de cerca de 250g de sementes, foram transferidas para embalagens plásticas aluminizadas, as quais foram seladas a vácuo e conservadas na geladeira, à temperatura de 5 °C.

3.2 EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos e acessórios foram empregados para a condução dos trabalhos:

- **Espectrofotômetro** - Marca Shimadzu - Modelo UV mini 1240;
- **Coletor de frações** - marca Gilson – modelo FC 204;
- **Sistema de aquisição de dados:** Espectrofotométricos – software UV Data Acquisition Shimadzu, conectado a um microcomputador Celeron MMX (266 MHz);
- **Centrífuga** - marca, Jouan B4i, velocidade máxima 17000 rpm., rotor monobloco com capacidade para 10 tubos de 6ml;
- **Pipetas de precisão** - marca Ependorf, de 100, 1000 e 5000 µl;
- **Unidade pressurizada para filtração;**

Constitui-se de um dispositivo empregado para filtração com membrana, confeccionado em aço inoxidável, com capacidade para 120ml de solução. Como elementos filtrantes foram empregados papéis de filtro grau qualitativo de porosidades média e alta.

- **Coluna para cromatografia preparativa flash.**

O sistema para cromatografia empregado dispõe de um vaso para pressurização da solução confeccionado em aço inoxidável com capacidade para 250ml. Duas colunas foram construídas: uma com tubo de 10,85 x 298,40 mm e a outra de 6,08 x 262,10mm com extremidades adaptadas, usinadas em Teflon.

3.3 REAGENTES

Nos processos de extração, preparação das amostras e na cromatografia preparativa foram empregados reagentes e solventes PA, das marcas Nuclear, Synth, Biotec e Vetec;

Fase estacionária – As colunas cromatográficas foram empacotadas com Sílica gel 60 marca Vetec, malha 40 –60 (230-400 mesh) com densidade aparente 0,4 g/cm³;

Cromatografia em camada delgada - lâminas revestidas com sílica gel 60 espessura 0,2mm marca Merck, artigo nº 105554.

3.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Na descrição dos processos de extração foram empregados os seguintes termos:

- **Extrato sólido** ou **extrato bruto**: sempre se referindo ao produto bruto (pigmento) removido da semente, por operação mecânica ou com a participação de um solvente, que não necessariamente solubiliza a bixina, mas que facilita a remoção dos componentes que mantêm a camada de pigmento aderida à semente.
- **Extrato solúvel (Es)**: solução contendo os componentes solúveis do extrato bruto.
- **Extrato seco (ES)**: material sólido obtido do extrato solúvel após eliminação do solvente.

3.4.1 PRÉ-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO SÓLIDO DE URUCUM (PIGMENTO)

Dois diferentes procedimentos foram adotados para pré-purificação do extrato sólido:

i) Extração em vaso aberto – Procedimento I.

Sobre uma massa de 250 g de sementes, contida em um becker de 1000mL, adicionava-se 150 mL de hexano e igual volume de etanol. Após enérgica agitação por 45 minutos, procedia-se à remoção das sementes com o auxílio de uma peneira de nylon de malha 1,0 mm. Na seqüência, para remover sujidades como também materiais particulados removidos dos grãos por atrição, passava-se o pigmento através de uma malha fina de serigrafia (mono-filamento com 120 fios/cm²). Depois de drenado o solvente, o pigmento era conduzido ao subsequente ciclo de extração.

A cada ciclo, após decantação e posterior centrifugação, alíquotas da solução eram coletadas, para determinação da massa de extrato seco e do teor de bixina segundo metodologias (3.9.2) e (3.9.1).

Com a prévia remoção das sementes, a reduzida quantidade extrato bruto resultante permitia que os ciclos subsequentes ao primeiro fossem tratados com menor volume de mistura solvente, de forma a minimizar as perdas de bixina solubilizada. Para tanto, o volume de mistura empregado era reduzido de 250 para 50mL.

No curso dos ciclos de lavagem com hexano/etanol, após verificar predominância de bixina na composição do extrato seco, empregava-se somente hexano como solvente. O extrato assim obtido era conduzido ao processo de extração da bixina e posteriormente à cristalização.

O procedimento acima descrito foi adotado para preparação de material necessário a obtenção de extrato bruto, e matéria-prima para bixina recristalizada, enquanto experimentos destinados à otimização do processo de extração a exemplo dos experimentos 1, 2, 3 e 4, descrito na Tabela 8, foram realizados em vaso aberto, porém empregando-se menores massas de semente e diferentes relações de solvente.

ii) Extração em tubo fechado – Procedimento II.

Em dois tubos de ensaio de 15 mL, providos de tampa, foram colocados 2,5 g de semente de urucum e em outros dois 0,18g de extrato bruto (pigmento removido da semente após um ciclo com hexano/álcool 1/1). Etanol absoluto e éter etílico foram testados como

solventes em seis ciclos consecutivos de extração. Decorridos 30 min. de contato e agitação constante, o conteúdo era centrifugado, retirando-se então 5mL para determinação de massa de extrato seco e 0,5 mL para espectrofotometria. Esta alíquota, depois de eliminado o solvente por passagem de nitrogênio, era diluída a 100mL com solução de NaOH 0,5 N para, a seguir, proceder à leitura espectrofotométrica. Ao final de cada ciclo, os tubos eram vertidos sobre um papel absorvente para drenar ao máximo o solvente do ciclo anterior. Acrescentava-se a seguir solvente PA dando continuidade ao próximo ciclo. Os resultados deste experimento são detalhados na Tabela 20, designados como experimento 5.

Na Tabela 8 são apresentadas informações relativas aos experimentos cujos resultados são mostrados no Capítulo seguinte - Resultados e Discussões.

Tabela 8 – Relação das informações contidas nos experimentos de extração.

Expto	Massa (g)	Relação		nº ciclos		Ensaio			obs.
		sub/solv.	Hex/Alc	Outro	% bix	método	ST		
Exp-1	Sem. 42	1/1	6	2 Hex	Sim	Kato	Sim	a, b	
Exp-2	Sem 42	1/1	5	2 Hex	Sim	Kato	Sim		
Exp-3	Sem 20	1/5	8	-	Sim	Kato	Sim	c, d	
Exp-4	Sem 50	1/1	7	2 Hex	Sim	Clorof.	Sim	e	
Exp- 5-1	Sem 2,5	1/1	0	6 EE	Sim	Kato	Sim	e	
Exp- 5-2	Sem 2,5	1/1	0	6 Alc	Sim	Kato	Sim	f	
Exp- 5-3	Ext 0,18	1/5	1	6 EE	Sim	Kato	Sim	f	
Exp- 5-4	Ext 0,18	1/5	1	6 Alc	sim	Kato	Sim	f	

Legenda: Sem = semente; Ext = extrato; Sub = substrato submetido à extração; Solv = solvente; Hex = hexano; Alc = etanol; EE = éter etílico; Bix = bixina; ST = sólidos totais.

a - sólido posteriormente submetido à extração com acetona;

b - sólido posteriormente submetido à extração amoniacal;

c - curva de calibração processada com os extratos provenientes de cada ciclo;

d - amostras de cada ciclo acompanhadas para avaliação da estabilidade a estocagem;

e - curvas espectrofotométricas disponíveis;

f – amostra submetida à coleta especial.

3.5 PADRÃO DE BIXINA

A inexistência no mercado de um padrão de bixina como também de norbixina, somado à reduzida estabilidade destes compostos a estocagem, levou à necessidade de preparação de padrões, os quais foram empregados para o monitoramento das amostras coletadas no curso deste trabalho. Os padrões de bixina foram obtidos via recristalizações sucessivas em acetona conforme descrito na Seção (3.11). Os padrões, na forma de cristal, foram mantidos em frasco âmbar, no compartimento superior do refrigerador (-8°C) e envolvidos em folha de alumínio. Ainda, sempre que possível, mantidos sob vácuo ou em atmosfera de nitrogênio. Empregou-se também uma amostra de procedência da empresa CHR Hansen A/S de Hørsholm – Dinamarca, lote BX-124-99.

3.6 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA BIXINA E NORBIXINA

Em tubos de ensaio, foram colocados cerca de 25 mg de padrão de bixina acrescentando-se a seguir aproximadamente 4,0 mL do solvente em estudo. Devido ao pequeno volume de solvente empregado, a massa empregada garantia condição de saturação. Os tubos foram submetidos à temperatura 30 °C. Após repouso, os tubos foram levados à centrífuga, para em seguida retirar-se uma alíquota precisa, para análise espectrofotométrica, adotando-se o procedimento analítico descrito em 3.9.1 (variante para pequeno volume).

A solubilidade foi determinada nos seguintes solventes: acetona, acetato de etila, etanol, clorofórmio, éter etílico, metanol, hexano, soluções aquosa de hidróxido de sódio e soluções; aquosa e hidro-alcoólica de hidróxido de amônio.

3.7 MONITORAMENTO DO TEOR DE BIXINA DE EXTRATO BRUTO EM MEIO ALCOÓLICO

Amostras provenientes de diferentes ciclos de extração com mistura etanol /hexano 1/1 foram separadas para acompanhamento segundo o procedimento abaixo:

De cada ciclo de extração foram separados 10 mL de solução, eliminando-se o hexano com nitrogênio. Na seqüência, foram diluídas a 50 mL com etanol. Oito porções de 5mL, de cada uma destas soluções, foram transferidas para pequenos frascos, seladas e mantidas na geladeira (5 °C) para posterior leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 486 nm, região de máxima absorção da bixina em solução alcoólica. Durante sete meses estas

soluções foram monitoradas. Periodicamente, fazia-se a leitura espectrofotométrica de oito amostras, uma de cada ciclo, que em seguida eram descartadas. Os resultados deste acompanhamento são apresentados na Tabela 27.

3.8 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DE PADRÃO

Amostras de bixina e de derivado amoniacoal, na forma sólida (cristais) e em soluções, foram monitoradas periodicamente durante 90 dias. Os padrões sólidos, todos provenientes de um mesmo lote foram estocados em frações individuais e lacrados, sendo descartados a cada análise. Os recipientes contendo as amostras em solução eram retirados do freezer e depois de atingida a temperatura ambiente uma alíquota era coletada para análise. Logo após, o frasco retornava ao freezer.

As amostras sólidas foram estocadas nas seguintes condições:

- a) Em gás liquefeito de petróleo (GLP);
- b) Sob vácuo;
- c) Em atmosfera de nitrogênio.

Os solventes empregados para estocagem foram respectivamente:

- a) Etanol absoluto;
- b) Etanol com 2% de BHA (butil hidroxianisol);
- c) Etanol com 2% de vitamina E (α -tocoferol);
- d) Solução 50/50 de acetonitrila e dimetilformamida.

Todas as amostras foram mantidas no freezer a -8° C e isoladas da luz. As análises foram realizadas no dia de preparação da amostra e posteriormente com 8, 15, 30, 60 e 90 dias de estocagem.

Procedimento para preparação e estocagem das amostras.

Bixina recristalizada e derivado amoniacoal, recém produzidos, foram analisados e divididos em pequenas porções, as quais foram transferidas para frascos de 8 mL e imediatamente fechados com lacres de alumínio. Introduzindo-se uma agulha, perfurava-se a tampa de borracha fazendo-se vácuo. A seguir injetava-se GLP, nitrogênio ou mantinha-se sob vácuo. Após a remoção da agulha, colocava-se uma pequena porção de cola de silicone na região do orifício feito pela agulha. As amostras eram então mantidas no freezer até o dia da análise. As amostras em solução foram preparadas pela pesagem de uma massa dos padrões e diluídas no solvente de interesse. Os padrões acrescidos de antioxidante foram preparados

com prévia dissolução do aditivo no solvente, a seguir esta solução era empregada para dissolver uma massa precisa do padrão. Depois de aferido o balão, a solução era analisada, transferida para frascos âmbar e colocadas no freezer.

Análise das amostras

-Amostras sólidas (cristais)

Nas amostras mantidas em GLP, eliminava-se previamente o gás, pela introdução de uma agulha através da borracha, permitindo a vaporização do conteúdo líquido. A seguir inseria-se outra agulha e passava-se uma corrente de nitrogênio para permitir a remoção do gás residual do interior do tubo. Abria-se então o frasco e através de um funil, transferia-se uma alíquota, para um balão volumétrico colocado sobre o prato da balança analítica. Depois de dissolvidos os cristais, procedia-se a análise segundo metodologia descrita na Seção 3.9.1, Metodologia II.

As amostras mantidas sob vácuo foram tratadas de forma semelhante aquela com GLP, injetando-se primeiro a agulha que alimenta o nitrogênio e imediatamente após perfura-se com outra agulha para permitir a corrente de gás através do tubo.

- Amostras em solução

Das amostras em solução, depois de atingida a temperatura ambiente, retirava-se uma alíquota e eliminava-se o solvente através de vácuo. Em seguida, o soluto deixado pelo solvente era redissolvido em clorofórmio. Após aferir o balão fazia-se a leitura espectrofotométrica segundo metodologia 3.9.1.

3.9 METODOLOGIA ANALÍTICA

3.9.1 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

As análises espectrofotométricas foram realizadas com base em dois métodos:

O método da hidrólise alcalina, com base no método segundo Kato et al., (1992) e o outro embasado em Yabiru e Takahashi, (1992), que emprega clorofórmio como solvente. Estas metodologias serão aqui referenciadas como metodologia I e metodologia II, respectivamente.

- Metodologia I - via hidrólise alcalina

Para determinação do teor de bixina foi feita uma adaptação do método descrito por KATO *et al.* (1992), pois, neste trabalho, as quantidades de bixina presentes em solução eram freqüentemente reduzidas, dificultando a determinação das massas com precisão. Sendo assim, volumes de amostras que podiam variar de 5 a 50 mL foram coletados para determinação da massa de extrato sólido. Paralelamente, alíquotas de 20 a 500µL das soluções foram coletadas com micropipeta e transferidas para balões de 100mL. Depois de eliminado o solvente, sob vácuo e/ou pela passagem de nitrogênio, adicionava-se ao balão solução de NaOH 0,5N com posterior aquecimento em banho-maria (40° C) e sob agitação por 30 min, em cuba de ultra-som, de forma a facilitar a hidrólise da bixina. Resfriado à temperatura ambiente completava-se o conteúdo do balão com a mesma solução alcalina, procedendo-se em seguida à leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 482 nm.

Com os dados de massa de extrato seco e o valor de absorvância determinava-se a concentração da amostra pela aplicação da Equação: (1) que tem base na lei de Beer.

$$X = \frac{A \times V}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m} \cdot \frac{1}{d_c} \cdot \frac{V_i}{d_i} \quad (48)$$

onde:

X = % de bixina (g/ 100g de amostra);

m = massa da amostra (g);

V = volume inicial de extração (mL);

V_i = volume de diluição (mL);

d_i = volume da alíquota para a diluição; (mL);

A = absorvância lida no comprimento de onda de 482 nm;

E_{1cm}^{1%} = coeficiente de absorvância (2870);

d_c = caminho ótico da célula (1,0 cm).

Para converter o resultado obtido em percentual de bixina, multiplica-se pelo fator 1,076.

- Metodologia II - via clorofórmio

As análises espectrofotométricas das amostras e padrão solubilizados em clorofórmio foram adotadas no presente trabalho como metodologia para análise de controle do teor de bixina, em substituição ao método (Kato et al, 1992). As leituras foram determinadas a 501

nm e 471 nm, região do espectro onde apresentavam picos de máxima absorção. Foi utilizado para análise da bixina, o valor $\varepsilon_{1cm}^{1\%}$ 3230 (471nm), citado por Reith e Gielen, (1971), sendo assumido deste modo como estando o composto na forma de cis-bixina.

A metodologia aqui empregada, usando clorofórmio como solvente foi adaptada da técnica descrita por Yabiku e Takahashi (1992). Na metodologia original, as sementes são trituradas. Contudo, por se tratar de extrato, o procedimento adotado neste trabalho emprega a massa de extrato sólido, ou alíquota da solução da qual o solvente é previamente eliminado. Para determinação da massa de extrato seco foi aplicado o procedimento descrito na seção (3.9.2). As alíquotas contendo baixa concentração e reduzido volume de amostra foram analisadas por comparação a uma curva de calibração, esta elaborada com clorofórmio como solvente ou hidróxido de sódio, neste caso quando da adoção da metodologia por hidrólise. Este procedimento analítico foi denominado-Variante.

O procedimento de cálculo para determinação do percentual de bixina fez uso da equação (1) da seção anterior, procedendo à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 471nm, e substituindo-se o valor do coeficiente de absorvidade por 3230.

Na determinação espectrofotométrica de amostras (sólidas), estas eram pesadas diretamente no balão volumétrico; acrescentava-se o clorofórmio e após agitação em banho ultra-sônico, aguardava-se o resfriamento para, só então, “aferir” o balão. Para proceder à diluição, colocava-se em outro balão volumétrico, um pouco de solvente, sobre o qual a alíquota era transferida com o auxílio de uma micropipeta. Depois de drenada a ponteira, secava-se a parte externa com um papel umedecido no solvente. Na seqüência lavava-se o interior da ponteira com solvente, transferindo a solução de limpeza para dentro do balão completando-se então o volume com o restante do solvente até a aferição.

Variante para pequenos volumes de amostras

Para amostras com baixa concentração e volume insuficiente para determinação da massa de extrato seco, procedia-se à leitura espectrofotométrica e com o valor da absorbância obtido, determinava-se a concentração da amostra pelo confronto com uma curva de calibração elaborada com o mesmo solvente diluente da amostra e preparada com um padrão de concentração conhecida. Esta metodologia foi empregada tanto para amostras procedentes de soluções aquosas quanto para aquelas provenientes de solventes orgânicos. Amostras contidas em solventes orgânicos eram previamente secas sob vácuo e posteriormente

dissolvidas em solução de NaOH, quando adotada a metodologia I, seção (3.9.1), ou em clorofórmio no caso da adoção da metodologia II.

3.9.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA DO EXTRATO SECO

Para determinação da massa do extrato seco (ES), um volume preciso da solução (10 a 50 mL), coletado com pipeta volumétrica, era transferido para uma placa petri/ou Becker (pré-tarados) e colocados na estufa a 60° C até total evaporação do solvente. Após estabilização da temperatura, em dessecador, determinava-se a massa de extrato seco. Para volumes acima de 10 mL as secagens foram efetuadas em Becker de 100mL.

Procedimento para coleta de amostra em solvente volátil.

Visto ser crítica a relação volume/massa de amostra na determinação do teor de bixina, cuidados especiais foram tomados no sentido de aumentar a precisão na coleta. Quando da coleta de solução com micropipeta, as ponteiras eram sempre enxaguadas, com a própria solução, no sentido de transferir totalmente o conteúdo residual retido nas paredes internas da ponteira.

Naquelas amostras cuja concentração de bixina era muito reduzida, ou ainda quando se usava solvente com elevada pressão de vapor, o emprego de pipeta volumétrica como também as micropipetas automáticas tornava-se impraticável, pois era impossível manter o fluido nestes dispositivos sem que houvesse expulsão de gotas de solução, o que acarretava erro de medida. Para este propósito foi adaptada uma bureta, cuja extremidade era constituída de uma coluna graduada com reduzida secção interna, conforme ilustra a Figura 15. Utilizando-se as duas escalas da bureta foi possível coletar, por transferência, volumes precisos, como aqueles necessários à espectrofotometria, ou mesmo volumes maiores para a determinação do extrato seco. A extremidade inferior, abaixo da torneira, era enxaguada internamente com o solvente, antes e após a transferência da alíquota.

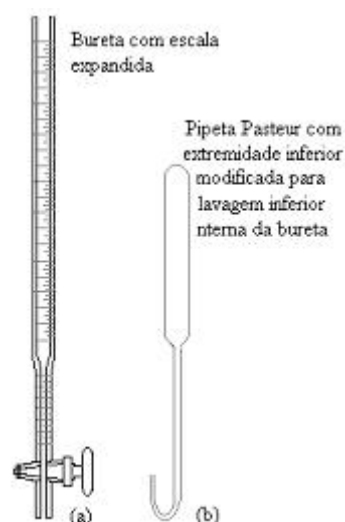


Figura 15 – Conjunto para coleta de amostra volátil.

3.10 ACOMPANHAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO CURSO DA HIDRÓLISE ALCALINA

Para avaliar a confiabilidade do método analítico, foram monitoradas soluções de bixina, em três diferentes concentrações de NaOH; 0,02 N, 0,1N e 0,5N.

Uma solução padrão de bixina contendo 59,2 mg bixina recristalizada (92,53% de pureza) dissolvida em 50 mL de clorofórmio foi utilizada para preparar as soluções de monitoramento.

Cada solução de monitoramento foi obtida pela diluição de 2 mL da solução padrão em 1000mL da correspondente solução alcalina. Obtendo-se, ao final, soluções com 2,19 $\mu\text{g/mL}$ de bixina.

A determinação da concentração do padrão de bixina foi realizada através da metodologia II descrita na seção (3.9.1).

Na Tabela 9 é mostrado o plano experimental para acompanhamento da evolução da hidrólise das soluções Cij de bixina.

Tabela 9 - Plano de ensaio para monitoramento da hidrólise da bixina.

Temperatura (°C)	Solução de NaOH		
	0,02 N	0,1 N	0,5 N
4	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃
25	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃
40	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃

C_{ij}: sendo, **i**, referente à temperatura e **j** a concentração de hidróxido de sódio.

Dois litros das referidas soluções C_{ij} foram colocados em frascos âmbar, e armazenados a diferentes temperaturas (4° C, 25 ° C, e a 40° C). Alíquotas destas soluções foram periodicamente coletadas para acompanhamento espectrofotométrico. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 282 nm a partir de cinco minutos da dissolução e até o 28° dia da preparação.

3.11 CRISTALIZAÇÃO DA BIXINA

O extrato sólido, pré-concentrado, cerca de 1,0g, foi transferido para um Becker de 1000mL e dissolvido em 500mL de acetona PA, sob aquecimento até início de ebulição. Ainda quente, a solução foi transferida para o filtro, previamente aquecido, ilustrado na Figura 16. A seguir, o sistema foi pressurizado com nitrogênio e o filtrado recolhido em um frasco de vidro âmbar. Fechou-se o frasco deixando a solução esfriar lentamente. Atingida a temperatura ambiente transferiu-se para a geladeira e após alguns minutos para o freezer. Lavado o dispositivo de filtração, trocou-se o elemento filtrante (papel de filtro de filtração lenta) procedendo à nova filtração com o conjunto previamente resfriado. Os cristais obtidos foram então secos sob vácuo e estocados.

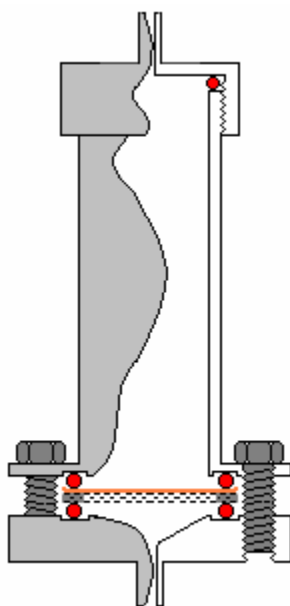
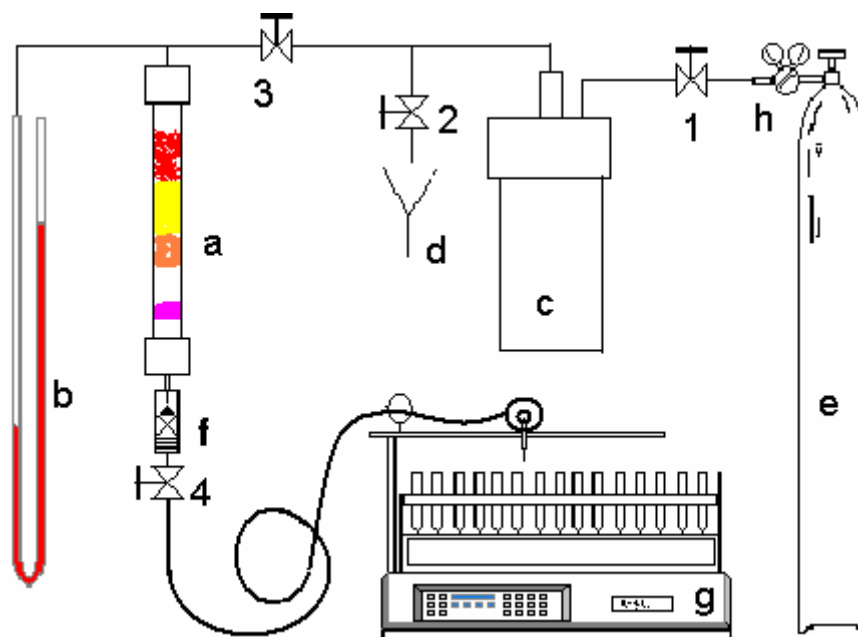


Figura 16 - Conjunto para filtração sob pressão.

Para preparação de padrão de maior pureza, os cristais obtidos eram conduzidos a sucessivos ciclos de cristalização (recristalização), por repetição do procedimento anterior. Atingida a pureza que atendia ao propósito analítico, os cristais eram transferidos para um frasco de vidro âmbar, fechado sob vácuo e estocado em freezer.

3.12 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Os experimentos em cromatografia preparativa foram efetuados em colunas de vidro com diâmetros internos de 10,85 mm e 6,08mm e comprimento útil de 298,4 mm e 262,1mm, respectivamente. Foi empregado como adsorvente sílica gel 60 marca Vetec, malha 40 – 60 (230-400 mesh), com densidade aparente $0,4 \text{ g/cm}^3$. A fase móvel, colocada no interior do recipiente de alimentação, era transferida para a coluna pela pressurização com nitrogênio. Para possibilitar a reprodução da vazão, a perda de carga através da coluna era monitorada com o auxílio de um manômetro de mercúrio, possibilitando medir com precisão a pressão aplicada ao sistema. Nas Figuras 17 e 18 são apresentadas, respectivamente, de forma esquemática a montagem experimental do sistema empregado e a válvula de restrição.



a - coluna preparativa flash, b-coluna de mercúrio, c-vaso pressurizado com fase eluente, d-dreno, e-cilindro de nitrogênio, f-válvula de restrição, g coletor de frações, 1, 2, 3 e 4 - válvulas.

Figura 17 – Disposição esquemática do conjunto para cromatografia preparativa flash.

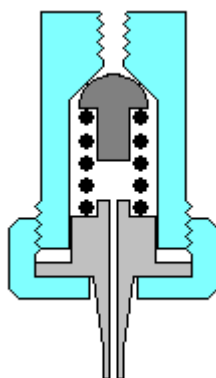


Figura 18 - Válvula de restrição

3.12.1 PREPARAÇÃO DA COLUNA

Três diferentes formas de preenchimento foram testadas:

- a) Dispersão da sílica em hexano e agitação no ultra-som, com posterior transferência da suspensão para a coluna parcialmente preenchida com solvente;
- b) Preenchimento da coluna com a sílica, remoção do ar contido nos poros, submetendo à vácuo a extremidade superior e posterior alimentação do solvente, pela mesma extremidade. Este procedimento conduz a uma classificação natural do adsorvente favorecendo a distribuição das partículas menores na região superior da coluna, promovida pelo fluxo ascendente do ar durante o processo para sua remoção. Isto, em consequência, tende a criar um empacotamento com diferente adensamento;
- c) Procedimento semelhante ao segundo, porém efetuando vácuo pela parte inferior e alimentação do solvente pelo topo da coluna. Este procedimento levou a obtenção de empacotamento mais homogêneo e de maior densidade, particularmente quando comparado ao primeiro.

Preenchimento com fase estacionária

Com a finalidade de reter e suportar o adsorvente coloca-se uma fina tela de nylon e um papel de filtro na base da coluna. Fechada esta extremidade transfere-se 2,75g (coluna de menor diâmetro) ou 10,00g (coluna de maior diâmetro) de adsorvente através de um funil colocado em sua extremidade superior. Esta operação é efetuada com alimentação em pequenas porções, de forma contínua e sob vibração, conseguida por batimentos com um bastão de vidro tendo em sua extremidade uma rolha de borracha. Após total transferência da sílica, introduz-se um bastão de vidro de diâmetro externo próximo ao diâmetro da coluna. Batendo-se no topo do bastão por cerca de 5 minutos, para auxiliar no processo de compactação. Retira-se o bastão e mede-se a altura resultante da coluna.

Empregando duas pinças, fecham-se as extremidades da coluna com mangueira de silicone. Submete-se à vácuo a coluna, através da extremidade inferior. A seguir, fecha-se esta extremidade com a pinça de Hoffman e desconecta-se da bomba de vácuo. Através da mangueira de silicone, conecta-se uma bureta à extremidade superior que é mantida fechada com outra pinça. Na seqüência, abre-se a torneira da bureta e a seguir a pinça, transferindo-se cerca de 4,5 mL (coluna de menor diâmetro) ou 20 mL de hexano (coluna de maior diâmetro) para o interior da coluna. A pressão reduzida no interior desta permite que o solvente preencha os poros do leito. Desconecta-se a bureta, removendo o tubo de silicone.

Quando a coluna líquida através do leito alcança a proximidade da base da coluna, acopla-se ao tubo de silicone conectado a parte inferior, uma seringa e só então se abre a pinça nele acoplado. Empregando-se a seringa, aplica-se uma suave sucção para permitir total preenchimento do leito, o que se observa pelo aparecimento de solvente no tubo de silicone, situado imediatamente abaixo do duto de conexão da coluna. Mede-se então o nível final de solvente acima do topo do leito de sílica, deduzindo este volume do total transferido para a coluna. Conhecido o volume dos poros como também o volume do duto de conexão da coluna à válvula do coletor de frações é possível determinar o correspondente volume de coluna (VC).

Após o procedimento anterior, remove-se o conector ligado a parte inferior da coluna, colocando em seu lugar a válvula de restrição (f) esquematizada em corte na Figura 18. Esta permite controlar o fluxo através da coluna. A seguir, conecta-se a outra extremidade da válvula ao coletor de frações.

Pré-ajuste de vazão da coluna

Após o preenchimento da coluna com massa de adsorvente equivalente àquela que estará associada à amostra, alimenta-se a coluna com a solução eluente em estudo. Em seguida ajusta-se a pressão do nitrogênio monitorando a altura manométrica da coluna de mercúrio, até ser conseguida uma vazão de eluente, próximo de 2mL/min. Havendo impossibilidade de atendimento da vazão requerida, aumenta-se ou diminui-se a restrição na válvula (f) situada na saída da coluna, pelo ajuste da compressão da mola interna, de forma a aumentar ou diminuir a perda de carga. Uma vez atingida esta vazão, registrava-se o valor de pressão manométrica, de forma a reproduzir esta vazão nos experimentos posteriores, elaborados com a amostra a ser processada.

Preparação da amostra

Considerando a reduzida solubilidade da bixina e também no sentido de evitar alargamento das bandas, como consequência de sobrecarga de amostra na coluna, utilizou-se massa reduzida de amostra, na ordem de 0,2 mg. Ainda, para permitir melhor homogeneização e perfeita distribuição da amostra sobre a coluna, determinou-se previamente a capacidade máxima de saturação da sílica pela bixina proveniente de uma solução em clorofórmio. Neste sentido, evitava-se adicionar bixina além do limite de (1,4mg de bixina)/(g de sílica), valor de saturação determinado.

Após a análise do teor de bixina da solução, determinada segundo a metodologia II, Seção (3.9.1), transfere-se um volume preciso para um frasco de vidro, contendo 38,5 mg (coluna de menor diâmetro) ou 140 mg (para coluna de maior diâmetro) de sílica dispersa em 1,0 mL de clorofórmio. Fecha-se o frasco com uma rolha de borracha, sendo introduzido previamente através desta uma agulha, em cuja extremidade foi colocada uma pequena porção de algodão. Efetua-se vácuo até total eliminação do solvente. Terminada a operação observa-se o algodão para constatar a ausência de partículas arrastadas. Se positivo, transfere-se esta sílica para a coluna já preparada, cujo solvente situa-se um pouco acima do leito da coluna. Sobre a amostra depositada, coloca-se uma pequena porção de sílica, (também mantida inundada no solvente presente na coluna). Depois de removido o excedente de solvente acima da sílica, fecha-se a extremidade superior da coluna, acoplando-se a esta a tubulação de alimentação de fase eluente.

Frações coletadas da coluna flash

Para cada fase eluente de diferente polaridade elaborou-se uma curva de calibração. Volumes precisos de uma solução recém analisada de bixina foram transferidos para balões volumétricos e sob vácuo, o solvente era eliminado. Posteriormente re-dissolvia-se com o solvente correspondente a nova fase e fazia-se a varredura espectrofotométrica da solução. Identificado o pico da bixina, efetuava-se neste comprimento de onda a leitura das soluções que compunham a curva.

Percolação da coluna

Com o coletor de frações conectado ao conjunto e programado para coleta de 180 gotas por tubo, coloca-se a fase eluente no vaso de pressão e injeta-se nitrogênio no sistema. Com a válvula de restrição previamente ajustada, manipulações consecutivas na válvula do cilindro de nitrogênio permitem que a vazão através da coluna rapidamente entre em regime. Este ajuste se faz necessário devido à acomodação da coluna sob efeito da pressão aplicada ao leito. Para evitar erros nas variações da vazão durante a “corrida”, mede-se o volume de cada fração, empregando-se para tal um calibrador.

Realimentação do vaso de pressão

Havendo necessidade de realimentar a fase eluente fecha-se primeiro a válvula (4) situada logo abaixo da válvula de restrição (f), depois aquela imediatamente anterior à entrada coluna. Assim procedendo preserva-se a compactação do leito evitando depressurização da

coluna (a). Reduz-se a pressão do vaso (c), aliviando primeiro a válvula (1) reguladora de pressão do cilindro de nitrogênio (h). Faz-se o abastecimento com fase eluente. Pressuriza-se novamente o vaso (c) com a mesma pressão antes aplicada. Abre-se a válvula (3) de alimentação da coluna. Verifica-se se a pressão na coluna de mercúrio fora mantida inalterada. Só então se abre a válvula (4) de saída da coluna. Se a pressão da coluna sofrer um leve incremento abre-se levemente a válvula de dreno (2) e reajusta-se a pressão do cilindro. Na situação inversa aplica-se pequeno incremento na pressão do sistema.

Análise das frações

Para cada fração corada coletada, mede-se outra vez o volume no ato da análise corrigindo-se assim o efeito de evaporação ocorrida no intervalo de tempo entre a coleta e a análise. Quando há necessidade de diluição, esta é feita com o mesmo solvente empregado na eluição. Com a leitura da absorvância, determina-se a concentração contra a curva de calibração.

Para cada corrida foram elaborados os gráficos do volume percolado contra a concentração de bixina das correspondentes frações. Após integrar a massa de todas as frações associadas aos correspondentes volumes percolados, obtiveram-se os cromatogramas. Comparava-se ainda, a massa integrada àquela massa inicialmente colocada na coluna, procurando assim fechar um balanço de massa através da coluna.

Avaliação das frações por cromatografia em camada delgada TLC

Frações coletadas na cromatografia flash obtidas de fases móveis de diferentes relações de solventes foram reservadas para análise dos tempos de retenção pela técnica de TLC. A Tabela 10 apresenta as composições e os respectivos valores de polaridade das fases móveis empregadas na cromatografia flash e em camada delgada (TLC).

Tabela 10 - composição das fases móveis e suas polaridades

Solventes (%)		Índice de polaridade P
Acetato de etila	hexano	mistura
90	10	3,87
80	20	3,45
70	30	3,03
60	40	2,06
50	50	2,18
40	60	1,75
30	70	1,33

Índice de polaridade: hexano 0,06; acetato de etila, 4,3.

Ref. Snyder, Kirkland, J. J., (1979).

3.13 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE BIXINA

A obtenção de derivados de bixina teve como objetivo avaliar as características de novos compostos de forma a flexibilizar suas futuras aplicações. Estes compostos podem ter aplicação como matéria prima de partida para outros derivados funcionais, como ésteres de bixina ou norbixina ou ainda como padrão de referência. A substituição do hidrogênio do grupamento carboxílico pelo anion amônio tem por finalidade obter um derivado de maior solubilidade em solventes polares trazendo em consequência maior versatilidade na utilização do produto.

Produção do derivado amoniacal a partir de semente.

Preparar uma solução de etanol com 3 % hidróxido de amônio, acrescentando-se sulfato de sódio suficiente para remover a água transportada pela base. Depois de filtrada, esta solução é empregada para extração das sementes. Após agitação e aquecimento por 5 min. a 50 °C filtra-se a solução obtida. A seguir adiciona-se ácido acético, até não mais ser observado formação de névoa de acetato de amônio. Filtra-se o precipitado, lavando-o uma vez com éter etílico e depois com hexano até quase total descoloração da solução. A seguir lava-se com água gelada para remoção de algum residual de acetato de amônio e após, com acetona para eliminação da umidade e finalmente seca-se sob vácuo.

O precipitado obtido é novamente solubilizado com solução amoniacal. Esta solução é transferida para um rota-evaporador onde, sob aquecimento suave e redução da pressão

elimina-se a amônia residual e parte do etanol. Uma vez eliminado a amônia eleva-se a temperatura para redução do volume de etanol. Com a redução do teor de amônia e parcial redução do volume de solvente, tem início o processo de cristalização do composto. A condução do resfriamento de forma lenta permite obter precipitado enriquecido em composto amoniacal. O produto sólido obtido, depois de filtrado é lavado com acetona, e posteriormente seco a vácuo.

Repetindo-se a operação de solubilização com solução amoniacal e controlando-se o processo de eliminação da amônia e resfriamento é possível obter produto de grande pureza.

Produção de derivado de cálcio

Prepara-se uma suspensão de hidróxido de cálcio pela dispersão de 50 g de óxido de cálcio em um litro de água destilada. A seguir procede-se à filtração sob vácuo, adicionando-se sobre o filtrado solução alcoólica do derivado amoniacal de bixina. O precipitado formado depois de filtrado é lavado com água destilada para remover o excedente de hidróxido, seguido por uma lavagem com acetona. O precipitado obtido depois da secagem sob vácuo é conservado em frasco selado, e estocado no freezer.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho e a discussão dos principais avanços e restrições encontradas no seu desenvolvimento.

4.1 SOLUBILIDADE DA BIXINA E NORBIXINA EM DIFERENTES SOLVENTES.

Seleção de solvente.

A determinação da solubilidade da bixina e da norbixina, em diferentes solventes permitiu escolher a melhor rota de processamento, visando à purificação do corante de urucum, desde a fase inicial de remoção dos principais compostos contidos no arilo da semente. Estes dados possibilitaram minimizar as perdas de bixina decorrentes de solubilização, durante as consecutivas etapas de lavagem nos procedimentos de extração, como também contribuíram na otimização do processo de cristalização.

Nos processo de purificação da bixina, tanto através de recristalizações sucessivas quanto via cromatografia preparativa, foi empregado como matéria prima de partida o extrato solúvel obtido diretamente das sementes, empregando-se solventes orgânicos. Observou-se que a solubilidade tanto da bixina quanto da norbixina era extremamente baixa na maioria dos solventes. Desta forma um grande volume de solvente era consumido para a obtenção de pequena massa de produto isolado. A inexistência na literatura de números referentes à solubilidade da bixina e da norbixina, motivou a determinação destes dados.

Neste conjunto de experimentos para a determinação dos dados de solubilidade, devido à indisponibilidade de padrão com alta pureza, empregou-se um concentrado cujo teor de bixina foi determinado aplicando a metodologia I descrita na seção (3.9.1). Amostras provenientes da empresa CHR Hansen, (produzidas em 1999) indicando teores de 90% e 70% de bixina e norbixina respectivamente, foram empregados como padrão. Estes concentrados, na época dos experimentos apresentavam teores de, 24,64% e 27,88% de bixina e norbixina respectivamente. Com os concentrados tomados como padrão elaborou-se curva de calibração em solução de NaOH. 0,5 N. A utilização desta curva fez-se necessária, tendo em vista a

reduzida massa de padrão empregada nos ensaios de solubilidade, mas também devido a baixa concentração de material solúvel, o que tornaria impraticável a determinação da massa de extrato seco.

As soluções de bixina e norbixina em diferentes solventes orgânicos foram preparadas segundo o procedimento descrito na seção (3.6). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11, e Figura 17, respectivamente.

Tabela 11 - Solubilidade da bixina/norbixina em solventes orgânicos.

	Solvente	Bixina mg/mL	Norbixina mg/mL
1	Clorofórmio	3,75	0,29
2	Acetona	1,5	1,96
3	Acetato de etila	0,89	0,76
4	Metanol	0,38	0,68
5	Éter etílico	0,37	0,12
6	Etanol anidro	0,18	1,82
7	n-hexano	- *	- *
8	éter de petróleo	- *	- *

*não detectado por espectrofotometria.

Na Figura 19 é representada a solubilidade da bixina e norbixina nos referidos solventes

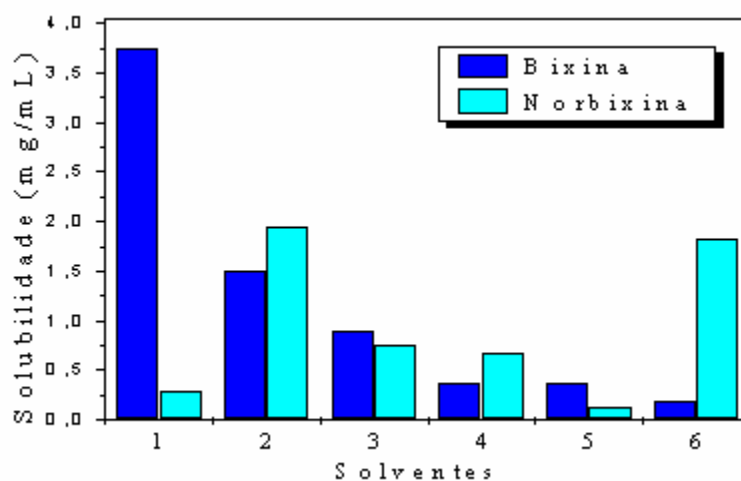


Figura 19 - Solubilidade da bixina e norbixina em diferentes solventes orgânicos.

4.1.1 SOLUBILIDADE EM SOLUÇÕES ALCALINAS.

A concentração da solução nesta série de ensaios foi determinada também por comparação do valor de absorvância com a curva de calibração. Todos os ensaios foram realizados a temperatura ambiente.

No procedimento de cálculo das massas de extrato seco das amostras dissolvidas em solução de hidróxido de sódio, foram deduzidas as massas de álcali, correspondentes às concentrações presentes nos volumes de soluções empregados. Contudo, não foram considerados os possíveis incrementos mássicos decorrentes de carbonatação do hidróxido de sódio ocorridos no curso da secagem.

Na Tabela 12 é apresentada a solubilidade da bixina em solução aquosa de hidróxido de sódio, enquanto a Tabela 13 mostra o comportamento da solubilidade de uma solução aquosa amoniacal com o incremento desta base. As Figuras: 20 e 21 mostram os gráficos das correspondentes Tabelas.

Tabela 12 - Solubilidade da bixina em solução aquosa de NaOH.

Solução de NaOH. Eq.g/L	Bixina mg/mL
0,01	0,05
0,1	0,37
0,5	2,14
1,0	4,71

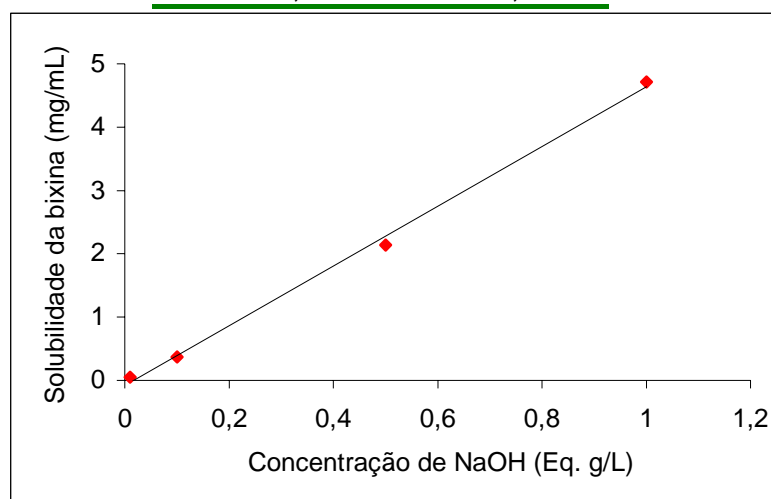


Figura 20 - Curva de solubilidade da bixina em solução aquosa de hidróxido de sódio.

Empregando-se a metodologia II descrita na seção 3.91, foram determinados os seguintes valores de solubilidade da bixina em solução etanólica com 3 % de NH_4OH , 4.30 mg/mL a 0°C e 6.25 a 25°C , respectivamente. A solubilidade a 40°C apresentou valores na ordem de 8,5 mg/mL. A dificuldade de filtração e coleta de solução acima da temperatura ambiente não permitiam uma determinação com maior precisão.

Tabela 13 - Solubilidade da bixina em solução aquosa de NH_4OH .

NH_4OH em água % v/v	Bixina mg/mL
0,1	0,06
0,5	0,24
1,0	0,40
3,0	2,92
5,0	6,14
10,0	46,82

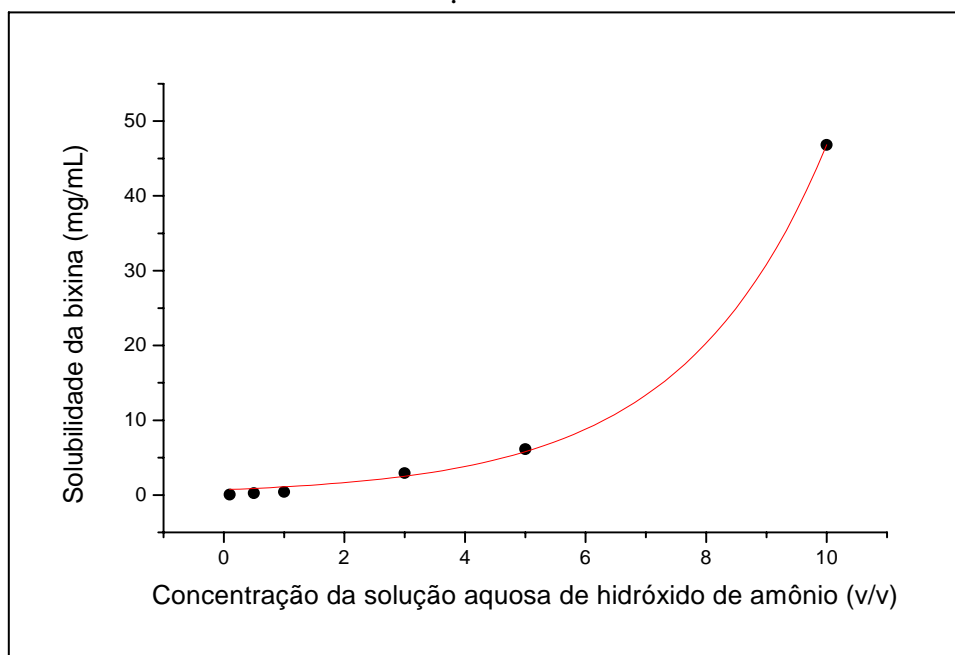


Figura 21- Solubilidade da bixina em solução aquosa de NH_4OH

Em solução de hidróxido de sódio, devido à hidrólise, grande parte do material solúvel se encontra na forma de norbixina. Contudo os cálculos foram expressos como base em bixina.

Os resultados de solubilidade obtidos para as diferentes soluções alcalinas mostraram haver um crescente aumento da solubilidade com o incremento da concentração da base empregada.

Solubilidade da bixina em solução hidro-alcoólica de hidróxido de amônio.

Os valores apresentados na Tabela 14 expressam a concentração de bixina em solução, enquanto na Tabela 15 os dados referem-se à concentração sobre extrato seco. A solubilidade foi avaliada para solução amoniacal hidro-alcoólica em diferentes relações destes componentes como também em concentrações variáveis de hidróxido de amônio. As medidas de solubilidade foram realizadas segundo a metodologia I descrita na seção (3.9.1). e determinadas à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3$).

Os dados apresentados nas Tabelas 14 e 15 podem ser vistos na forma gráfica nas Figuras: 22 e 23.

Tabela 14 - Concentração de bixina no extrato hidro-alcoólico amoniacal

Experimento	Valores de concentração da Bixina (mg/mL)			
	Etanol/água %	Concentração do NH ₄ OH		
		1%	2%	3%
1	80/20	13,61	14,07	9,77
2	70/30	19,82	14,42	14,71
3	60/40	18,50	17,98	17,87
4	50/50	18,67	19,53	20,74
5	40/60	*	17,23	21,15
6	30/70	*	16,43	17,06

* As amostras apresentaram-se emulsificadas, impedindo uma análise precisa da solução.
E = etanol e A = água.

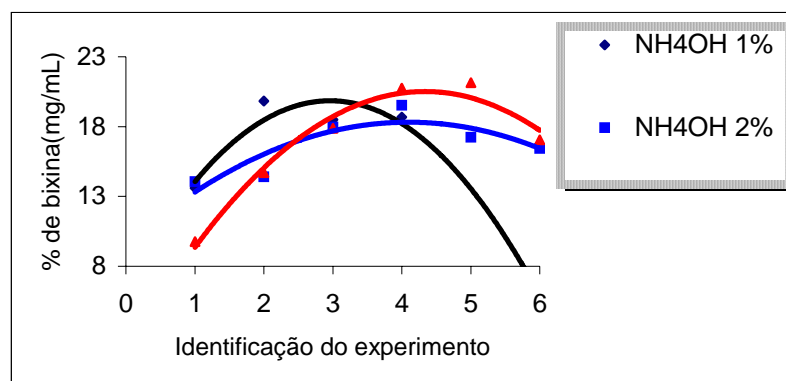
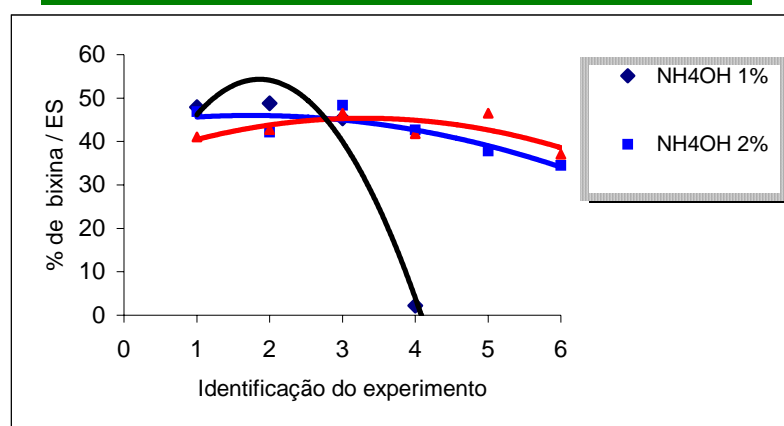


Figura 22 - Percentual de bixina no extrato hidro-alcoólico.

Tabela 15 – concentração de bixina no extrato seco hidro-alcoólico

Experimento	Concentração da bixina / Es (%)			
	Etanol/água	Concentração do NH ₄ OH		
		%	1%	2%
1	80/20	47,94	46,91	41,03
2	70/30	48,82	42,16	42,75
3	60/40	45,34	48,34	46,53
4	50/50	2,22	42,65	41,81
5	40/60	*	37,79	46,49
6	30/70	*	34,52	37,09

**Figura 23** - Percentual de bixina no extrato seco hidro-alcoólico

A redução do percentual de água dificultou o processo de separação devido à intensa emulsificação da solução. A partir da relação 80:20 todas as amostras apresentaram problemas de separação, independente da concentração de hidróxido de amônio empregado.

Pela análise dos resultados das Tabelas 14 e 15, observa-se que o aumento da concentração de hidróxido de amônio contribuiu para um acréscimo na concentração de bixina no extrato obtido, para aquelas soluções com maior teor de água. Por outro lado, de um modo geral, esta contribuição não parece tão clara para soluções ricas em etanol. A relação 60/40 etanol/água, contendo 2 % de hidróxido de amônio, apresentou-se como boa opção para realizar as extrações. Contudo, o aumento da concentração de amônia para 3% com uma conseqüente redução do teor de álcool como na relação 40/60, também levou a um favorável aumento da capacidade de extração.

Os resultados da relação intermediária 50/50, também apontam como opção de solução extratora. Considerando-se, entretanto, a maior facilidade de separação das soluções que contêm maior teor de álcool, a opção 60/40 confirma-se como sendo a mais indicada.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.

Encontra-se no arilo da semente do urucum a quase totalidade de seus corantes, destes, a bixina representa até 80 %. Remover o pigmento aderido à semente onde se encontra a bixina apresenta certa dificuldade, visto que esta se encontra envolvida por outros compostos, dentre os quais um óleo denominado olerina. Estes óleos acarretam problemas de separação, particularmente quando o processo de remoção é conduzido usando-se água como veículo. Outro grande inconveniente a ser destacado deve-se à configuração das sementes que apresentam pequenas cavidades, o que dificulta uma eficaz remoção dos corantes retidos naquelas depressões.

Os experimentos realizados tiveram como objetivo avaliar as variações na concentração de bixina no extrato sólido e no extrato solúvel, decorrentes das diferentes condições a que são submetidas as sementes durante o processo de extração. Isto porque, não só a bixina, mas muitos dos compostos presentes no arilo da semente apresentam reduzida estabilidade química, frente a diversos fatores como: luz, calor, mudanças de pH e oxigênio. Esta avaliação é de fundamental importância visto que, as condições de processamento da semente, além de afetar o rendimento de extração, podem acarretar maior grau de dificuldade nos processos subsequentes de isolamento e purificação da bixina pela incorporação ao extrato solúvel de um grande número de componentes indesejáveis, presentes naturalmente na semente, ou aqueles provenientes de degradação.

Soluções alcalinas ou solventes orgânicos são empregadas para a extração do pigmento. Contudo, um maior tempo de contato das sementes durante o processo de extração pode favorecer a degradação parcial de muitos compostos seja pelas severas condições de pH, calor, ou mesmo pela natureza do reagente empregado.

O volume de semente é muito grande em relação à quantidade de pigmento presente, isto requer o emprego de grande quantidade de solvente. Desta forma, quando se deseja o extrato sólido seco, faz-se necessário recuperar aquele insumo, via destilação, no caso de solvente orgânico, o que além de onerar o processo, também submete o produto a condições que favorecem sua degradação.

O emprego de água nos processos de remoção do pigmento associado à agitação mecânica levava à formação de uma emulsão. A presença de material particulado, de

dimensões reduzidas, removido por atrição e disperso na emulsão, inviabilizava a subsequente operação de filtração ou decantação. Também neste caso a reduzida massa de pigmento comparado ao volume de semente requeria o emprego de um grande volume de água para condução do processo, agravando ainda mais o problema. Por outro lado, a separação por centrifugação só foi conseguida à elevada velocidade e a filtração também não se mostrou eficiente, exigindo pressões elevadas devido à formação de uma pasta viscosa.

Um processo alternativo, de floculação ou precipitação da suspensão, através da adição de agente floculante, com o propósito de eliminar o excessivo volume de fluido de processo, pode trazer problemas nas fases posteriores de purificação.

A ação de uma solução de hidróxido de sódio ou potássio sobre a semente conduz a hidrólise da bixina a norbixina, levando também a remoção do pigmento e os compostos a ele associado. A posterior adição de um ácido sobre o extrato alcalino obtido leva à precipitação da norbixina formada, favorecendo a remoção do excedente de água.

Ácidos clorídrico e acético foram testados como agente de precipitação, como também sais solúveis de cálcio e bário (cloreto e acetato). Todas as variantes testadas levaram a bons resultados de precipitação, permitindo fácil filtração.

Entretanto as condições que propiciam a hidrólise da bixina, também podem hidrolisar outros ésteres presentes nas sementes, o que pode caracterizar-se como um problema adicional futuro na tentativa de purificação dos produtos.

Uma rota testada que se mostrou muito promissora foi o uso de uma base com menor grau de dissociação. Foram empregadas: soluções amoniacaís, aquosa e alcoólica anidra. Ambas removeram com facilidade os pigmentos da semente, contudo, os problemas associados à emulsificação e dificuldades de eliminação da água também são observados com o emprego da solução aquosa. Observa-se, no entanto, que a solução alcoólica amoniacal anidra além de possuir maior capacidade de dissolução da bixina que a solução aquosa, não apresenta problemas de emulsificação, permitindo rápida extração e fácil filtração.

A adição de ácido, sais de cálcio ou bário à suspensão amoniacal obtida, resultou em rápida floculação, da mesma forma que a obtida com hidróxido de sódio. Estes ensaios serviram de base para obtenção de derivados de cálcio cujos ensaios são discutidos na Seção 4.3.2.

A presença de óleo na semente não só reduz a concentração de bixina no extrato sólido obtido, como também dificulta o processo de purificação, visto que além de favorecer a formação de emulsão, quando se tem água presente, incorpora também ao extrato emulsificado compostos que possuem afinidade por solvência. Sendo assim, foram efetuadas extrações prévias, no sentido de obter um extrato sólido enriquecido em bixina e com baixo teor em óleo. Observou-se que tanto o hexano quanto o éter de petróleo removiam compostos corados da semente, contudo não solubilizavam a bixina quando pura (isenta de óleo).

Experimento preliminar para extração dos óleos das sementes empregando estes solventes não resultou na total eliminação de cor, ainda que tenham sido feitos muitos ciclos de extração em Soxhlet (8 horas de extração, com ciclos de cerca de 12 minutos, repetidos por 5 dias, com interrupção no período noturno). O prolongado tempo de contato sob aquecimento propiciava a degradação da bixina, levando à redução dos teores presentes com conseqüente formação de subprodutos de decomposição, de coloração amarela, solúveis no solvente empregado.

A associação de um solvente polar ao hexano ou éter de petróleo, em um processo de extração a frio, mostrou-se eficaz na remoção do óleo, mesmo acarretando, na fase inicial do processo uma pequena remoção de bixina solúvel no óleo. Além do etanol, éter etílico e acetona também foram testados como solventes polares associados ao hexano. Todos apresentaram bons resultados, entretanto, por serem menores as perdas de bixina no etanol, este solvente foi escolhido para a etapa inicial de remoção da camada de pigmento que envolve as sementes.

4.2.1 TEORES DE BIXINA DO EXTRATO SOLÚVEL DURANTE OS CICLOS DE EXTRAÇÃO.

No sentido de otimizar o número de ciclos necessários à obtenção de um extrato sólido rico em bixina, a cada ciclo de extração foram monitorados na solução de lavagem, os teores de bixina e extrato seco, segundo procedimentos descritos nas Seções (3.9.1) e (3.9.2) respectivamente. Ainda, para minimizar os riscos de incorporação ao pigmento de componentes provenientes do interior da semente, estas eram separadas imediatamente após o primeiro ciclo, depois de removido o pigmento, reduzindo assim o prolongado tempo de contato, o que favoreceria processos de difusão. Todos os ciclos foram realizados a temperatura ambiente.

Foram realizados cinco experimentos com o objetivo de otimizar o processo extrativo, constituído de sucessivas etapas, aqui denominadas ciclos de extração. As avaliações da massa de extrato seco e percentual de bixina no extrato solúvel foram determinadas para todos os experimentos, porém, diferentes relações entre; a massa de substrato, semente ou extrato bruto (pigmento isento da semente) e o volume de solvente foram empregadas nos distintos ensaios, conforme mostrado na Tabela 8.

Nas Tabelas 16, 17, 18 e 19 são apresentados os dados obtidos dos experimentos de extração. Na segunda coluna é mostrada a concentração de bixina, expressa como percentual mássico sobre o extrato seco, na terceira, a massa de sólidos totais (extrato seco) em mg/100mL de solução e na quarta coluna é apresentada as perdas de bixina [mg de bixina/100mL] decorrentes das lavagens, a cada ciclo de purificação do extrato sólido.

Experimento 1.

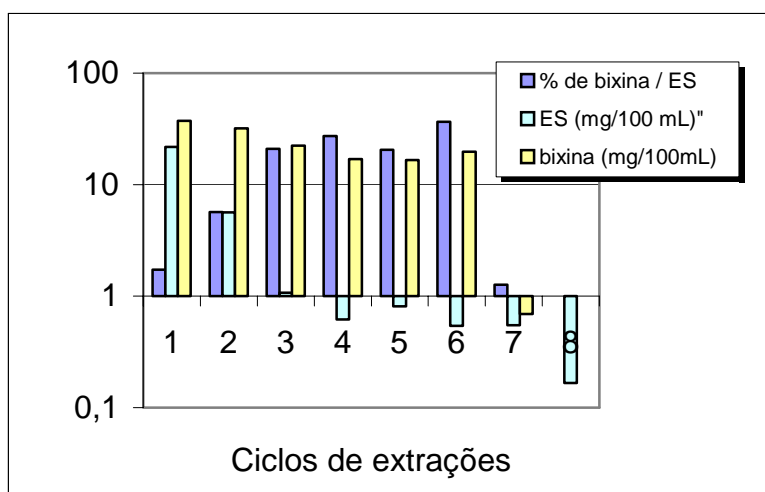
O procedimento para execução deste experimento está descrito na Seção (3.4), Procedimento I. Para a determinação do extrato seco (ES) empregou-se o procedimento descrito na Seção (3.9.2) e para análise da concentração de bixina o descrito na Seção (3.9.1), metodologia I. A partir do oitavo ciclo de extração em diante não mais se detectava bixina, pois não havia mais concentração significativa de etanol que resultasse na solubilização de bixina o que produzia um extrato visualmente incolor.

Após o último ciclo de lavagem, o extrato sólido foi dividido em duas frações, as quais foram submetidas à extração com dois diferentes solventes. A primeira fração, extraída com acetona, produziu um extrato seco com 56,55 % de bixina e a segunda, com solução hidroalcoólica amoniacal 60/40/3 v/v, produziu um extrato seco com 87 % de bixina. Todas as análises foram realizadas segundo a metodologia descrita na Seção (3.9.1) Metodologia I. Os resultados deste experimento são mostrados na Tabela 16 e Figura 24.

Tabela 16 – Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração - Experimento 1.

Ciclo	Bixina / ES %	ES (mg/100 mL)	Bixina (mg/100mL)
1	1,72	21,74	37,39
2	5,69	5,63	31,97
3	20,97	1,07	22,43
4	27,31	0,62	16,93
5	20,58	0,81	16,66
6	36,45	0,54	19,68
7	1,26	0,55	0,69
8	Nd	0,17	Nd

Solvente empregado: do ciclo 1 ao ciclo 6, mistura hexano / etanol 50/50, sétimo e oitavo ciclo, hexano puro.

**Figura 24** - Evolução da concentração de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - Experimento 1.

Experimento 2.

Neste experimento foram adotados os mesmos procedimentos aplicados ao experimento 1, com o objetivo de reproduzir dados nele obtidos. O tempo de contato do solvente com a semente favorece a extração de compostos internos contidos no grão, da mesma forma que uma inadequada agitação pode acarretar em ineficaz remoção do pigmento das cavidades da semente. Estes fatores associados à técnica analítica adotada podem ter contribuído para os diferentes resultados obtidos, assim como os possíveis erros na determinação da massa, visto que ser reduzido o volume de amostra coletado para determinação do extrato seco. Ainda, alguns compostos presentes no extrato são voláteis, de

forma que um maior tempo de secagem pode acarretar na eliminação de parte destes compostos ocasionando, em consequência, perda de massa. Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 17 e Figura 25.

Tabela 17 - Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração - Experimento 2.

Ciclo	Bixina / ES %	ES (mg/100mL)	Bixina (mg/100mL)
1	2,91	29,89	86,90
2	315	5,54	17,40
3	9,47	2,54	24,00
4	29,80	0,79	23,50
5	35,01	0,45	15,70
6	5,78	0,29	1,60
7	2,78	0,14	3,80

Solvente empregado: do ciclo 1 ao ciclo 6, mistura hexano / etanol 50/50, sétimo e oitavo ciclo hexano puro.

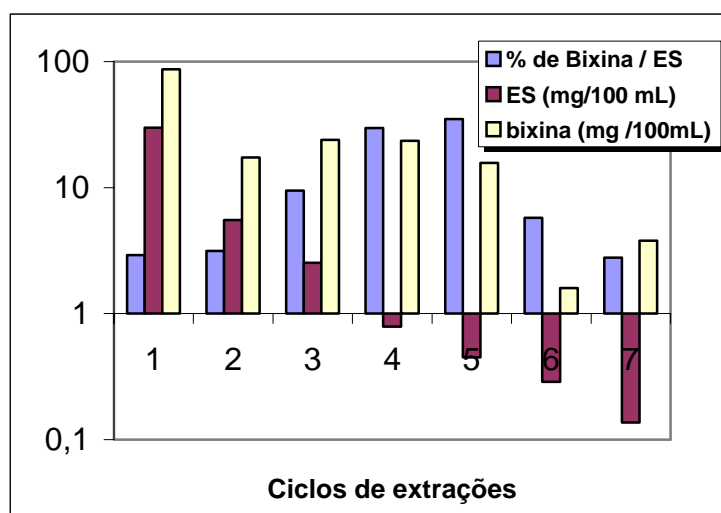


Figura 25 - Evolução da concentração de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - experimento 2.

Experimento 3.

O experimento 3 difere dos anteriores 1 e 2 na relação de semente/solvente empregada como também pelo emprego de mistura hexano/etanol na proporção de 1/1 utilizado em todos os ciclos. Os resultados deste experimento são mostrados na Tabela 18 e Figura 26.

Tabela 18 - Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração - Experimento 3.

Ciclo	Bixina / ES %	ES (mg/100mL)	Bixina (mg/100mL)
1	5,65	5,69	31,85
2	22,24	1,13	25,17
3	19,60	1,30	25,44
4	18,35	0,92	16,80
5	44,86	0,33	14,98
6	47,44	0,34	15,93
7	38,25	0,38	14,45
8	52,43	0,32	16,98

Solvente empregado: Hexano / etanol 50/50 nos oito ciclos.

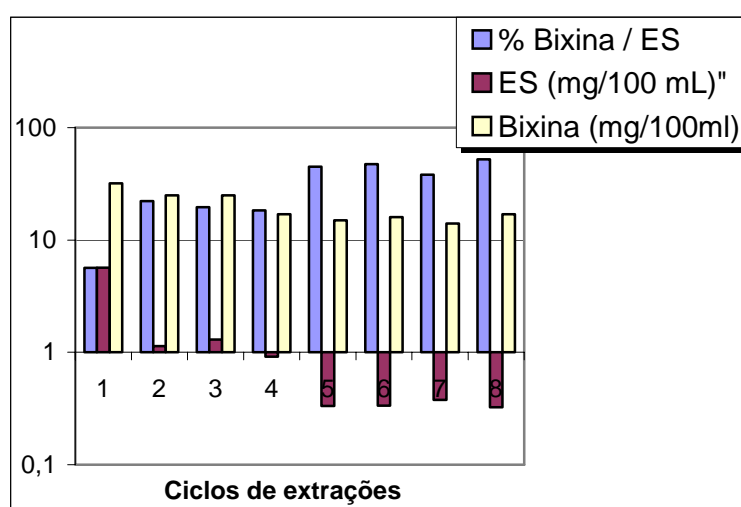


Figura 26- Evolução da concentração de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - Experimento 3.

Experimento 4.

O experimento 4 foi realizado com massa maior de semente em relação à mistura solvente. O teor de bixina no extrato foi determinado segundo descrito na seção (3.9.1) procedimento Metodologia II usando clorofórmio como solvente para espectrofotometria. Detalhes deste experimento encontram-se na Tabela 8 e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 19 e Figura 27.

Tabela 19 - Teores de bixina e extrato seco por ciclos de extração - Experimento 4.

Ciclos	Bixina/ES %	ES mg/mL	Bixina (mg/100mL)
1	2,90	46,47	134,67
2	8,23	6,57	54,01
3	17,11	1,55	26,44
4	26,53	0,92	24,40
5	28,49	0,91	25,92
6	34,42	0,57	19,45
7	35,76	0,56	20,02
8	16,24	0,12	1,95
9	0,46	0,07	0,03

Solvente empregado: do ciclo 1 ao ciclo 6, mistura hexano / etanol 50/50, sétimo e oitavo ciclo hexano puro.

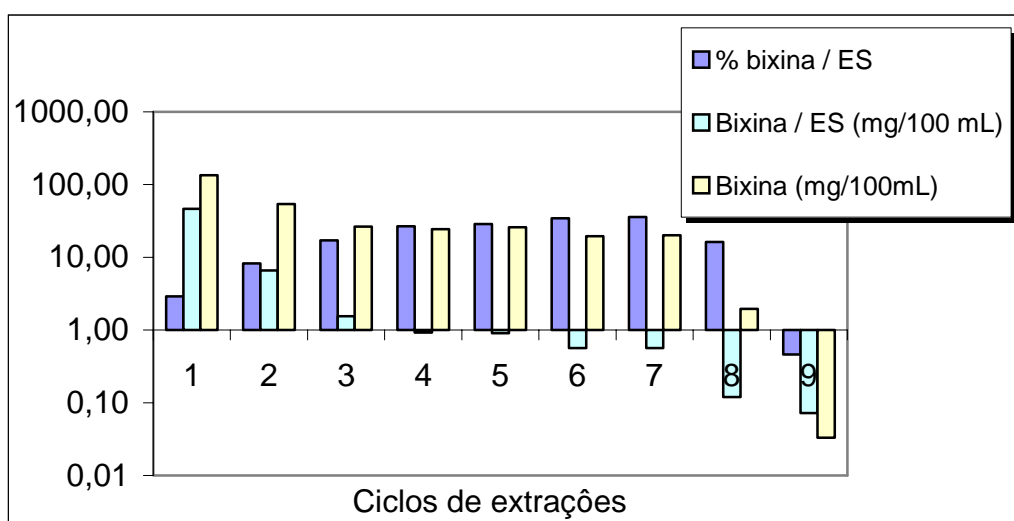


Figura 27 - Evolução das concentrações de bixina e extrato sólido por ciclo de extração - Experimento 4.

4.2.2 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÉTER EM SUBSTITUIÇÃO AO ETANOL

Experimento 5

O experimento 5 teve como objetivo avaliar a troca do etanol, por um solvente de menor polaridade associado ao hexano e o conseqüente benefício ao processo de purificação do extrato, no sentido de aumento do teor de bixina. Ainda, verificar a extensão da

contaminação do extrato obtido pelos compostos presentes no interior da semente, os quais são incorporados a bixina durante o processo do seu isolamento. Na Tabela 20 são apresentados os dados referentes ao experimento de número 5 e cujas condições de processo constam da Tabela 8. A metodologia empregada neste experimento está descrita na Seção (3.4) Procedimento II.

Tabela 20 - Teores de bixina no extrato alcoólico e etéreo – Experimento 5

Amostras	Ciclos					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
1S	3.05	8.37	14.38	15.89	21.88	12.97
2S	5.75	18.62	35.07	36.08	35.25	39.19
1E	38.42	52.61	66.69	-----	47.69	64.70
2E	72.83	100.61	56.94	70.88	72.90	75.86

Obs.: valores em % (massa de bixina/massa de extrato seco); **1**- solvente, etanol; **2** – solvente, éter etílico; **S** - semente; **E** - pigmento removido do grão.

Observa-se neste ensaio uma superior vantagem da utilização do éter etílico em substituição do etanol, como também do emprego do pigmento isolado comparado à semente. Contudo, no que se refere aos valores obtidos, percebe-se que os mesmos não apresentaram uma tendência de crescimento como se esperava, visto que, os últimos extratos deveriam apresentar maiores teores de bixina após sucessivas remoções do óleo, o que não ocorreu. Em alguns casos nota-se até redução dos valores. Este problema deve-se, entre outros, à dificuldade de se trabalhar com volumes e massas reduzidas, e que é agravado, quando se trata do emprego de solventes de elevada volatilidade, como se observou particularmente com o éter etílico, o que em consequência pode ter acarretado erros.

Estes ensaios foram realizados tomando-se pequenas amostras, com micropipeta. Com o éter em especial, é muito difícil operar este tipo de dispositivo, pois a elevada pressão de vapor do solvente frequentemente expulsa a amostra das ponteiros podendo nesta situação acarretar erro de volume. Sendo assim seria conveniente repetir estes ensaios com volumes maiores ou empregando a bureta com escala expandida, conforme ilustrado na Figura15. Outra provável explicação se deve à ausência de seletividade destes solventes. Observa-se ainda ser reduzida a concentração de bixina nos extratos obtidos das sementes, para ambos os solventes empregados, comparados àqueles obtidos do pigmento extraído dos grãos, independente de ter sido feito para este um ciclo a mais, na fase de separação inicial. Este

resultado, em contrapartida, mostra a extração paralela de componentes do grão, contribuindo assim com a diluição da bixina no extrato obtido.

4.2.3 EXTRAÇÃO DE BIXINA COM SOLUÇÃO ALCOÓLICA AMONICAL.

O emprego de solução etanólica anidra de hidróxido de amônio permitiu melhores resultados de extração. Esta técnica mostrou-se mais seletiva, permitindo isolar, pelo emprego de um volume reduzido de solvente, uma massa de bixina muito superior àquela obtida, pela utilização de acetona ou mesmo clorofórmio, solvente orgânico no qual a bixina tem a melhor solubilidade. Os valores de solubilidade em solução amoniacal (4,30 mg/mL a 0 ° C a 6, 8 mg/ mL, a 25°C) foram superiores aqueles obtidos para os solventes mencionados, cujos valores são apresentados na Tabela 21.

Dois procedimentos foram adotados nesta rota de extração:

i) Extração amoniacal do pigmento removido da semente com hexano/etanol

Seguindo o procedimento descrito na Seção (3.4) o pigmento, isolado da semente, foi lavado duas vezes com pequeno volume de etanol, com o objetivo de remover todo o hexano. Ao extrato sólido resultante foi então acrescentado 300mL de etanol absoluto, 20g de Na₂SO₄ anidro e 20 mL de hidróxido de amônio (NH₄OH~30%). Aquecido próximo à ebulição por 5min, filtrou-se a quente. A seguir adicionou-se ácido acético glacial gota a gota, até não mais ser observado a formação de névoa de acetato de amônio, acima da superfície da solução. Agitado por cerca de 10 min deixou-se repousar no freezer. Filtrando ainda gelado. Os cristais foram lavados com pequena porção de etanol gelado. O produto final assim obtido apresentou concentração de 80,12% de bixina.

ii) Extração amoniacal diretamente da semente.

Neste experimento, as sementes foram tratadas diretamente com a solução alcoólica amoniacal anidra a 45° C durante 15 minutos. A solução, depois de removida a semente, foi filtrada sob pressão e imediatamente precipitada com ácido acético. Após outra filtração, o precipitado foi sucessivamente lavado: com. éter etílico/hexano, uma vez, depois com hexano/álcool e posteriormente seis vezes com hexano. Seguido por outra dissolução com

solução alcoólica amoniacal e precipitação produziu bixina com 87,03 % de pureza. Após a última precipitação, é conveniente lavar com água destilada, desaerada, no sentido de eliminar resíduo de acetato de amônio proveniente da neutralização do hidróxido de amônio pelo ácido acético. Para eliminar o residual de água de lavagem é feito uma última lavagem com etanol ou acetona e posterior secagem sob vácuo. No anexo A é apresentado um balanço de massa representativo do processo de extração amoniacal.

A extração do pigmento da semente com solução amoniacal, efetuada no primeiro estágio do processo, seguida de precipitação e lavagem com solvente orgânico, com posterior re-dissolução amoniacal e precipitação, mostra-se mais seletiva do que a extração previa com hexano/álcool seguida por um único ciclo de extração amoniacal e posterior precipitação. Isto se deve provavelmente a maior seletividade da solução amoniacal em extrair preferencialmente a bixina, na forma de bixato de amônio, mais solúvel e deixando insolúveis aqueles compostos solúveis no hexano, de forma que estes contaminantes sejam eliminados, em grande parte, já no início do processo.

4.3 DERIVADOS DA BIXINA

4.3.1 DERIVADO AMONIACAL

O processamento do substrato contendo bixina, com solução alcoólica anidra amoniacal, levou a uma maior solubilidade da bixina, devido à formação de um sal mais solúvel (bixato de amônio), do que o correspondente tratamento com solução aquosa de hidróxido de sódio ou potássio, que por outro lado, conduz à hidrólise produzindo norbixina, menos solúvel. A solução assim obtida, ao ser tratada com ácido mineral ou orgânico levou a ao isolamento de bixina. Isto ficou evidente ao ser observado, que o precipitado obtido apresentava as mesmas características de solubilidade da bixina nos diferentes solventes testados, distinto dos valores de solubilidade apresentado pela norbixina, com manutenção de outras propriedades físicas. O precipitado apresentou ponto de fusão entre 190-192 °C em um ensaio realizado a uma taxa de aquecimento de 10 ° C/min. Valor este próximo àquele encontrado por Reith e Gielen (1971) para a cis-bixina, 189,5 – 190,5 °C (1,6° C/min, na região de fusão). O ponto de fusão para os isômeros da norbixina determinado pelos mesmos autores situava-se acima de 240°C. A Figura 28 representa a provável estrutura do sal da cis

bixina (bixato de amônio), sua formação da solução amoniacal, além da reação de hidrólise e precipitação da bixina e norbixina.

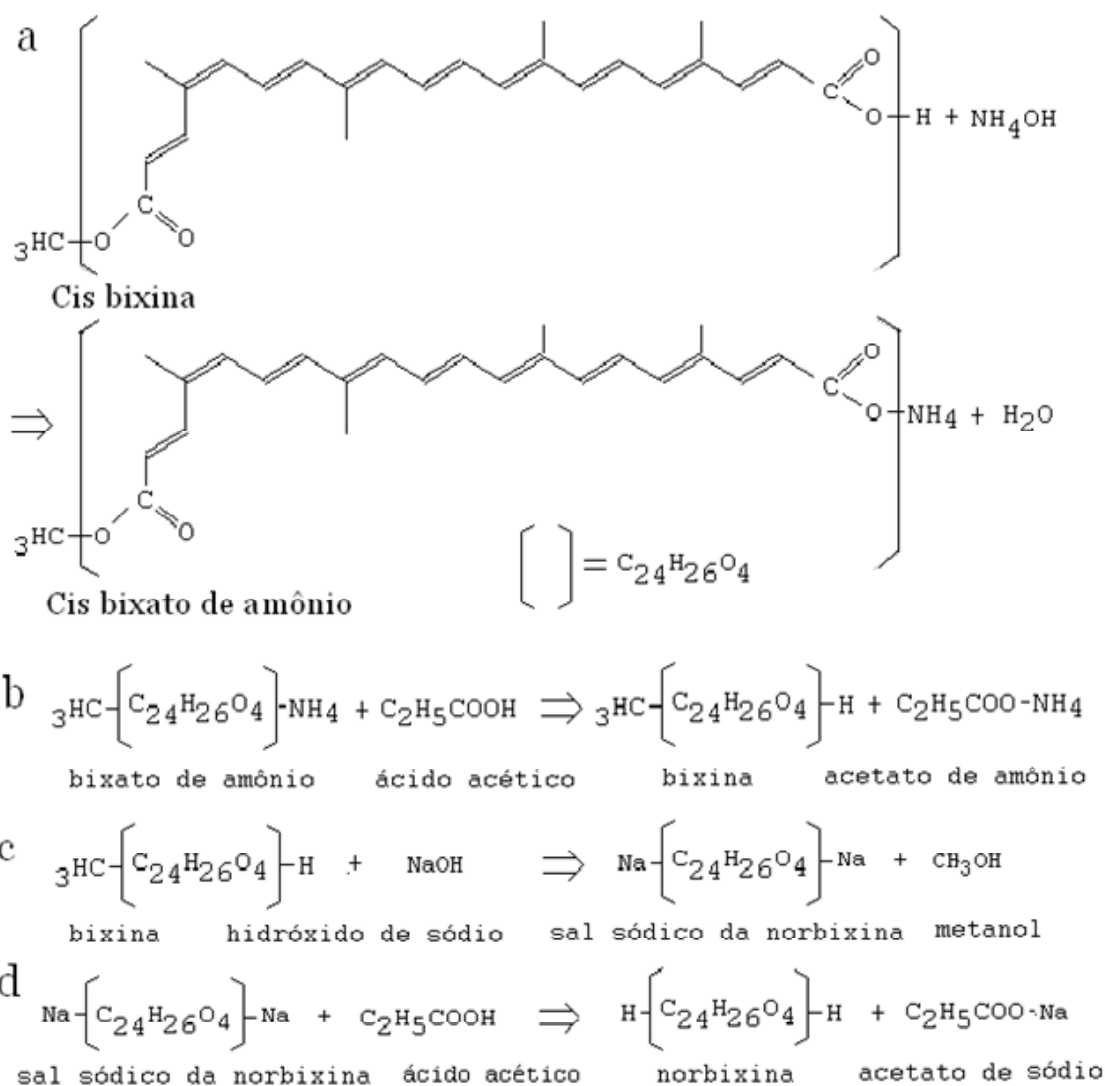


Figura 28 – Reações da bixina e provável estrutura do sal amoniacal

a – reação de formação do bixato de amônio, b – reação de precipitação da bixina de uma solução amoniacal de bixato de amônio, c – reação de hidrólise da bixina (formação de norbixina), d – reação de precipitação da norbixina.

4.3.2 DERIVADO CÁLCICO

Foi observado que a adição de íons cálcio às soluções alcalinas: aquosa, alcoólica, ou alcoólica amoniacal de bixina levavam à formação de precipitado vermelho escuro e conseqüente redução da cor da solução. Entretanto as soluções neutras do derivado amoniacal, fossem elas, aquosa ou alcoólica não precipitavam com a adição de íons cálcio. Ocorre que, a presença de íons cálcio em meio alcalino leva também a precipitação de hidróxido de cálcio. Sendo assim, este procedimento quando empregado resulta na precipitação do hidróxido de cálcio com a co-precipitação da bixina.

Para evitar a precipitação de hidróxido de cálcio procedeu-se a precipitação de uma solução amoniacal de bixina com a adição de uma solução (filtrado) recém preparada de hidróxido de cálcio, facilmente obtida pela hidratação de óxido de cálcio. Nesta condição, a presença de íons cálcio aquém do produto de solubilidade do hidróxido, permitiu a precipitação apenas do derivado de bixina. A adição de uma solução alcoólica de bixina a uma solução do hidróxido também resultou na precipitação. Contudo, a maior solubilidade em etanol do derivado amoniacal, comparada a bixina, apresenta vantagens de processo permitindo obter maiores massas de extrato empregando-se volumes menores de solvente.

No anexo B são apresentadas microfotografias dos cristais de bixina e do derivado amoniacal obtidos em diferentes solventes. As microfotografia do resíduo obtido da evaporação dos solventes empregados nos ensaios de solubilidade do derivado cálcico da bixina, apresentadas no mesmo anexo não mostram sinais de formação de produto com características de sólidos cristalinos, o que se observa é a presença de um resíduo oleoso.

Com amostras dos precipitados obtidos foram também determinados espectros de IV e a solubilidade em diferentes solventes segundo procedimento descrito na Seção (3.6). Na Tabela 21 são apresentados os resultados de solubilidade.

As análises espectrométricas de infravermelho são apresentadas nas Figuras 29, 30 e 31.

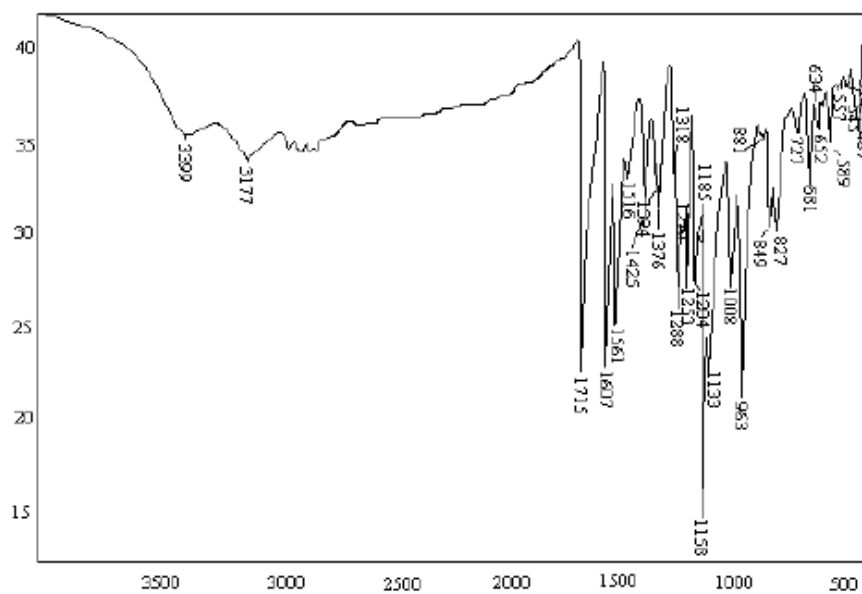


Figura 29 - Espectro no infravermelho da bixina

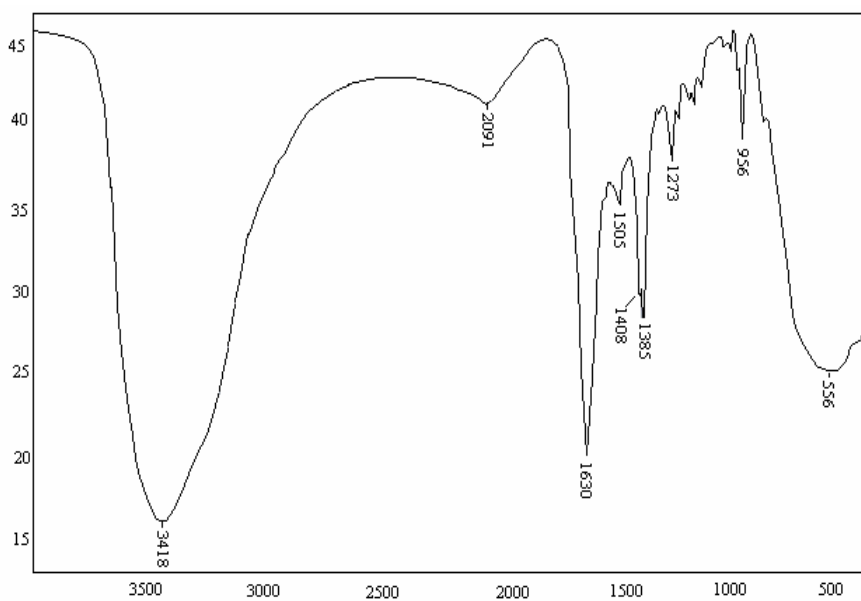


Figura 30 - Espectro no infravermelho do derivado cálcico da bixina.

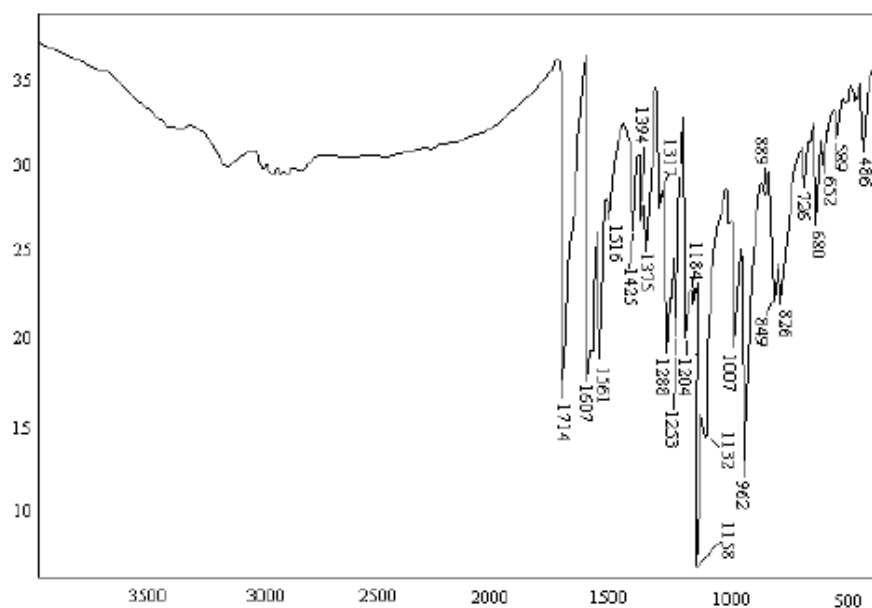


Figura 31 - Espectro no infravermelho do derivado amoniacal

Para o espectro da bixina observam-se sinais em 1715 e 1607 cm^{-1} correspondente a banda referente à carbonila, e uma banda larga na região entre 3000 e 3500 cm^{-1} correspondente ao sinal do grupamento ácido.

Para o derivado cálcico observa-se uma banda larga e intensa diferenciada na região correspondente ao grupamento ácido. Observa-se também uma sobreposição dos dois sinais da carbonila na região de 1630 cm^{-1} .

Pela análise do espectro não é possível inferir se a outra extremidade da molécula sofrera hidrólise, neste caso formando não apenas um diéster, mas sim uma substância de maior peso molecular com as extremidades da cadeia interligadas por átomos de cálcio bivalente. No entanto, a reduzida solubilidade como também a ausência de cristais após a evaporação das soluções nos diferentes solventes reforça a suspeita de formação de um oligômero.

O espectro para o derivado amoniacal não elucida a formação de um sal ou mesmo de uma amida, porém, uma vez garantida a total eliminação da amônia, no processo de sua preparação, fica descartada a hipótese de favorecimento da solubilidade por aquela base. Por outro lado, os dados de solubilidade mostram a existência de um composto distinto da bixina, apresentando maiores valores de solubilidade, particularmente em solventes de maior polaridade. Característica esperada ao substituir o hidrogênio pelo grupamento NH_4 , mais

dissociável. A análise complementar por RNM traria subsídios para resolução do problema. Contudo, não foi possível ser realizado no presente trabalho.

4.4 OBTENÇÃO DE BIXINA CRISTALIZADA

Cerca de 5,0 g de pigmento, removido das sementes segundo procedimento descrito na Seção 3.6.1, exceto que neste experimento o etanol foi substituído pela acetona, foram submetidas à cristalização em acetona, segundo o procedimento descrito na Seção 3.11. O filtrado resfriado foi transferido para um Becker com o objetivo de novamente saturar a solução com mais bixina não extraída (não solubilizada) no primeiro ciclo. Esta operação foi repetida por cinco vezes até quase total esgotamento da bixina contida no extrato sólido, o que foi observado pela mudança de cor da fração insolúvel, que passou do roxo avermelhado intenso ao amarelo pálido. Durante estes ciclos houve a necessidade de reposição de acetona para compensar perda por evaporação.

Partindo-se de extrato sólido com 55 % de pureza, obtido de extração com acetona/hexano e empregando acetona PA, no primeiro dos cinco ciclos de cristalização efetuados, foram obtidos cristais com pureza de 81,53 %. Todo o conteúdo de cristais obtidos nos ciclos posteriores foi reunido em um único lote que apresentou, após homogeneização, uma concentração de 77,2 % de bixina.

Experimento semelhante, porém empregando-se etanol/hexano na fase inicial de extração e que levou a um concentrado sólido com 50,79% de pureza, produziu cristais com 72,60 % de bixina no primeiro ciclo de cristalização em acetona, caindo para 63,6% na amostra obtida pela homogeneização dos ciclos consecutivos.

Os resultados mostraram que a reutilização da solução mãe é desaconselhável, visto que as impurezas mantidas em solução após a separação dos cristais são incorporadas aos novos cristais formados no processo posterior de cristalização, devendo-se, portanto, empregar solvente PA a cada novo ciclo de cristalização.

4.5 RECRISTALIZAÇÃO DA BIXINA

No curso dos trabalhos, após otimização do processo de extração, foram repetidos por diversas vezes o procedimento de recristalização, com o objetivo de obter-se padrão de alta pureza e recém preparado. Experimentos realizados com sucessivas etapas de cristalização da bixina usando-se solvente PA, a cada novo ciclo, permitiram obter cristais com pureza que variaram de 94,03% até 98,27 %. Observa-se que quanto maior a concentração do extrato bruto, mais fácil à obtenção de cristais com maior pureza, inclusive sem a necessidade de um grande número de ciclos de recristalização. O experimento que conduziu a 98,27 % de pureza resultou de um extrato obtido de extração alcoólica amoniacal com resfriamento lento controlado, o que reforça a necessidade de boa formação dos cristais relacionada à sua pureza. Este grau de pureza foi conseguido com um único ciclo de cristalização.

Tomando-se por base os resultados obtidos dos experimentos de extração e determinação da solubilidade da bixina, é possível definir uma rota para extração e purificação de pigmento, ou mesmo a condução de um processo que leve à obtenção de bixina com elevada pureza. Na figura 32 é apresentado o fluxograma que resultou do conjunto de observações obtidas deste estudo.

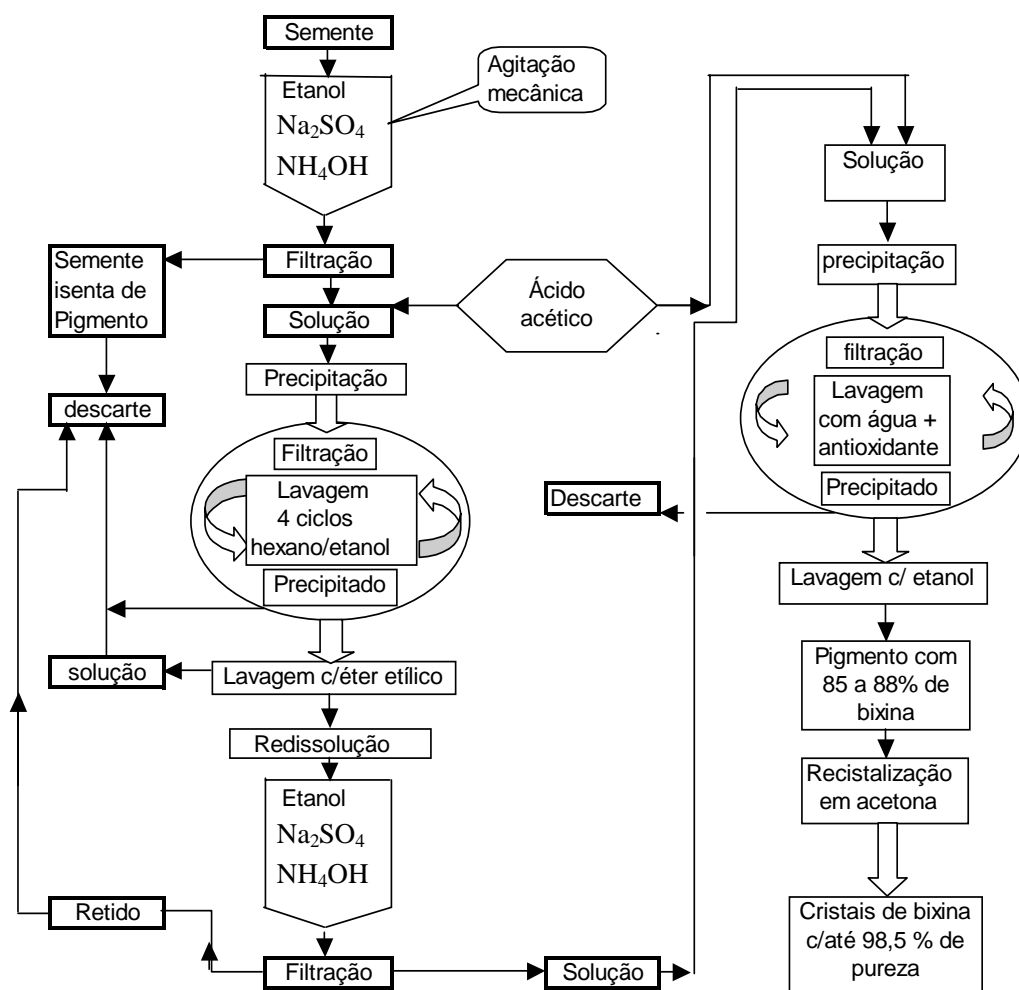


Figura 32 - Fluxograma de Extração, pré-purificação e cristalização de bixina obtida de semente de urucum.

Neste processo de cristalização, quanto mais lento era conduzido o resfriamento, mais puro eram os cristais obtidos. Nesse sentido é conveniente re-aquecer a solução imediatamente após a filtração permitindo assim um resfriamento mais uniforme e sob repouso. A transferência para um recipiente isolado termicamente também propicia condição favorável a um bom desempenho deste processo. Ainda, cuidados quanto ao isolamento da luz durante o procedimento de filtração também é prática aconselhável.

4.6 SOLUBILIDADE DA BIXINA E DERIVADOS (METODOLOGIA II)

Na Tabela 21 são apresentados os valores de solubilidade da bixina, do derivado amoniacal, do derivado de cálcio e da norbixina, cuja determinação se fez empregando a metodologia II Seção 3.9.1. A adição de ácido acético às soluções dos derivados amoniacal e cálcico permitia proceder à análise do equivalente teor de bixina.

Os resultados apresentados na Tabela 21 estão expressos em termos do equivalente teor de bixina. Quando se comparam os valores encontrados para a solubilidade da bixina àqueles determinados usando a metodologia I, observa-se grande diferença. Estes experimentos estiveram menos sujeitos a erros analíticos, pois não estavam envolvidos os fenômenos de hidrólise, e as amostras após saturação foram centrifugadas e posteriormente filtradas em membrana de teflon de 0,22 μm de abertura.

Tabela - 21 Solubilidade da bixina e derivados (metodologia II)

Solvente	Bixina	Derivado Amoniacal*	Derivado de Cálcio*	Norbixina **
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
Etanol	0,148	0,360	0,021	0,685
Acetona	0,616	0,709	0,007	0,992
Clorofórmio	2,191	0,830	0,105	0,931
Metanol	0,121	0,276	0,133	1,002
Acetato de etila	0,533	0,471	0,018	0,601
Éter etílico	0,328	0,575	0,003	0,812

*Com base no teor em bixina, **Coeficiente de absorvidade em clorofórmio, segundo Reith e Gielen (1971), como α -norbixina $E_{cm}^{\%} (468) = 2470$.

4.7 ESCOLHA DO SOLVENTE PARA A ESPECTROFOTOMETRIA

A imprecisão das medidas, decorrentes do emprego da técnica por hidrólise e o risco de comprometimento das avaliações foram decisivas para a adoção do clorofórmio como solvente para as análises espectrofotométricas.

4.7.1 EMPREGO DO CLOROFÓRMIO

Na Tabela 22 são apresentados os valores da pureza de bixina, obtidos através de dois ciclos de recristalização em acetona. Os resultados referem-se a análises da mesma amostra,

(6 repetições) determinadas em clorofórmio, segundo a metodologia II descrita na Seção (3.91), empregando-se os dois coeficientes de absorvidade citados por Reith e Gielen (1971).

Tabela 22 - Análise do teor de bixina recristalizada em acetona

Amostras (multiplicata)	Massa (mg)	V. balão (mL)	Diluição	Abs (471nm)	% Bixina	Abs (501nm)	% Bixina
1	7,5	50	0,1/10	0,372	76,78	0,334	77,31
2	13,6	50	0,1/10	0,703	80,01	0,633	80,81
3	26,6	50	0,05/10	0,672	78,21	0,602	78,58
4		50	0,05/10 ^a	0,701	81,59	0,628	81,97
5	18,7	50	0,05/10	0,478	79,13	0,428	79,47
6	14,5	50	0,07/10	0,531	80,98	0,474	81,07
Valor médio					79,44		79,86
(b)					79,58 ^b		79,45 ^b

(a) Amostra 4 = amostra 3 empregando clorofórmio recuperado para diluição, (b) = média, excluído a amostra 4.

4.7.2 EMPREGO DO ETANOL

O emprego de etanol em substituição ao clorofórmio apresenta algumas vantagens competitivas: não é tóxico e tem menor custo. Além disto, a bixina mostra-se mais estável quando nele dissolvida, sendo, portanto, de grande importância à determinação do coeficiente de absorvidade neste solvente. A solução de bixina apresenta neste solvente, bandas de absorção máxima na região de 458 nm e 486 nm do espectro eletromagnético visível. Dois experimentos, identificados respectivamente como A e B foram realizados para a determinação do coeficiente de absorvidade em etanol. Na seqüência serão mostrados os resultados obtidos; no primeiro foram empregados cristais de bixina preparados por recristalização e analisados em clorofórmio, no segundo a bixina empregada correspondia àquela contida nas soluções dos ciclos de extração do experimento 3, cujos teores foram determinados pela técnica da hidrólise.

Experimento A.

Os valores do coeficiente de absorvidade obtidos no primeiro ensaio, mostrados na Tabela 22, apresentaram os seguintes valores médios: 3443 ± 28 em 458 nm e 3058 ± 255 em 486nm. Estes valores são oriundos da média entre os coeficientes das curvas de calibração, obtidas em etanol absoluto e cujos valores de concentração da bixina empregada como padrão, apresentados na Tabela 21, foram calculados nos dois comprimentos de onda de absorção em clorofórmio, 471nm e 501nm empregando o método descrito na seção (3.9.1), Metodologia II.

O procedimento para determinação do coeficiente de extinção molar segue a mesma metodologia de preparação de amostra para leitura espectrofotométrica em clorofórmio. Partindo-se de um padrão de concentração conhecida, prepara-se uma solução estoque no solvente desejado e desta solução coletam-se alíquotas para elaboração de uma curva de calibração. Através do gráfico, absorbância versus a concentração, obtém-se o coeficiente de absorvidade, que corresponde ao coeficiente angular da curva.

Na Tabela 23 pode ser observado o valor do coeficiente de absorvidade obtido para a bixina em solução alcoólica.

Tabela 23 - Coeficiente de absorvidade da bixina em etanol.

1	λ de leitura para o etanol	458 nm		486 nm	
2	λ de leitura para o padrão em clorofórmio	471nm	501nm	471nm	501nm
3	% de bixina*	79,58	79,45	79,58	79,45
4	ϵ_{etanol}	3472	3415	3084	3033
5	R	0,9992	0,9992	0,9991	0,9991
6	ϵ_{etanol} (valor médio)**	3443.5 ± 28		3058 ± 25	

(*) valor obtido da Tabela 22. (valor médio da concentração do padrão).

(**) média entre os valores apresentados na linha 4.

As diferenças encontradas estariam relacionadas a erros experimentais e aos limites de precisão das micropipetas e balança. Os valores maiores de concentração mostrados na Tabela 23, obtidos com a leitura em 501nm e que foram empregados para a determinação da concentração do padrão em uma das duas curvas de calibração da solução alcoólica, não permitem afirmar que este seria a melhor região da banda do espectro para determinação do valor de absorbância. Visto não ser um padrão 100% puro, ou ainda devido a incertezas com relação aos valores dos coeficientes de absorvidade adotados (3230 para 471 nm ou 2880

para 501 nm), fica difícil prever qual valor seria aquele mais correto (adequado) e conseqüentemente qual a melhor banda para leitura, 471nm ou 501nm. Observa-se, por outro lado, que o uso de clorofórmio recuperado para diluição, aumentou o valor de absorção nas duas bandas, contudo, mais intensamente em 501nm, o que poderia evidenciar uma maior contribuição de contaminantes provenientes do pigmento, não eliminados na destilação do solvente, agora sobrepondo absorção nesta região do espectro.

Experimento B.

Das soluções provenientes do experimento 3, foram separadas amostras de cada ciclo de extração, com as quais foram conduzidas diluições para elaboração de curvas de calibração. Os valores dos coeficientes obtidos são apresentados no Anexo E. Esta avaliação teve como objetivo verificar se o valor do coeficiente de extinção se mantém constante para diferentes concentrações de bixina, independentemente se esta contém associada uma maior quantidade de contaminantes. Este aspecto é importante visto que, quando se determina a concentração de uma amostra desconhecida, o coeficiente aplicado deve atender a uma faixa ampla de concentração, fornecendo valores que correspondam à realidade. Caso contrário, se a recíproca não for verdadeira, os erros analíticos serão agravados em função da maior ou menor quantidade de contaminantes presente.

Os valores de concentração das amostras tomadas como padrão para a elaboração das curvas de calibração foram obtidos de análise pelo processo da hidrólise. Para cada amostra foi adotado o maior valor de absorbância encontrado durante a evolução da hidrólise, acompanhada no intervalo de cinco horas. Estes resultados são apresentados na Tabela 24, na qual é mostrada a variação da absorbância para as soluções de cada ciclo de extração ao longo do intervalo de observação.

Para curva de calibração foram coletadas alíquotas de 0,02 mL a 0,1mL conforme Tabela 25, na qual também podem ser observados os valores de absorbância medidos a 486nm. As alíquotas após eliminação do hexano, por arraste com nitrogênio, foram diluídas a 10 mL com etanol absoluto.

Tabela 24 - Valores de absorvância das amostras provenientes dos ciclos de extração do experimento 3

Ciclos	Valores de absorvância (evolução com o tempo)*						
1	0.338	0.356	0.354	0.348	0.369	0.362	0.342
2	0.22	0.223	0.231	0.223	0.289	0.252	0.214
3	0.232	0.217	0.222	0.231	0.292	0.229	0.215
4	0.192	0.186	0.182	0.188	0.193	0.179	0.177
5	0.159	0.172	0.16	0.155	0.158	0.15	0.149
6	0.165	0.17	0.17	0.183	0.167	0.171	0.164
7	0.163	0.166	0.16	0.163	0.157	0.153	0.158
8	0.165	0.169	0.169	0.163	0.195	0.158	0.156

*Intervalo de observação 5 h.

Tabela 25 - Valores de absorvância das soluções empregadas para determinação do coeficiente de absorvidade

Ciclos	Volume alíquotas por 10 mL				
	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
1	0.162	0.348	0.530	0.655	0.781
2	0.104	0.20	0.325	0.419	0.556
3	0.095	0.187	0.295	0.385	0.537
4	0.062	0.156	0.246	0.339	0.437
5	0.067	0.139	0.226	0.290	0.366
6	0.067	0.141	0.233	0.309	0.394
7	0.061	0.130	0.192	0.278	0.345
8	0.039	0.106	0.211	0.262	0.357

Os valores obtidos para o coeficiente de absorvidade apresentaram variações muito grandes. Os erros decorrentes da metodologia analítica, inerentes à hidrólise da bixina contribuíram em grande parte para os resultados obtidos. A redução do teor de óleo do primeiro para o último ciclo, e o conseqüente aumento da concentração de bixina nos respectivos extratos não mostrou um comportamento de crescimento ou de redução dos coeficientes obtidos, que pudesse justificar contribuição destes contaminantes em participação aditiva na absorvância. Ao contrário os valores encontrado oscilaram aleatoriamente. Erros de diluição, se presentes, não acarretariam tal comportamento, pois os procedimentos adotados para coleta de amostra e diluição foram os mesmos empregados para preparação das soluções que levaram aos resultados obtidos com clorofórmio. A grande variação nos valores encontrados está certamente relacionada à confiabilidade da metodologia analítica adotada, ou seja, o método espectrométrico baseado na hidrólise alcalina.

4.8 ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM CLOROFÓRMIO

Na Figura 33 são apresentados os espectros de absorção das soluções oriundas do experimento 4, no qual foram realizados sete ciclos de lavagem com hexano/etanol 1/1 (ciclos de 1 a 7) e dois ciclos finais (8 e 9) empregando-se hexano puro. As varreduras das soluções foram determinadas em clorofórmio depois de ter sido eliminado o solvente original das amostras. Pode ser observado nos espectros o encobrimento do pico da bixina naquelas amostras que apresentam um maior teor de óleo (amostra 1), tanto mais encoberto quanto menor a ordem do ciclo.

Como as amostras apresentavam concentrações distintas de bixina, a seqüência dos gráficos não corresponde à seqüência numérica (legenda), que corresponde à ordem do ciclo. Nota-se, contudo, a melhor definição (forma) do pico da bixina como também a relação de sua intensidade com a intensidade dos outros picos, na região de menor comprimento de onda, na medida em que a amostra se torna enriquecida, ciclos de maior ordem.

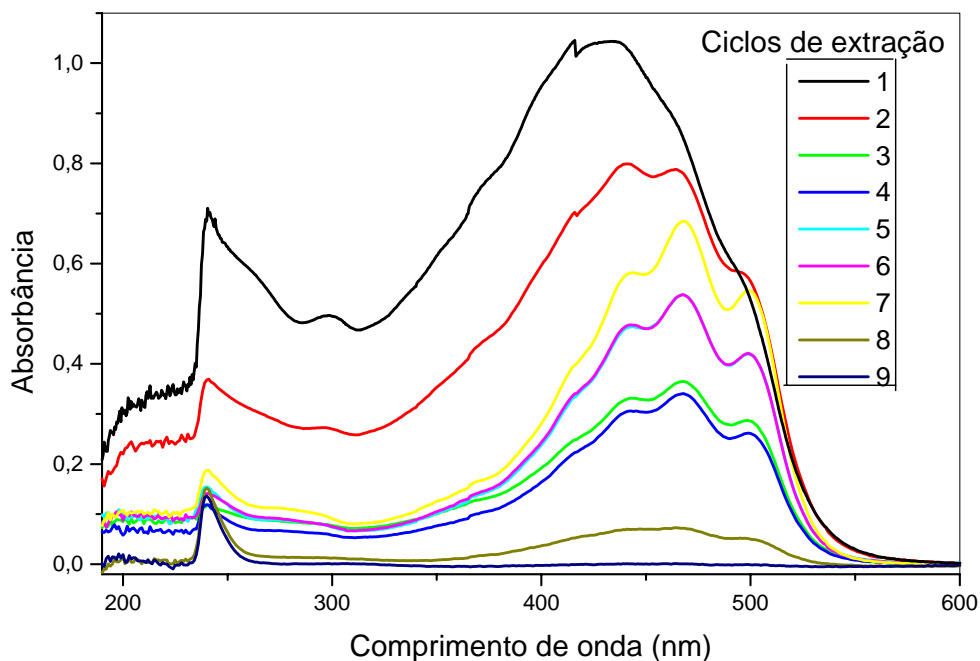


Figura 33 - Espectros de absorção de bixina em clorofórmio

4.9 ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM SOLUÇÃO ALCALINA

A análise de espectros de varredura obtidos de extratos provenientes de diferentes ciclos de extração, quando provenientes de hidrólise, possibilitou fazer as seguintes observações:

- O primeiro extrato, rico em óleo apresenta-se com intensa absorção na região do visível de reduzido comprimento de onda, entre 340 nm a 400 nm encobrindo o espectro até a região do UV longo;
- Nos ciclos de extração monitorados, observou-se que na medida em que se evoluíam as lavagens, a absorção na região anterior àquela da bixina, perdia intensidade paralela ao destaque do pico da bixina, demonstrando que estes extratos estavam sendo enriquecidos em bixina em detrimento dos contaminantes antes presentes.

A Figura 34 apresenta uma seqüência de espectros obtidos de soluções de lavagem de semente com hexano/etanol.

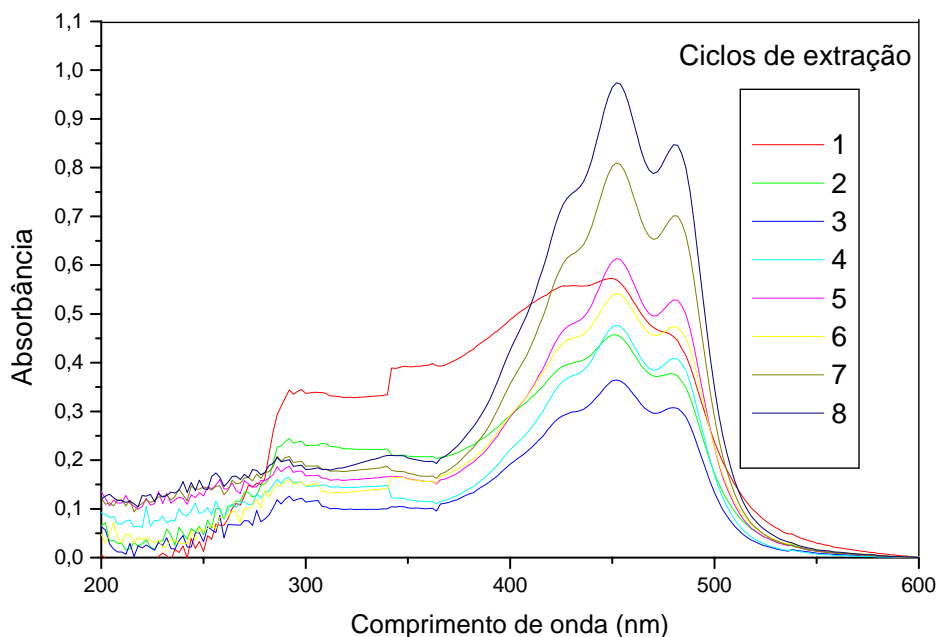


Figura 34 - Espectro de absorção da bixina em solução de hidróxido de sódio.

Instabilidade de leitura.

As soluções de amostras contendo bixina apresentam diferentes comportamentos no que se refere à instabilidade de leitura espectrofotométrica. As amostras submetidas à hidrólise em solução alcalina, se agitadas antes da determinação espectrofotométrica apresentam leitura oscilante. Este comportamento não se observa para a solução em clorofórmio. As soluções alcalinas, ainda que totalmente cristalinas, quando observadas no balão, logo após enérgica agitação, mostram variações na cor da solução, aparentando a presença de um componente de coloração amarela mais intensa difundindo-se através da solução. Isto porém desaparece, minutos após a agitação, repetindo contudo a qualquer momento que se proceda a nova agitação. Suspeitou-se da presença de oxigênio incorporado durante o processo de agitação, favorecendo a formação de um composto intermediário que imediatamente era incorporado à solução. Neste sentido, uma série de ensaios foi realizada com o propósito de investigar a participação do oxigênio neste processo.

Influência do oxigênio.

Esta série de ensaio teve como objetivo avaliar amostras de mesma origem, submetidas à solução de hidróxido de sódio 0,5 N, porém tomando-se o cuidado de avaliar a interferência do oxigênio durante o processo de solubilização. É importante destacar que nestes ensaios não foram feitas determinações do percentual de bixina, pois nesta prévia, apenas a visualização do espectro poderia acusar presença de outros compostos, o que poderia caracterizar a esperada interferência. Empregou-se como amostra o pigmento removido da semente após cinco lavagens com etanol/hexano 1/1 e 6 ciclos com hexano. Foram processadas quatro amostras como segue:

A - Pigmento extraído com solução de hidróxido de sódio sem aeração;

B-Pigmento extraído com solução de hidróxido de sódio e efetuando-se aeração da solução final por 10 min;

C-Pigmento extraído com solução de hidróxido de sódio previamente desaerada*;

D - Pigmento extraído com solução Etanol/água / amônia 40/57/3.

Tabela 26 - Bandas de absorção e valores de absorbância de amostras acompanhadas sob efeito de aeração.

λ (nm)	481.0	453	345	273.5	270.5	238	217.5	218.5
Amostras								
A	0.476	0.551		0.112			0.282	
B	1.233	1.411	0.282		0.316	0.371	0.517	
C	0.310	.077		0.077			0.241	
D	0.958	1.089			0.154			0.429
Branco						0.184		0.184

a) * solução de hidróxido de sódio submetida ao aquecimento e mantida sob vácuo por 30 min.

b) Todas as diluições foram feitas com solução de hidróxido de sódio desaerada

c) os experimentos foram realizados sem proteção dos efeitos de luz.

Observa-se na Tabela 26 que:

Todas as soluções, com exceção da amoniacal apresentam absorção em 217,5 nm, porém com maior intensidade de absorção que o branco, sugerindo alguma interação com o solvente;

A intensidade de absorção se acentua, tanto maior quanto maior a concentração de bixina (picos de absorção em 481,0 nm e 453 nm);

Observa-se também que quanto mais aerada maior o aparecimento de outras bandas de absorção, sugerindo a formação de outros compostos;

A amostra com solução de hidróxido de sódio previamente desaerada mostra uma menor intensidade no pico em 273,5 nm, também presente na amostra 1;

O experimento 2 apresenta picos inexistentes nos outros ensaios com solução de hidróxido de sódio, provavelmente decorrentes de processos oxidativos.

O comportamento de instabilidade de leitura também foi observado, da mesma forma que o surgimento de regiões de difusão de cor na solução, ainda que com menor intensidade. A presença na amostra, de alguns compostos lipossolúveis que não foram eliminados adequadamente durante o processo de lavagem com solvente, ainda que em quantidade reduzida, podem ser responsáveis pelo fenômeno observado, se estes apresentarem reduzida solubilidade na solução alcalina. Se ao contrário, os mesmos compostos forem totalmente solúveis no clorofórmio isto explicaria a estabilidade de leitura neste solvente.

4.10 ACOMPANHAMENTO DA ESTABILIDADE DA BIXINA EM ETANOL

Na Tabela 27 são apresentados os valores de leitura espectrofotométricas de soluções provenientes dos ciclos de extração do experimento 3, monitoradas ao longo de sete meses de estocagem.

Tabela 27 - Acompanhamento da absorbância das soluções com tempo de estocagem.

Ciclos	Tempo (dias)							
	1	9	15	34	50	80	130	200
1	2,713	2,731	2,715	2,712	2,712	2,734	2,707	2,645
2	2,622	2,635	2,645	2,620	2,622	2,660	2,659	2,582
4	2,582	2,614	2,604	2,600	2,622	2,616	2,618	2,563
5	2,546	2,575	2,585	2,488	2,582	2,590	2,596	2,527
6	2,546	2,575	2,585	2,545	2,522	2,531	2,536	2,544
7	*	2,575	2,566	2,563	2,522	2,535	2,502	2,478
8	*	2,594	2,566	2,563	2,552	2,556	2,546	2,563

Obs.: Ausência do terceiro ciclo devido à perda da solução após a extração.

*não disponível no primeiro dia, leitura efetuada no segundo dia de extração (conseqüentemente os tempos referentes a estas amostras estão defasados de 1 dia).

Os valores de absorbância apresentados referem-se à leitura das amostras em repouso após agitação por aproximadamente 5 segundos, visto que sua leitura efetuada após a transferência para cubeta apresentava valores oscilantes e com redução de 20 a 30 milésimos de unidades de absorbância.

O acompanhamento das soluções de bixina em etanol, empregando as amostras provenientes dos ciclos de extração teve como propósito verificar se os outros componentes presentes nas sementes trariam alguma contribuição, no sentido de favorecer a estabilização da bixina durante o período de estocagem. As soluções provenientes dos ciclos de extração apresentam crescentes concentrações de bixina e decrescente teores de outros componentes, ver Tabela 19, experimento 3. Enquanto o extrato sólido proveniente do primeiro ciclo apresenta apenas 5,65 % de bixina, aquele obtido do oitavo ciclo apresenta 52,43 %. Contudo, isto não resultou em mudanças nas absorbâncias. Apesar de todos os valores terem apresentado queda, as leituras determinadas após 200 dias de avaliação corresponderam a números que oscilaram de 96,23 % a 99,92 % daqueles iniciais. Contudo, sem nenhuma

correspondência com o maior ou menor teor de bixina ou dos outros compostos presentes no extrato. Por outro lado, a ausência de uma solução preparada com bixina pura, isenta dos outros componentes, impossibilita fazer qualquer afirmação que relacione alguma possível contribuição na conservação da bixina. O percentual dos outros componentes, presentes na solução do oitavo ciclo é ainda elevado, desta forma pode ter contribuído para os valores encontrados.

Os elevados valores de absorbância encontrados e as oscilações durante a leitura impedem um monitoramento mais preciso. A avaliação da estabilidade pode ser mais evidente em condições de maior diluição. Desta forma, seria conveniente diluir as amostras anteriormente à estocagem. Por outro lado, a diluição da alíquota na ocasião da medida não permitiria uma avaliação acurada, pois teríamos um provável efeito positivo da concentração na estabilização da amostra. Ainda assim, os valores observados sugerem que, a estocagem da bixina em solução alcoólica é mais conveniente do que em clorofórmio. Os padrões mantidos durante uma semana em clorofórmio tinham que ser descartados visto que perdiam rapidamente seu teor original. Entretanto, a baixa solubilidade da bixina em etanol comparada ao clorofórmio, traz dificuldades a sua aplicação.

4.11 MONITORAMENTO DE PADRÕES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Observou-se que tanto as amostras de bixina, quanto de bixato de amônio, quando devidamente secas absorviam umidade imediatamente após a abertura do frasco mantido sob vácuo, tornando imprecisa a pesagem. Isto em consequência causava sérios problemas de precisão na determinação da massa empregada para determinação do teor destes componentes. O procedimento de quebra de vácuo com nitrogênio ou mesmo com ar previamente seco, permitiu que as oscilações apresentadas durante a pesagem fossem eliminadas.

A Tabela 28 apresenta os valores das concentrações durante o período de estocagem.

Tabela –28 Concentração dos padrões em função do tempo de estocagem

Amostra	Concentração	Período de acompanhamento (dias)							% degradação.
		0	8	15	30	60	90		
A1	%	92,79	93,36	92,07	84,46	77,13	73,83	20,44	
A2	%	92,79	93,47	92,82	88,41	85,31	80,08	13,7	
A3	%	92,79	86,01	91,27	94,96	89,40	80,09	13,69	
A4	mg/100mL	10,11	10,53	10,98	10,27	10,02	11,23	0,00	
A5	mg/100mL	9,98	9,95	9,56	8,78	8,42	9,84	1,41	
A6	mg/100mL	7,41	8,04	7,44	6,9	6,3	7,22	2,57	
A7	mg/100mL	52,36	52,55	51,79	50,7	48,77	51,53	1,59	
B1	%	90,27	85,5	74,69	85,94	80,03	71,24	21,09	
B2	%	90,27	91,02	94,06	86,45	80,25	77,85	13,76	
B3	%	90,27	100,74	95,89	81,7	88,3	82,17	8,58	
B4	mg/100mL	10,63	7,02	7,23	7,04	7,12	7,01	34,06	
B5	mg/100mL	8,64	7,26	8,18	8,02	7,18	5,76	33,34	
B6	mg/100mL	8,64	7,44	6,66	6,5	6,1	6,06	29,87	
B7	mg/100mL	56,38	58,19	57,06	56,5	56,9	57,89	0,00	

Legenda: **A**, bixina; **B**, derivado amoniacal.

Índices; **1**, gás liquefeito de petróleo (GLP); **2**, vácuo; **3**, atmosfera de nitrogênio; **4**, etanol absoluto; **5**, Etanol com 2% de BHA; **6**, etanol com 2% de vitamina E (α -tocoferol); **7**, solução 50/50 Acetonitrila/dimetilformamida.

Todas as amostras foram estocadas mantidas em freezer a -18°C e isoladas da luz.

Dos resultados mostrados na Tabela 28 pode-se verificar que as amostras de bixina apresentaram maior estabilidade em solução. O etanol absoluto puro mostrou-se melhor solvente para conservação da bixina representado pela amostra A4. Durante o período de acompanhamento não se observou redução na concentração. A adição de vitamina E ou BHA não trouxe a contribuição esperada, ainda que a degradação tenha sido reduzida.

No caso dos derivados amoniacaais a maior estabilidade foi conseguida para a mistura acetonitrila /dimetilformamida. Em etanol foram observadas degradações da ordem de 30 %.

Ainda que se tenha tomado cuidado especial para minimizar erros de pesagem observou-se que para as amostras sólidas os resultados obtidos oscilaram ao longo do monitoramento, como pode ser visto na Tabela 29. Por outro lado, para estas amostras, não foi possível garantir que todas as frações, colocadas nos frascos tivessem a mesma concentração. Isto porque estas frações foram transferidas e lacradas em diferentes intervalos de tempos.

Não dá para desprezar os efeitos de incorporação de umidade, enquanto expostas, aguardando o processamento de embalagem. Este fato é marcante, visto que duas soluções preparadas com pequeno intervalo de tempo apresentaram variações na concentração, acarretadas por erro de massa. Estas variações chegaram em determinados casos em até 5 %. Os erros de pipeta também devem ser considerados apesar da sua contribuição ter um menor peso.

No caso de erros causados pela pipeta, ainda que se proceda à lavagem da parte interna após a drenagem, o emprego de solventes orgânicos agrava mais os problemas inerentes à medida de volume, tanto maior quanto maior a pressão de vapor apresentado por este.

A título de informação soluções em triplicata elaboradas com uma mesma solução estoque, em que o solvente era clorofórmio, foram preparadas com alíquotas de 100 μ L e diluídas a 10 mL. Estas soluções apresentaram absorvância de: 0,245, 0,247 e 0,235. Como a concentração tem uma relação direta com a absorvância, estes valores acarretariam erros na ordem de até 3,0%.

As amostras mantidas em GLP, apresentaram após um mês de estocagem aspecto aglomerado, diferente de sua característica anterior, material solto e de fácil fluidez. Não foi possível concluir se houve degradação, contudo, a tampa de borracha, apresentou nítidos sinais de desagregação acarretada pelo GLP, fato verificado em um ensaio em branco. Desta forma, o teste com este solvente ficou inviabilizado, devido à contaminação de material proveniente da tampa de borracha.

Comparando à conservação de amostras no estado sólido, sob vácuo ou em atmosfera de nitrogênio aos melhores resultados apresentados pelas amostras estocadas em solução, sugere ser satisfatório o armazenamento de cristais imersos em solução. Sendo a solubilidade da bixina muito baixa, esta alternativa permite estocar quantidades maiores e com elevada pureza mantidas em pequeno volume de solvente. Neste sentido, duas amostras, uma estocada em etanol e outra em acetona foram avaliadas pelo período de dois meses. Durante este tempo, não foi observado redução nas concentrações destes padrões. Esta forma é de interesse, visto a facilidade de se disponibilizar maior quantidade de padrão no momento das análises. Para isso, basta retirar quantidade de padrão necessário, e eliminar o solvente sob vácuo. No caso particular da acetona isto se torna ainda mais fácil à custa da sua elevada pressão de vapor deste solvente.

4.12 MONITORAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO CURSO DA HIDRÓLISE

A análise da bixina via hidrólise, segundo o método (Kato et al., 1992) apresenta uma série de inconvenientes. A dependência com relação a parâmetros cinéticos faz com que ocorra um grande desvio nos resultados, dificultando a reprodutibilidade.

Este monitoramento teve como objetivo acompanhar a evolução da hidrólise alcalina da bixina em função do tempo, temperatura e concentração do álcali, com o objetivo de verificar a estabilidade do composto frente às condições que podem estar presentes não só nas metodologias analíticas como também em processos de extração.

No Anexo F estão reunidos os valores de absorvância das soluções de bixina obtidos durante o período de monitoramento. A evolução da hidrólise pode ser visualizada melhor nas Figuras 35, 36 e 37.

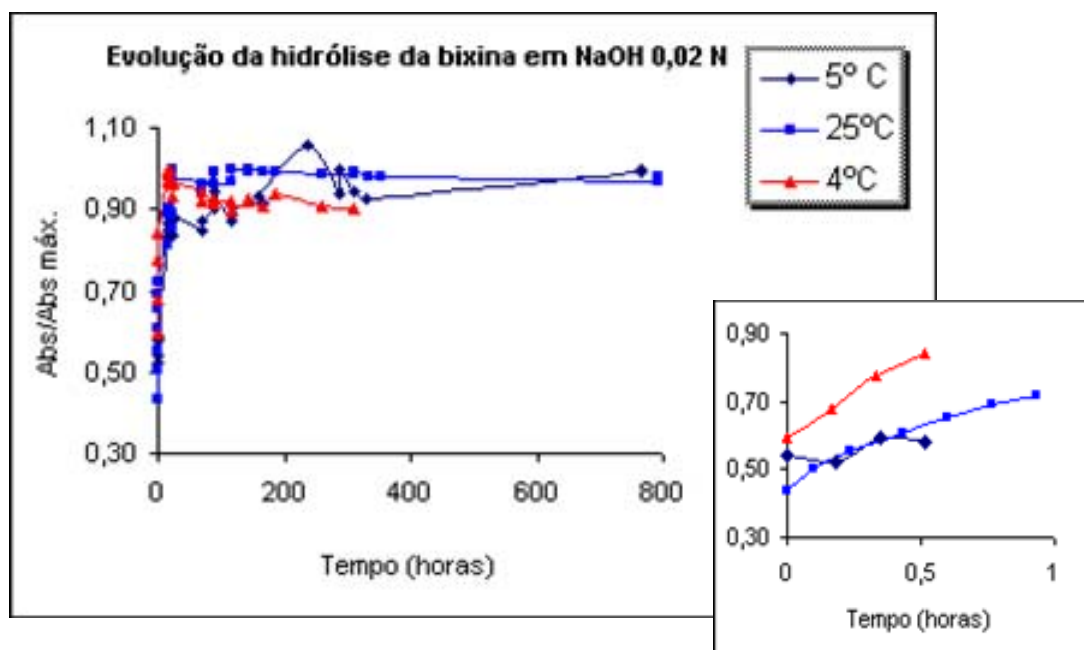


Figura 35 – Evolução da hidrólise da bixina em solução de NaOH 0,02N.

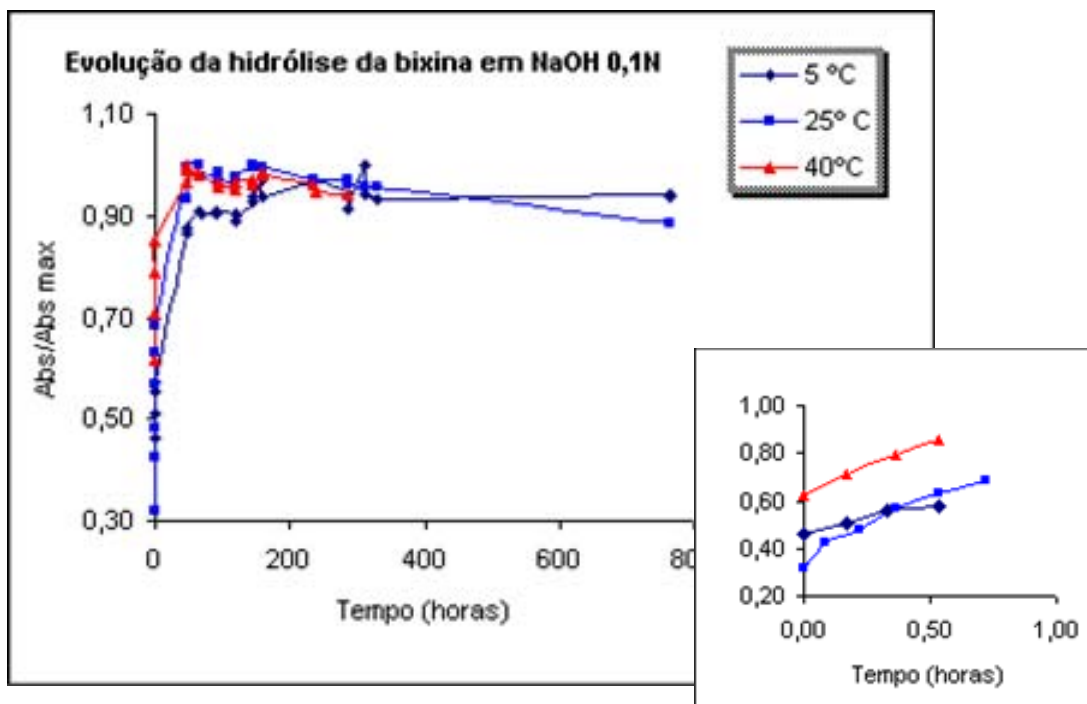


Figura 36 - Evolução da hidrólise da bixina em solução de NaOH 0,1N.

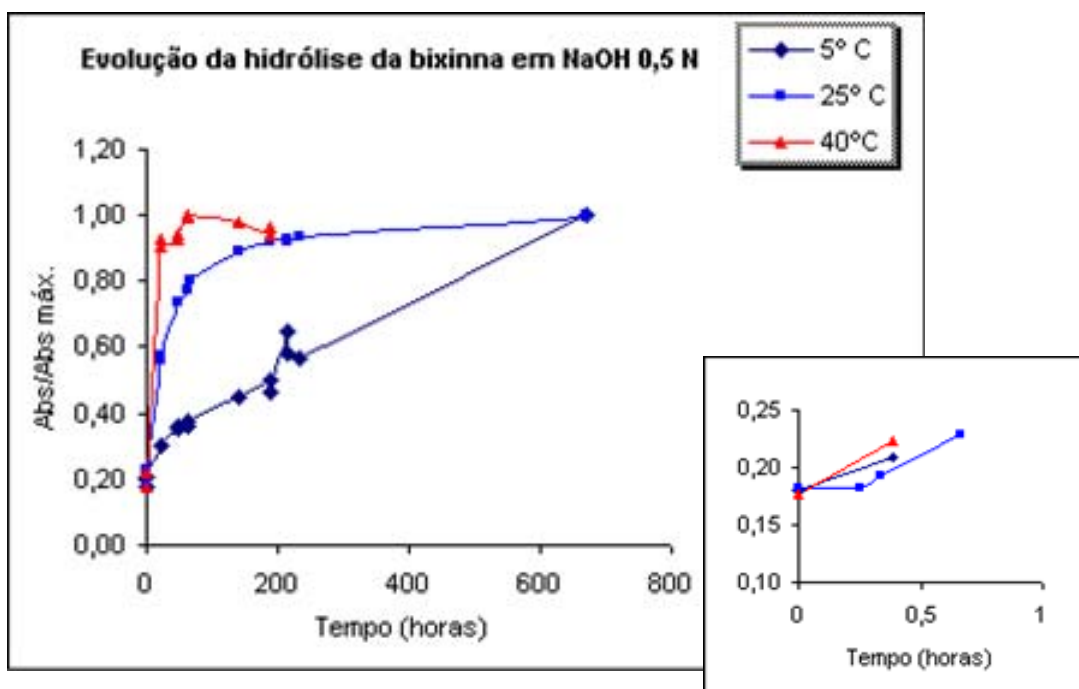


Figura 37 - Evolução da hidrólise da bixina em solução de NaOH 0,5N.

Os resultados obtidos, mostram que a utilização da metodologia que explora o fenômeno da hidrólise não permite obter valores precisos para a determinação da concentração da amostra.

As soluções preparadas com padrão de bixina continham 2,19µg/mL de bixina. Com esta concentração a solução deveria apresentar um valor de absorvância de 0,630, correspondente às diluições a que foi submetido o padrão, conforme descrito abaixo.

54,7mg de bixina, proveniente de uma massa de 59,2mg com 92,53 % de pureza, diluída, inicialmente a 50 mL e a seguir 2/50 desta solução diluída a 1000mL. Este valor aplicado ao coeficiente de extinção 2870 (para a solução de NaOH), resultaria em uma absorvância de 0,630.

Ou, ainda, com base na equação (48) para cálculo da concentração, onde podemos assumir como 54,7 mg sendo bixina 100% pura, teremos:

$$100\% = (\text{Abs.} \times 50 \times 1000 \times 100) / (0,0547 \times 287 \times 2 \times 1000) =$$

Resolvendo-se a equação obtém-se o valor de absorvância (Abs) = 0,630.

Das Tabelas apresentadas no Anexo F foram retirados alguns valores de absorvância, mostrados aqui na Tabela 30 na qual podemos observar que:

A solução mantida na geladeira a 5 °C apresentou absorvância máxima de 0,621 após 14124 min (9,8 dias), mesmo assim este valor corresponderia a 0,621/0,630, ou seja 98,57 % da bixina presente. A mesma avaliação pode ser feita para as outras soluções. Observa-se ainda que aquelas soluções submetidas à maior temperatura não atingiram a absorvância máxima e, inclusive mostraram maior degradação. Da mesma forma a degradação foi tanto maior quanto maior a concentração da solução de hidróxido de sódio.

Tabela 29 – Valores máximos de absorvância apresentados pelas amostras sob monitoramento de hidrólise

Temperatura	Conc. NaOH	Abs.		Concentração	Tempo
°C	Eq.g/L	Máxima		Máxima %	horas
5	0.02	0.621	↓	98.57	588
25	0.02	0.561	↓	89.04	22.81
40	0.02	0.528	↓	83.81	15.58
5	0.1	0.614	↓	97.46	309.75
25	0.1	0.570	↓	90.47	143.25
40	0.1	0.537	↓	85.23	46.36
5	0.5	0.406	→	64.44	670.72
25	0.5	0.401	↓	63.65	671.08
40	0.5	0.458	→	72.69	64.33

A indicações (↓ e →) que aparecem na terceira coluna têm como propósito indicar a evolução da absorvância (↓), significando que o valor de absorvância já atingiu sua maior intensidade e (→), que os valores de absorvância apresentam-se em curso de queda, mostrando que a absorvância evoluirá para valores inferiores.

Pode-se daí concluir que o aumento da temperatura e/ou concentração da base, ainda que tenham efeito catalítico sobre a cinética, também catalisam outras reações secundárias, de forma que a reduzida estabilidade da bixina como também do seu produto de hidrólise, a norbixina, impõe limitações ao controle destes parâmetros. Portanto, a informação da concentração de bixina obtida pelo emprego desta técnica é imprecisa pois, reações paralelas de isomerização, oxidação e decomposição ocorrem no curso da análise, observado aqui pela mudança constante da leitura espectrofotométrica. Sendo assim, os percentuais de bixina encontrados nas análises efetuadas pelo uso desta técnica levam a valores de concentração inferiores a real concentração presente.

4.13 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

A purificação e separação da bixina por processo adsorptivo, objetivos principais deste trabalho foram conduzidas em coluna preparativa flash. Amostras parcialmente concentradas contendo uma massa conhecida de bixina foram aplicadas à coluna. Feita a varredura das frações, aquelas identificadas como bixina eram analisadas, computando-se a massa presente. No anexo J é apresentado uma planilha dos dados completos coletados de um dos experimentos.

Nas separações realizadas na coluna preparativa flash, mesmo empregando padrão recristalizado, observou-se a presença de dois picos de bixina. Nos experimentos iniciais, em que a polaridade era mais elevada, uma banda bem resolvida, de maior intensidade, identificada como bixina, apresentava reduzido tempo de retenção. Distante deste pico e com menor concentração também se detectava outro pico de bixina.

Em experimentos subseqüentes, onde a polaridade foi progressivamente reduzida, notou-se que, além da elevação do tempo de retenção do primeiro pico, também ocorria a inversão da posição destes. Esta inversão ocorre na região entre a relação 50/50 e 40/60 acetato de etila /hexano. Ainda, na medida em que se afastava dos extremos de polaridade ocorria um alargamento da banda, particularmente naquela de maior tempo de retenção, acarretando um conseqüente maior volume de colunas, também caracterizado por frações que apresentavam lenta e gradual variação na concentração.

Não dispo de um forma imediata de caracterização dos isômeros, submeteu-se uma amostra recristalizada de bixina a aquecimento com água, em tubo fechado por um período de 24 horas, que segundo Surmatis (1976) isomeriza a forma cis à trans. Também no sentido de favorecer a isomerização, uma segunda amostra foi exposta à luz ambiente por um período de 20 h. Com estas amostras foram realizadas corridas na coluna flash. Como resultado, para a mesma relação polar anteriormente empregada, o pico de maior intensidade mantinha-se na mesma posição relativa em relação ao segundo, Foi também observado redução na intensidade do segundo pico, porém sem total eliminação. Este experimento permitiu concluir que dispúnhamos de amostra contendo baixo teor de bixina na forma cis.

Para verificar a pureza das frações de bixina obtida, foram realizados testes com cromatografia em camada delgada (CCD) e determinados os valores de Rf. Apesar de terem apresentado tempos de retenção distintos na coluna, na CCD não se observou diferenças. Os resultados confirmaram a pureza das frações correspondentes ao primeiro pico proveniente daquelas corridas com maior relação de acetato de etila (maior polaridade), visto que apenas uma única mancha era deslocada. Entretanto, a fração correspondente ao segundo pico revelava um composto na mesma posição do primeiro pico e apresentando ainda sinais de composto retido na linha de base. Na Figura 38 são mostradas placas cromatográficas nas quais se empregou fase móvel acetato de etila/hexano com polaridade decrescente. Usou-se neste conjunto de placas as amostras provenientes dos dois picos eluídos em uma corrida contendo 80 % de acetato e 20 % de hexano.

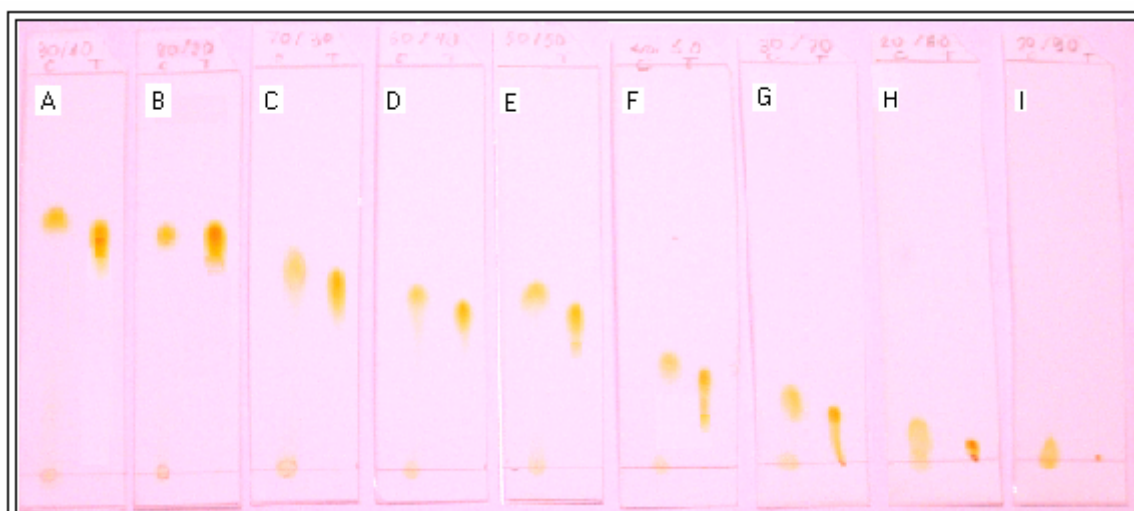


Figura 38 – Retenção da bixina em placas de CCD em função da polaridade da fase móvel . Fase móvel acetato de etila/hexano; A 90/10; B 80/20; C 70/30H 20/80 e I 10/90. Em cada placa, amostra a esquerda - cis-bixina, amostra a direita - isômero trans.

Com o objetivo de avaliar o desempenho do processo de separação, vários outros dados foram obtidos da coluna flash, tais como: velocidades da fase móvel e dos picos cromatográficos, densidade e volume do leito e correspondente volume de coluna para eluição dos picos. Também foi verificada a eficiência no empacotamento pelo monitoramento através da massa específica encontrada para a sílica. Os dados mais relevantes estão reunidos no anexo G. Ainda, foram realizados para efeito comparativo, experimentos com uma coluna de menor seção. No anexo H são apresentados dois destes experimentos, realizados com as duas colunas, empregando-se fase móvel de idêntica composição.

Na Tabela 30 são apresentados parâmetros comparativos entre colunas de diferentes diâmetros.

Tabela 30 - Comparação do Volume de coluna entre colunas de diferentes seções

seção	ρ sílica	VC		Vazão original		Vel.original		Vel. corrigida.*	
		Cis P2	TransP1	P1	P2	P1	P2	P1	P2
cm ²	g/cm ³			mL/min	mL/min	cm/min	cm/min	cm/min	cm/min
0,292	3,55	45,66	2,005	1,364	1,364	2,739	0,120	4.016	0.176
0,931	2,18	42,31	1,88	2,416	1,855	1,802	0,062	1.49	0,067

P1- pico 1; P2 pico 2; VC volume de coluna; ρ - massa específica. Fase móvel - acetato de etila/hexano 80/20.,* velocidade corrigida para deslocamento do eluente obtido na vazão de 2,0 mL/min. Volume de fase líquida no empacotamento (VC (poros)); coluna de diâmetro reduzido, 4,44 mL, coluna de maior diâmetro, 14,89 mL.

Dos resultados apresentados na Tabela 30 é possível observar diferenças na compactação das colunas. Deficiência no empacotamento da coluna de menor seção pode ser notada pelo valor obtido para a massa específica da sílica, cujo valor real é de 2,2 g/cm³. Isto significa existência de poros não preenchidos, resultado do inadequado empacotamento, o que interfere de forma significativa na separação, favorecendo efeitos de parede, como também fluxos preferenciais em regiões de maior porosidade. Conseqüência direta nas falhas de empacotamento refletem na maior deformação dos picos além de alargamento da banda. Estes problemas acarretam dificuldades na reprodução de experimentos. Também pode ser observado que a melhor maneira de comparação se faz com o emprego de volumes de coluna, que independe da vazão.

A dificuldade de reproduzir corridas com a mesma vazão traz dificuldades à comparação de duas corridas cromatográficas. Como o deslocamento dos picos está relacionado à velocidade de transporte da fase móvel, e esta é dependente da vazão, a aplicação de um fator de correção, quociente da vazão obtida para a fase móvel por um valor fixo (2,0 mL/min), possibilita comparar as velocidades encontradas àquelas que seriam esperadas se a fase móvel se deslocasse na velocidade tomada como referência.

Uma vez identificada a existência das duas formas isoméricas na composição da amostra e julgando que o padrão que se dispunha pudesse apresentar baixa concentração da forma cis, a mais instável, suspeitou-se da qualidade deste, que mesmo estocado em freezer, havia transcorrido duas semanas da sua preparação. Preparou-se então novo padrão empregando o processo da extração alcoólica amoniaca. Três corridas flash, 80/20, 40/60 e novamente 80/20 foram realizadas em intervalos de um dia. Estas corridas tinham como

propósito verificar se ocorria a isomerização entre o primeiro e o último ensaio. Os cromatogramas confirmaram a inversão na posição dos picos, porém a maior concentração continuava ocorrendo para o mesmo pico. Diante destes resultados suspeitou-se da qualidade das sementes, usadas para preparação do padrão, estocadas há mais de um ano. Contudo, sabendo-se da baixa estabilidade da forma cis em relação à trans, novo padrão foi elaborado, desta vez desenvolvendo todo processo a temperatura ambiente. A amostra, sem passar pelo processo de purificação e recristalização, apenas lavada com água depois de um ciclo de precipitação e apresentando teor de 26.21 % de bixina foi utilizada como matriz para preparação de solução. Empregando-se como fase móvel acetato/hexano 30/70, condição em que a suposta forma cis apresenta menor tempo de retenção, procedeu-se uma corrida cromatográfica, com adição à coluna de 0,060 mg de bixina, (169 µL de uma solução recém preparada contendo 0,359 mg/mL de bixina) proveniente da nova matriz.

Agrupadas as frações de cada um dos picos, resultaram respectivamente em 0.039 mg (primeiro pico) e 0,019 mg (segundo pico) de bixina, portanto 65% do suposto isômero cis. Visto que as separações anteriores apresentavam teores reduzidos do referido isômero concluiu-se que as condições de processo, ainda que empregando aquecimento brando tanto na extração quanto na cristalização, poderiam estar contribuindo para a isomerização da amostra, porém, observa-se que a sua eventual exposição à luz durante o processo é muito mais crítica.

As frações integradas obtidas das amostras, submetida a aquecimento e aquela exposta à luz apresentaram respectivamente, 15,9 % e 2,8 % de cis-bixina. Isto poderia também explicar a dificuldade de se obter valores do Rf do isômero cis. Durante o processo de eluição na coluna, esta, foi mantida freqüentemente coberta com uma folha de alumínio. Qualquer pequeno período de exposição afetaria somente aquela bixina próxima à parede da coluna. Em contrapartida, uma vez nos tubos do coletor, agravado ainda mais pela pequena concentração, ainda que tomados os cuidados de evitar incidência direta de luz, sua exposição é inevitável. Mantida nos tubos da bandeja ao longo da coleta, ou ainda durante a fase de preparação da placa CCD, o período de ação da luz poderia ser suficiente para promover total isomerização. Outro aspecto a ser considerado, trata da posição relativa deste isômero na linha de base da placa.

O espectro de ^{13}C RMN(500 MHz, DMSO) para o trans-derivado (Anexo D), isolado na coluna flash apresentou sinais em 167,9 e 166,9 ppm referentes aos dois carbonos de carbonila. Em 71,23 ppm aparece sinal referente a carbono metílico de grupamento éster. Na região entre 120 e 145 ppm observa-se uma multiplicidade de sinais correspondentes aos

carbonos sp^2 da cadeia vinílica. Na região entre 10 e 30 ppm observa-se sinais dos carbonos das metilas ligadas ao carbono vinílicos.

O espectro de 1H RMN(400 MHz, DMSO) para o cis-derivado (anexo C) apresentou em 1,89 e 1,94 ppm dois singletos correspondente aos prótons das metilas ligadas aos carbonos vinílicos. Em 3,67 ppm um singleto de prótons da metila do grupamento éster (OCH_3). Entre 5,78 e 5,92 um dublete de integração quatro de prótons da cadeia poliênica e ainda um duplete na região de 7,22 e 7,26 ppm de prótons vizinhos da cadeia poliênica como também um multiplete na região entre 6,42 a 6,85 ppm.

Ainda que as análises de RMN apontem para a presença de bixina, não foi possível estabelecer a identidade dos dois isômeros. Muitos sinais estavam presentes particularmente no espectro de 1H RMN, correspondente a amostra supostamente do isômero cis. Também foram encontrados sinais de hidrogênio α e β aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster entre 7,83 e 7,87 ppm e singleto característico de um radical metila ligado ao anel aromático a 2,48 ppm. A presença de aromático pode indicar a ocorrência de produto de degradação, que de acordo com Scotter, (2001) além da formação do composto C_{17} , reportado pelo autor também ocorre a formação de tolueno.

Como o objetivo do trabalho era obter bixina pura e não necessariamente separar os dois isômeros, a utilização de solvente grau PA atendeu ao propósito. Contudo, a análise de ressonância magnética nuclear requer o emprego de solventes de elevada pureza. Desta forma, seria conveniente, em trabalho futuro, reproduzir os experimentos, em HPLC, empregando a mesma fase estacionária. Frações obtidas, em solvente grau HPLC poderiam então ser encaminhadas para a RMN.

Como o recíproco do RF obtido em CCD possibilita estimar o número correspondente ao volume de colunas aproximado em uma coluna preparativa, um volume de colunas na ordem de 30 corresponderia a um Rf em torno de 0,033mm em uma placa se 60 mm. Este valor relacionado à mancha na placa cromatográfica estaria situado a aproximadamente 2 mm da linha de base. Sendo assim, para compostos com elevada retenção fica difícil mensurar com precisão o correspondente Rf.

Nos experimentos realizados observou-se também variações para os valores de volumes de coluna entre cromatogramas de mesma relação de solventes. Estas variações eram particularmente maiores para aqueles picos com elevada retenção. Desta forma, ainda que a separação entre as bandas tenha ocorrido, a correlação entre os dados relacionados àqueles picos fica prejudicada.

Estes desvios são consequência da dificuldade de reproduzir colunas com o mesmo empacotamento. Além da ampliação da banda, as imperfeições do leito podem levar a falsa interpretação de separação para aquelas picos com maior retenção. Isto se revela pela forma deformada no pico cromatográfico, apresentado no anexo I, correspondente a um pico de elevada retenção na coluna. O duplo ombro, observado no cromatograma pode sugerir ineficiência de separação e sobreposição de dois componentes. Contudo, as frações correspondentes à banda cromatográfica referente ao pico citado, após analisada testemunhou bixina como único componente. O exemplo mostrado na Figura 39 refere-se à coluna que gerou o cromatograma apresentado no Anexo I. Isto comprova o desenvolvimento dinâmico dos fenômenos de adsorção/desorção ao longo da coluna, somado aos efeitos das imperfeições no empacotamento. Variações na densidade e tamanho das partículas acarretam variações no tamanho dos poros conduzindo a fluxos preferenciais, em determinadas regiões ao longo da coluna, levando a diferenças no coeficiente de difusão convectivo com consequente oscilação na velocidade de arraste do adsorbato, em equilíbrio com a fase móvel, em pontos diferentes da seção transversal da coluna. Estas variações de fluxo, ocorrendo ao longo da coluna e em diferentes pontos das seções é responsável pela forma deformada apresentada pelo pico. As amostras coletadas ao longo da banda correspondem à área transversal e possuem densidade variável do composto, distribuídas em diferentes regiões na superfície. O perfil da banda, a semelhança de uma superfície em forma de sela é a consequência dos fenômenos acima destacados.

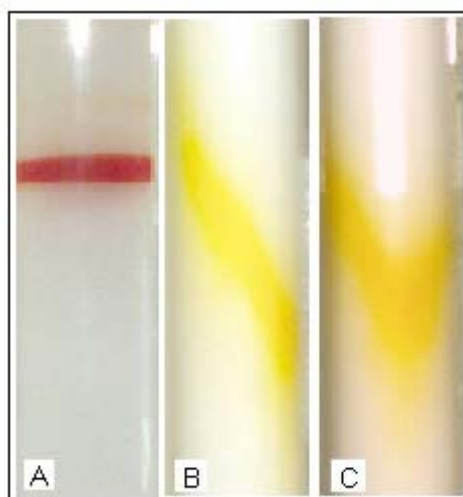


Figura 39 - Perfil de deslocamento de um pico de elevada retenção

A: amostra integral, antes do início da corrida. B e C: segundo pico (composto de elevada retenção), no curso da eluição, fotografado no mesmo instante, vista sob dois ângulos, deslocadas em 90°.

4.13.1 VELOCIDADE DOS PICOS CIS E TRANS COMO FUNÇÃO DA POLARIDADE

O perfeito ajuste da polaridade é de fundamental importância e define condições ótimas de separação. O quociente entre a velocidade de deslocamento da banda de soluto e a velocidade da fase móvel, definido como fator de retardo R está relacionado ao fator de capacidade k' através da equação (12), página 68..

$$R = 1/(1+k')$$

Ainda, a equação (13) página 68, relaciona as velocidades, da banda e da fase móvel ao fator de capacidade:

$$u_m = u_x (1+k')$$

onde u_m representa a velocidade da fase móvel e u_x a velocidade do soluto.

Com os dados de velocidades apresentados na Tabela 31, obtidos dos cromatogramas, foram calculados os parâmetros R e k' .

Tabela 31- velocidade dos picos cis e trans em função da polaridade.

fase (v/v)	Índice de Polaridade	Vel. P1 cm/min	Vel. P2 cm/min
90/10	3,87	1,183	0,067
80/20	3,45	0,832	0,078
70/30	3,03	0,616	0,121
50/50	2,18	0,031	0,322
40/60	1,75	0,26	1,295

Fases – Acetato de etila /hexano; P1 – velocidade do pico 1

P2 – velocidade do pico 2

Velocidades corrigidas para vazão equivalente à 2,0 cm/min.

A Tabela 32 mostra os valores de k' e R calculados a partir dos dados de velocidade acima reportados.

Tabela 32 – Fator de retardo e fator de capacidade

fases	Fator de capacidade k'		Fator de retardo R	
	Trans-bixina	Cis-bixina	Trans-bixina	Cis-bixina
90/10	0,69	28,63	0,59	0,03
80/20	1,40	24,41	0,42	0,04
70/30	2,25	15,48	0,31	0,06
50/50	0,16	0,01	5,21	61,84
40/60	0,65	0,13	0,54	6,67

A mudança na força do solvente, uma forma de controle de k' , foi obtida pela variação na composição da fase móvel. A conseqüente mudança na polaridade acarreta modificações na retenção de um pico em relação ao outro permitindo, deste modo, um aumento na resolução. Outro aspecto de grande importância relacionado ao fator de capacidade refere-se à possibilidade do aumento da carga de coluna, para aquele componente que apresenta maior valor. A necessidade de um número maior de volumes de coluna para sua eluição, devido a sua maior retenção permite operar maiores massas na separação cromatográfica. Exemplo disto pode ser observado para a bixina cis em condição de maior polaridade, que apresentou na relação 90/10, k' igual a 28,63, em conseqüência do reduzido fator de retardo 0,03 representado. Este aspecto favorece separações com maior quantidade daquele composto com menor retenção.

A ocorrência da inversão dos picos com a variação da polaridade observada nos experimentos sugere que a partir de uma determinada faixa de composição as bandas cis e trans deslocam-se com a mesma velocidade, tornando impossível sua separação. Nota-se que a trans-bixina apresenta baixa retenção em polaridade elevada, aumentando, contudo, com a redução da polaridade. Com a cis-bixina o fenômeno manifesta-se de forma inversa. Contudo, mesmo em polaridade baixa sua retenção apresenta valores elevados. Desta forma, as melhores condições de separação são alcançadas nas proximidades dos extremos de polaridade.

Diante do comportamento de inversão observado e também, pelo fato de que tempos de retenção longos acarretam alargamento de bandas, trazendo em conseqüência riscos de sobreposição de outros picos, além de produzir frações muito diluídas, pode-se concluir que; se o pico de interesse for o trans, deve-se percolar a coluna com fase de maior polaridade. Ao contrário, se o isômero de interesse for o cis, a opção pela fase de menor polaridade é mais aconselhável, ainda que a capacidade de carga fique reduzida.

Na Figura 40 é apresentada a intersecção entre as linhas de tendência

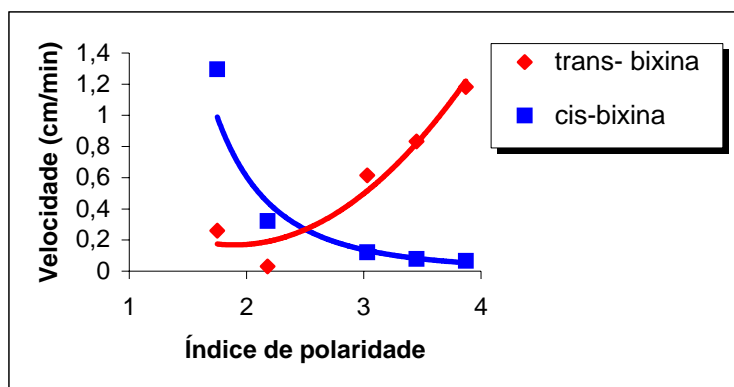


Figura 40 - Velocidade do pico em função da polaridade do eluente

O desvio de alguns pontos afastados da linha de tendência é resultado de empacotamento desuniforme. As imperfeições no leito podem acarretar fluxos preferenciais como também as diferentes vazões apresentadas pelas diferentes colunas, somado a oscilação da vazão durante as corridas cromatográficas teriam conduzido às flutuações no comportamento das curvas. Ainda assim é possível visualizar a citada inversão na posição dos picos.

Foram realizadas varias corridas visando uma melhor definição dos pontos na região próximo à intersecção das linhas de tendência. O espalhamento e deformação da banda acarretava com frequência variações na concentração ao longo do pico, distinta de uma distribuição gaussiana característica de um pico cromatográfico. Um fator contribuinte, além das características de empacotamento, pode estar relacionado à isomerização da cis-bixina durante a eluição na coluna. Uma vez ocorrendo a formação do isômero este se desloca com velocidade diferente do composto que o gerou. Nas condições de polaridade intermediária, próxima à linha de tendência, ambos os picos apresentam retenção elevada, fazendo com que o efeito se torne mais pronunciado. No caso da mistura eluente tendendo para a menor polaridade, onde o composto cis desloca-se na frente, deve ocorrer um atraso, com formação de uma cauda atrás do pico, fazendo com que se aproxime do pico trans que se desloca um pouco acima. Na situação inversa, deve ocorrer um alargamento particularmente no segundo pico. Como a trans bixina do primeiro pico desloca-se com velocidade também reduzida, a trans-bixina produzida pela isomerização do segundo pico, mais retido, adianta-se, aproximando-se do primeiro pico.

Observou-se também nos experimentos que o balanço de massas efetuado com a integração dos valores da concentração das varias frações, analisadas individualmente, apresentava diferenças, que em determinados experimentos afastava-se bastante do valor da

massa inicial empregada. Isto se deve a erros cumulativos na determinação do volume das correspondentes frações, somados a erros de diluição, evaporação, entre outros. Contudo em uma corrida, onde as frações foram agrupadas e analisadas na sua integralidade, obteve-se 95,08 % de recuperação da massa aplicada à coluna, correspondente a 0,019 mg (no primeiro pico) isômero trans e 0,039 (mg no segundo pico) isômero cis, de um total de 0,061 mg de bixina empregada na separação.

4.13.2 VOLUME DE COLUNAS EM FUNÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Diferente da comparação com base na velocidade do pico, a relação com volumes de coluna permite melhor avaliação.

Na Tabela 33 são mostrados os valores de Rf dos picos correspondentes à forma trans determinados por CCD, para diferentes polaridades e os respectivos volumes de colunas, com base neles calculados. Na última coluna é possível observar os dados de volumes de coluna calculados dos cromatogramas realizados com o emprego da coluna flash.

Tabela 33 - Volumes de colunas e valores de Rf para a trans-bixina em função de diferentes polaridades-

Fase	Distancia da base (mm)			H placa (mm)		Valor do Rf		VC com base no Rf		VC da flash experimental
	de	a	até	de	a	de	a	de	a	
90/10	4,00	3,65	6,00	0,67	0,61	1,50	1,64	1,69		
80/20	3,00	2,75	6,00	0,50	0,46	2,00	2,18	2,01		
70/30	2,50	2,25	6,10	0,41	0,37	2,44	2,71	2,63		
60/40	2,10	1,80	6,00	0,35	0,30	2,86	3,33	3,63		
50/50	1,00	0,85	6,15	0,16	0,14	6,15	7,24	6,21		
40/60	0,80	0,65	6,00	0,13	0,11	7,50	9,23	7,66		
30/70	0,55	0,45	5,90	0,09	0,08	10,73	13,11	19,47		

A Figura 41 mostra o aumento de volumes de colunas na separação da trans-bixina como função da redução da polaridade da fase móvel.

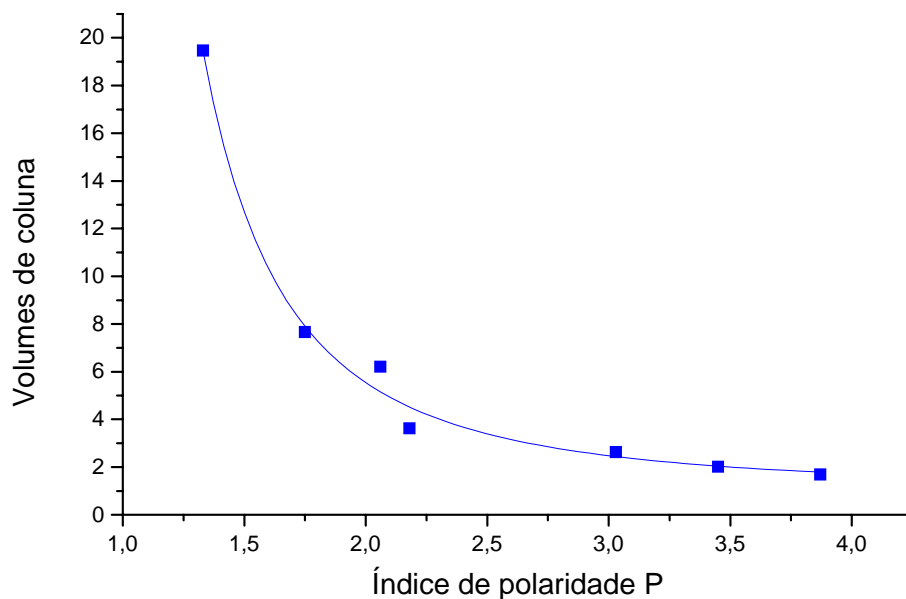


Figura 41 - Volumes de colunas x índice de polaridade da fase móvel para eluição da trans bixina

4.13.3 Número de pratos teóricos

Na Tabela 34 são apresentados os dados referentes aos picos da cis e trans-bixina obtidos de duas corridas cromatográficas realizadas em colunas de diferentes seções (0,292 e 0,931 cm²), nas quais foi empregado como fase eluente acetato de etila/hexano 80/20. Dos seus correspondentes cromatogramas foram calculados o número de pratos teóricos com base nas equações (35) apresentadas na Seção 2.9.5.

Tabela 34 - Número de pratos teóricos

	T retenção				N pratos teóricos	
	tr	altura h	larg. Base tw	larg.1/2 h t1/2	N1	N2
trans-m	6,52	4,5	2,5	1,49	108,83	106,08
cis-m	148,5	5,2	5,6	3,2	11251,15	11930,61
trans-M	9	4,6	1,6	0,88	506,25	579,47
cis-M	338	5,4	9,1	5,4	22073,47	21704,79

Legenda: **M**, relacionada à coluna de maior diâmetro; **m** a de menor diâmetro
Fase móvel acetato/hexano 80/20

$$N1 = 16 * \left[\frac{t_R}{t_W} \right]^2 \quad N2 = 5,54 \left[\frac{t_R}{t_{\frac{1}{2}}} \right]^2$$

Considerando que quanto maior o número de estágios de equilíbrio maior a eficiência de separação pode-se concluir que:

a) O número de pratos teóricos relacionados tanto ao isômero trans quanto o cis, apresentou valores maiores na coluna de maior diâmetro. Isto resultou do melhor empacotamento obtido para esta coluna, fato evidenciado pelo volume de poros resultantes, menores na coluna de maior seção comparado àquela de menor seção. Ver Anexo G.

b) Para a fase móvel empregada, de maior polaridade, o isolamento da forma cis resultou em maior número de estágios de equilíbrio, para uma eficaz separação, caracterizado por um maior número de pratos.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 PRINCIPAIS CONCLUSÕES OBTIDAS DO TRABALHO

1- A extração de bixina das sementes de urucum com acetona, após lavagens prévias com hexano e etanol, além de consumir um grande volume de solvente não se mostra eficaz, produzindo um concentrado com no máximo 56% de bixina. O emprego de éter etílico em substituição ao etanol apesar de produzir concentrado com até 75 % não se mostra competitivo quando comparado à extração com solução hidro-alcoólica amoniacal. Com esta solução foi obtido concentrado com até 87 %. Contudo, as lavagens prévias e também o emprego de água na mistura trazem dificuldades de processamento.

2- No desenvolvimento do trabalho, a determinação da solubilidade da bixina em diferentes solventes permitiu definir as melhores condições para processamento da semente de urucum. Observou-se que o extrato amoniacal produz um derivado de bixina com solubilidade na ordem de 6,25mg/mL valor que supera a solubilidade da bixina em clorofórmio. Este produto se tratado com ácido regenera bixina. O mesmo produto, tratado com íon cálcio produz precipitado de reduzida solubilidade.

3- O processo de extração com solução etanólica amoniacal anidra, além da rapidez, pode ser conduzida com reduzido consumo de solvente produzindo concentrado com até 77% com único ciclo de processo. Ainda, a possibilidade de recuperação parcial tanto da amônia quanto do etanol, por destilação, mostra-se viável, podendo estes insumos ser reutilizados no processo em primeira abertura. O processo, se repetido dois ciclos de extração/precipitação produz concentrado com até 87,03%.

4- Os elevados valores de solubilidade apresentados pela bixina em solução alcoólica amoniacal anidra, associado à precipitação possibilitam estabelecer uma nova tecnologia para extração e purificação de bixina em escala comercial.

5- O processo de extração deve ser conduzido à temperatura ambiente, quando se deseja obter produto com elevada concentração de isômero cis.

6- A recristalização em solvente, diferente de um processo de precipitação possibilita melhor controle da pureza do material sólido obtido. Neste sentido, a recristalização com acetona conduzida com lento e controlado resfriamento produziu composto com até 98,27 %, sem a necessidade de reprocesso.

7- Os padrões de bixina conservados sob vácuo ou nitrogênio apresentaram, após 90 dias de estocagem, degradação de até 13%, ainda que conservados à -8°C e ausência de luz. Contudo a manutenção do composto em solução alcoólica ou em solução de acetonitrila/dimetilformamida nas mesmas condições de estocagem mostrou-se mais eficientes. No primeiro solvente não foi detectada degradação no período observado, para o segundo ficou na ordem de 1,5 %.

Em face de reduzida solubilidade da bixina, a conservação do padrão na forma de cristais imersos em etanol ou acetona mostrara-se adequada e vantajosa. Esta forma de armazenamento permite dispor de uma maior quantidade de padrão, facilitando emprego quando se deseja produto com elevada pureza na forma cristalina.

8- No presente trabalho constatou-se que a análise de bixina pelo método da hidrólise não é aconselhável, pois sua dependência de variáveis cinéticas e ainda agravadas pelas características de reduzida estabilidade acarreta imprecisão nos resultados.

9- O emprego de clorofórmio como solvente para leitura espectrofotométrica atende ao objetivo de análises de rotina quanto de pesquisa, apresentando valores confiáveis. A substituição do clorofórmio pelo etanol mostra-se como alternativa viável, pois a bixina apresenta grande estabilidade neste solvente, além de não ser tóxico.

10- O emprego de espectrofotometria atende plenamente a análise para teores reduzidos de bixina até níveis de $0,05\mu\text{g/mL}$, dispensando em muitos casos outras técnicas analíticas, em particular a HPLC.

11- Neste trabalho foi investigado o uso de cromatografia preparativa flash por fase normal, para a obtenção de padrão de elevada pureza. Empregando-se diferentes relações de polaridade pela variação da composição da fase móvel acetato de etila/hexano, esta técnica mostrou-se eficaz na separação da cis e trans bixina.

12- Ainda que a cromatografia preparativa seja uma técnica ideal para separação e isolamento de compostos com elevada pureza, na purificação da bixina as relações de equilíbrio que governam o fenômeno e a baixa solubilidade destes compostos dificultam a

utilização desta técnica para a obtenção de quantidades maiores. Contudo, o seu emprego se justifica quando se deseja isolar os isômeros com propósito analítico.

12- A mudança da polaridade resulta na inversão dos tempos de retenção dos isômeros cis e trans, trazendo flexibilidade à separação.

5.2 - SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1- Proceder à separação cromatográfica em coluna HPLC empregando a mesma fase móvel, no sentido de reproduzir o processo estudado. Ajustar os parâmetros de solubilidade empregando outras composições de solvente, no sentido, de desenvolver metodologia analítica alternativa ao uso de fase reversa na determinação dos isômeros cis-trans.

2- Isolar os isômeros em quantidades maiores, para posterior determinação dos respectivos coeficientes de absorvidade em diferentes solventes.

3- Avaliar as características físicas e estruturais dos derivados; amoniacal e cálcico.

4- Verificar a suscetibilidade à hidrólise do composto amoniacal.

5- Avaliar a aplicabilidade de uso dos derivados cálcico e amoniacal como padrão de bixina ou matriz para norbixina.

6- Estudar a obtenção de outros derivados de bixina tendo como ponto de partida não só o derivado amoniacal, mas também o cálcico.

7- Avaliar o potencial para obtenção de ésteres tendo como ponto de partida o derivado amoniacal ou mesmo o cálcico, visto que a facilidade de processamento destes pode viabilizar a produção em maior escala.

8- Estudar uma rota para recuperar os resíduos de destilação deixados pela solução alcoólica amoniacal, visto que grande parte de tocotrienóis encontrada na semente e concentra-se neste extrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR SILVA, R.H., CINTRA, B.B., MILAN, S., MORAES, T. P. TAPEIRA, E. F., Sistema de Defesa Antioxidante em Pessoas com Síndrome de Down, **Jornal De Bioquímica Médica**, (13) 9-13, 2002.

ALBANES, D. e HARTMAN, T. J., Antioxidants and Cancer: Evidence from Human Observational Studies and Intervention Trials. in Antioxidant Status. **Diet. Nutrition And Health** (Papas A. M Ed.) 497-511, 1999. **Apud CHAUDHRY, Y.** Carotenoids- Natural Food Colors and Health Benefits- Symposium 12- Interaction of Natural Colors with Other Ingredients, 2003.

ALMEIDA J. L., ALMEIDA, F.C. G., NUNES, R. P., ALMEIDA, F. A. G. Indução de Enraizamento na Micropropagação do Urucuzeiro. **Rev. Fac. Agron.,** (Maracay) 21: 129-135, 1995.

ALVES, R. W. Extração e Purificação de Compostos de Urucum. **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Química, Engenharia Química / UFSC, Florianópolis, 2001.

AMSAR PRIVATE LIMITED - Natural Colors & Vegetable Dyes. Disponível em <<http://www.amsar.com/annatto.html>>, consultado em 12 nov 2002.

ARANEZ, A. T e BAYOT, E., Genotoxicity of Pigments from Seeds of *Bixa Orellana* L. (atsuete) II Determined by Lethal Test. **Philippine Journal of Science**, 126 (2) 163-173, 1998.

ARANEZ, A. T e RUBIO, R. O., Genotoxicity of Pigments from Seeds of *Bixa Orellana* L. (atsuete) II Determined by Allium Test. **Philippine journal of science**, 125 (4), 259-269, 1997.

- ANTUNES, L. M. G. E ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. *Ver. Nutr.*, Campinas, 13 (2), 81-88, maio/ago., 2000.
- ARIMA, H. K. e ANGELUCCI, E. Urucum. II- Comparação de Métodos Cromatográficos para Separação dos Carotenóides. **Coletânea ITAL**, Campinas, 11, 97-106, 1980.
- BAST, A., HAANEN, G. R., e VAN DEL BERG, H. Antioxidant Effects of Carotenoids. **International Journal of Vitamins and Nutritional Research**, 68, 399-343, 1998.
- BLOT W.J., LI, J.Y., TAYLOR P.R. , GUO, W., DANSEY, S., WANG, G. Q., YANG, C. S., ZHENG, S. F., GAIL, M., LI, G. Y. et al. Nutrition Intervention Trials in Linxian, China: Supplementation with Specific Vitamin/Mineral Combinations, Cancer Incidence and Disease-Specific Mortality in the General Population. **Journal Natl. Cancer Institute**. 85: 1483-1492, 1993.
- BOUVIER, F., SUIRE, C., MUTTERE, J. e CAMARA, BILAL, Oxidative Remodeling of Chromoplast Carotenoids-Identification of the Carotenoid Dioxigenase CsCCD and CsZCD Genes Involved in Crocus Secondary Metabolite Biogenesis, **The Plant Cell**, v 15. n.1, p. 47-62, jan.2003.
- BRESSANI R., Chemical Composition, Amino Acid Content and Nutritive Value of the Protein of the Annatto Seed (*Bixa Orellana*) **Arch Latinoameric. Nutr.** , 33: 2, 356-376, 1983.
- CAMARA B., DOGBO O. e BOUVIER F. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Bixin (*Annatto*). **Science**, 2089-2091, jun, 2003.
- CARVALHO, P. R. N. SILVA, M. G., Moreira, CGC, Avaliação dos Métodos Espectrofotométricos de Análise de Sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.), **Coletânea ITAL**, Campinas, 23 (2), 181-188, 1993.

- CARVALHO, P. R. N. SARANTÓPOULOS G.L. SHIROSE I. e SILVA M. G.**, Estudo de Vida-de-Prateleira do Corante (Bixina) Extraído das Sementes de Urucum. **Coletânea ITAL**, Campinas, 23 (1), 98-104, 1993.
- CARVALHO, P. R. N** Extração do Corante do Urucum. In *Corantes Naturais para Alimentos*. Campinas, 74-77, 1989.
- CASS, Q. B., DEGANI, A.L.G.**, Desenvolvimento de Métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação, EdUFDCar, 77p, 2001.
- CATÁLOGO RURAL**. <http://www.agrov.com/vegetais/fru/aromáticas_medicinais.htm>. Consultado em 28/mar/2003.
- CHAO, R. R., MULVANEY, S. J. , SANSON, D. R. HSIEH, F, TEMPESTA, M. S.** Supercritical CO₂ Extraction of Annatto (*Bixa Orellana*) Pigments and Some Characteristics of the Colors Extract. **Journal of Food Science** v 56, n.1,80-83, 1991.
- CHAUDHRY, Y.** Carotenoids- Natural Food Colors and Health Benefits- Symposium 12- Interaction of Natural Colors with Other Ingredients, 2003.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G.L. BONATO, P. S.** Introdução a Métodos Cromatográficos, Editora da UNICAMP, 279p, 1995.
- COLLINS P.** The Role of Annatto in Food Colouring Food Ingredients and Processing International. 23-27, 1992.
- COLLINS, P. DOWNHAM, A.** Colouring our Food in the Last and Next Millennium **Journal of Food Science and Technology**, 35, 5-22, 2000.
- CUGHLIN. M.D.** Using the Merck-Inbio. Agreement to Clarify the Convention on Biological Diversity. **Columbia Journal Of Transational Law**, v 31p.337,1993. apud **RIMOLI** et. Al. (2000)

- DA SILVA, R, LELIS, P E DA SILVEIRA, D.** Informações Básicas Sobre a Cultura e Utilização do Urucum (*Bixa Orellana* L.), Universidade Federal de Viçosa, Brasil, Informe Técnico, n. 59, 22p. 1987.
- DEGNAN, A J., VON ELBE, J. H., HARTEL, R.W.** Extraction of Annatto Seed Pigment by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Food Science**, v. 56 n. 6, 1655-1659, 1991.
- FAO/WHO.** Specification for the Identity and Purity of Some Food Colours, Flavour Enhancer, Thickening Agents and Certain Other Food Additives. (Nutrition Meeting Report Series, 54), Rome, 4-11, 1975. **Apud** Carvalho (1993) *
- FAO/WHO.** Specification for the Identity and Purity of Buffering Agents, Salts, Emulsifiers, Thickening Agents, Stabilizers, Flavouring Agents, Food Colours, Sweetening Agents and Miscellaneous Additives. Food and Nutrition Papers, 25), Rome, 15-23, 1982. **apud** Carvalho (1993)
- FONTANA, J. D., MENDES, S.V., PERSIKE, D.S. PERACET, L. F., PASSOS, M.** CAROTENÓIDES - Cores Atraentes e Ação Biológica **11º Premio Paranaense de C & T** (1997). Disponível em
<<http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112carotenoid.htm>>.
Consultado em 6 /12/ 2001.
- FREGA, N., M. MOZZON e BOCCI,** Identification and Estimation of Tocotrienols in the Annatto Lipid Fraction by Gas Chromatography Mass Spectrometry. **Journal of The American Oil Chemists Society**, 75, (12) 1723-1727, 1998.
- FUHRHOP, J.H, KOMTSU, T. TSUCHIDA, E. BÖTTCHER C. DONNER, D., MESSERSCHIMIDT, C. SIGGEL, U. STOCKER, W. RABE, P. J.,** Solid Vesicle Membrane Made of Meso-Tetrakis [(Bixininylamino)-O-Phenyl] Porphyrins, **J. Am. Chem. Soc.**, 119, 11660-11665, 1997.

- GALINDO-CUSPINERA, V, LUBRAN, M.B., RANKIN, S.A.** Comparison of Volatile Compounds in Water and Oil-Soluble Annatto (Bixa Orelana) Extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50 (7) 2010-2015, 2002.
- GARCIA, E. S., SILVA, A. C. P., GILBERT, B., CORRÊIA, C.B.V., CAVALHEIRO, M.V.S., SANTOS, R. R. e TOMASSINI, T.** Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas- Cap. 10- **Produtos Naturais e Saúde** - Fitoterápicos, 1994. Disponível em: <<http://bdt.fat.org.Br/publicações/padct/bio/>> Consultafdo em:, jan.2003.
- GIULIANO, G, ROSATI, C. AND BRAMLEY P. M.** -To Dye or Not to Dye: Biochemistry of Annatto Unveiled, **Trends in Biotechnology**, vol. 21, n.12 513-516, dec. 2003.
- GIRARDIN M., HUMEAU C., e ROVEL B.** Enzimatic Esterification of Bixin by L-Ascorbic Acid, **Biotechnology Letters**, 22, 165-168, 2000.
- GLORIA M. B.A., VALE S. R., BOBBIO P. A.,** Effect of Water Activity of Bixin in an Annatto Extract-Microcrystalline Cellulose Model System. **Food Chemistry**, 52, n. 4, 389-391, 1995.
- GORDON M. H. e SOTÍRIOS K.,** Antioxidant Properties of Annatto Carotenoids. **Food Chemistry**, 83, 523-529, 2003.
- GUIOCHON, G.A.,** Chromatography, Today and Tomorrow, **Analytical Acta**, 283, 309-319, 1993.
- HAILA, K. M., LIEVONEN, S. M., e HEINONEN, M. I.** Effect of Lutein, Licopeno, Annatto, And γ -Tocopherol on Autoxidation of Triglycerides. **Journal Of Agricultural & Food Chemistry**, 44, 2096-2100, 1996.
- HALLAGAN, J. B., ALLEN, D. C. e BORZELLECA J. F.** The Safety and Regulation Status of Food, Drug Cosmetics Colour Additives Exempt From Certification. **Food Chem. Toxicology**, 33, 515-528, 1995.

- HALLAGAN, J.B., LUCAS, C.D. e TAYLOR, S. L.** The role of Natural color Additives in food Allergy. **Advances In Food And Nutrition Research**, V 43, 195–216, 2001.
- HEBELI, A. e PFANDER.** Synthesis of Bixin and Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa Orellana*). **Helvetica Chemica Acta**. 82 (5), 696-706, 1999.
- INGRAM J. S. e FRANCIS B. J.** The Annatto Tree (*Bixa orellana* L.) –A Guide to its Occurrence, Cultivation, Preparation and Uses. **Tropical Science**, XI, n. 2, 97-102, 1969.
- JAKO, C.; COUTU, C. ;ROEWER,I.; REED, D. W. PELCHER, L.E.; COVELLO, P. S.** Probing Carotenoid Biosíntese in Developing Deed Coats of *Bixa Orellana* (Bixaceae) Through Expressed Sequence Tag Analysis. **Plant Science**, 163, 141-145, 2002.
- JARAMILLO, D. A.**, Disponível em GARDENWEB
<<http://.uk.gardenWeb.com/forums/load/espana/msg1219555030636.html>>.
Consultado em 28/03/2003.
- JONDICO, I. J. O. e PATTENDEN, G.** Terpenoids and an Apocarotenoid from Seeds of *Bixa Orellana*, **Phytochemistry**, v.28, n.11, 3159-3162, 1989.
- KANJILAL, P.B. SINGH, R. S.** Agronomic Evaluation of Annatto (*Bixa orellana* L.) **Journal of Herbs, Spice & Medical Plants**, 3 (3) 13-17, 1996.
- KARRER, P e JUCKER, E.** **Carotenoids**. Elsevier Publishing Company Inc., 384 p., 1950.
- KATO, O. R., FIGUEIRÊDO, F. J. C., BELFORT, A. J. L., NOGUEIRA, O. L. e BARBOSA, W. C.** Época de Colheita de Sementes de Urucum: Emergência e Teor de Corantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 27(9), 1291-1302, 1992.

- KNAEBEL K.S.**, For Your Next Separation Consider Adsorption, **Chemical Engineering**, nov., 92-102, 1995.
- KUNTZ, L. A.** Food Product Design - Colors au Naturel, Week Publishing. Co march1988. Disponível em <foodprodutdesign.com/archive/1998/0398AP.html>. consultado em 12/10/2003.
- LARA, H. L.** Monografia de Corantes Naturais para Fins Alimentícios: Padrões de Identidade e Qualidade. São Paulo, 47p., 1984. **apud**. Carvalho, 1993 *
- LEVY, L.W. REGALADO, E. NAVARRETE, S. e WATKINS, R. H.**, Bixin and Norbixin in Human Plasma: Determination and Study of the Absorption of a Single Dose of Annatto Food Color. **Analyst**, **122: 9, 977-980, 1997.**
- LEWIS, R. J.** **Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 12 th ed., New York, Van Nostrand Reinhold Co., p 81-82, 1993.**
- LIDE, D. R.** **CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76 th ed. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc. p 3-142, 1995.**
- LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, A S., LIMA, E. Q. e SILVA, J. F.** Toxicidade Aguda de Rutina e de *Bixa orellana.*, **Acta Farm. Bonaerense**, 22 (1), 21-26, 2003.
- LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, STRIGUETA, P. C. TINOCO, A. L. A. S., e SILVA, J. F.** Bixina, norbixina e Quercetina e seus Efeitos no Metabolismo Lípidico de Coelho. Brás. **J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, V.38, n° 4 196-200, 2001.
- LO NOSTRO, P.** Supramolecular Aggregates from Vitaminc Derivatives Structure and Properties **INTERNET JOURNAL OF SCIENCE- Biological Chemistry**, vol 4 1977. Disponível em <<http://www.netsci-journal.com/97v4/07014/index.htm>>, acesso em 06/01/2002.

- MARMION, D. M.** HANDBOOK OF US. COLORANTS, FOOD, DRUGS, COSMETICS and MEDICAL DEVICES, 3^a ed., JohnWiley & Sons, Inc. 120-122, 1991.
- MASSARANI, G., PASSOS M.L. e BARRETO D. W.** Production of Annatto Concentrates in Spouted Bed. **The Canadian Journal Of Chemical Engineering**, v. 70, 954-959, 1992.
- MAY, P.H., ROCHA, R.B., SILVA, O.P., WAGNER, P.D., SILBEERLING, L.** UNITED CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT-17/dec/1997 - Management of Commodity Resource in the Context of Sustainable Development - A Survey of Environmentally Friendly Products of Brazil, pags.:8, 33-36. Consultado em 02/jan/2003. Disponível em< <http://r0.unctad.org/en/docs/poitcdcmd10.pdf>>.
- Mc KEOWN G. G.** Paper Chromatography of Bixin and Related Compounds. **J. Ass. Offic Agric. Chemistry**, vol.44, (2), 347-351, 1961.
- Mc KEOWN, G. G. e MARK, E.** The Composition of Oil-soluble Annatto Food Colours. **Journal of the A. O. A. C.**, Vol. 45, 761, 1962.
- MELLO, A. A. A., e LIMA, L. C. F.** A Situação da Cultura do Urucum no Brasil e Perspectivas. 1989.
- MERCADANTE A. Z., STECK A. e PFANDER H.** Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) Seeds. **Phytochemistry**. 52, (1) 135-139, 1999.
- MERCADANTE A. Z., STECK A. e PFANDER H.** Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (bixa orellana), **Journal of agricultural and Food Chemistry**. 45, (4) 1050-1054, 1997.
- NAJAR S. V., BOBBIO F. O. e BOBBIO P. A.** Effects of Light, Air, Anti-oxidants and Pro-oxidants on Annatto Extracts (*Bixa orellana*). **Food Chemistry**, 29, No. 4, 283-289, 1988.

- NEVES, F. A. R., ROCHA, K.B., E NEVES, N.C.** Formação de Recursos Humanos para Ciência, Tecnologia e Inovação a Formação em Farmácia. Perspectivas e Necessidades da Área de Medicamentos. – Novas Drogas e Patentes. p 1-11, 2003. Disponível em <http://www.cgee.org.br/arquivos/rhf_p1_nd_francisco_neves.pdf>Consultado em jan. 2004.
- NEWMAN, H. FAIRCHILD TROPICAL GARDEN**-Botanical Resource Center. Disponível em <<http://www.virtualherbarium.org>>. Consultado em 23/11/2002.
- NISH, W. A., WHISMAN, B. A., GOETZ, D.W. RAMIREZ, D. A.** Anaphylaxis to Annatto Dye. A Case Report. **Annals Of Allergy**, 66, 129-131, 1991.
- NTP, NATIONAL TOXICOLOGICAL PROGRAM.** Evidence for Possible Carcinogenic Activity – Bixin. Disponível em <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_Background/ExecSumm/bixin/Bixin_carc.html>. Consultado em 07/02/2002.
- ODAKE, K. HANAKA, A. KAJIWARA, T. HIGASHIMURA, Y. WADA, S. e ISHIHARA, M.** Application of Electron Beam Irradiation to Powdered Natural Food Colorants. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 40, n 10, 697-701, 1993.
- PAUMGARTTEN, F. J. R., DE-CARVALHO, R. R., ARAÚJO, I. B., PINTO, F. M., BORGES, O. O., SOUZA, C.A., M. KURIYAMA, S. N.** Evaluation of the Developmental Toxicity of Annatto in the Rat. **Food and Chemical Toxicology**. 40, 1505-1601, 2002.
- PASSOS M. L., OLIVEIRA, L. S., FRANCA, A. S. FREITAS M. E. A, MASSARANI, G. e BARROSO M. A. S.** Spouted Bed Units for Annatto Powder Production. **The Inter-American Drying Conference (IADC)**, Itu-SP, 181-188, 1997.
- PRESTON, H. D. e RICKARD, M.D.,** Extraction and Chemistry of Annatto, **Food Chemistry**, 5, 47-56, 1980.

PROCESSOS DE COMERCIALIZAÇÃO E MERCADOS. disponível em <<http://www.siamaz.ufpa.br/amazônia/urucum/>>. Consultado em 03/ago./2003.

QING SU, ROWLEY, K. G. e BALAZS, N. D. H. CAROTENOIDS: Separation Methods Applicable to Biological Samples, **Journal of Chromatography B**, 781, 393-418, 2002.

RIMOLI A-O., ARRUDA, E. J., RIMOLI, J., BUENO, M.R. E COSTA, R.B. Biodiversidade, Biotecnologia e Conservação Genética em Desenvolvimento. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v.1, n.1, p.21-30, set. 2000.

REITH J. F. e GIELEN J. W. Properties of Bixin and Norbixin and the Composition of Annatto Extracts. **Journal of Food Science**. 36, 861-864, 1971.

REVISTA DE FITOTERAPIA - em Plantas Medicinaiis-Achiote. Disponível em <<http://www.fitoterapia.net/vademecum/plantas/indexp.html>>. Consultado em 10/07/2003.

ROBBINS, P. Marketing e Post harvest Research in Eastern and Central Africa-Tropical Commodities and their Markets- Part Two – Commodities A-B, published by Twin 1995, disponível em < <http://www.foodnet.cgiar.org/market/tropcomm/part2ab.htm>>. Consultado em 02 fev. 2003., ISBN 0 7494 16720

RODRIGUEZ-AMAYA, B. B. A Guide to Carotenoid Análisis in Food, OMNI Research, ILSI Human Nutritional Institute, Washington, 64 pag. 2001.

ROHRSCHEIDER, L. Solvent Characterization by Gas-Liquid Partition Coefficient, **Anal. Chemistry**, 45, 124-247, 1973.

ROSALEN, D., SIMÃO S. E HAAG, H., Considerações Sobre a Cultura do Urucu (*Bixa orellana* L.), Universidade de São Paulo. Piracicaba SP. Informativo Técnico, nº 12, 42p. 1991.

- ROUSSEFF R. L.**, High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the Pigments in Tumeric and Annatto. **Journal of Food Science**. vol.3 n. 56, p. 1823-1826. 1988.
- RUIZ H. V. e WOOD G. P.** The Separation of Annatto Pigments by Sephadex. **Tropical Science**.13, (3), 211-214, 1971.
- RUTHVEN, D. M.**, Principles of Adsorption and Adsorption Processes, John Wiley & Sons, 433p., 1984.
- SANDI, M. P., CUEN, BACERRA, ROSALBA, BIODIVERSITAS**, El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ano 7, nº 46, 7-11, enero 2003.
- SCHWARTZ, S. H.** Apocarotenoids and Carotenoid Cleavage Dioxygenases. Disponível em <<http://www.msu.edu/~schwartz1/apocarotenoids.htm>>. consultado em 23/12/2003.
- SCHWARTZ, S. H., QIN, X. e ZEEVAART, JA** Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants. **Journal Biology Chemical**. v.276, 25208-25211, 2001.
- SCOTTER, M. J., APLETON G. P. CASTLE L.** Kinetic and Yield for the Formation of Coloured and Aromatic Thermal Degradation Products of Annatto in Foods, **Food Chemistry**, 74, v.3, 365-375, 2001.
- SCOTTER, M J., THORPE, S. A., REYNOLDS, S.L., WILSON, L. A., e STRUTT, P. R.** Characterization of the Principal Colouring Components of Annatto Using High Performance Liquid Chromatography with Photodiode-array Detection, **Food Additives and Contaminants**, v.11, n. 3, 301-315. 1994.
- SCOTTER, M.J., WILSON, L. A., APLETON G. P., CASTLE L.** Analysis of annatto (*Bixa orellana L.*) Food Colouring Formulations. 2 Determination of Aromatic Hydrocarbon

- Thermal Degradation Products by Gas Chromatography. **Journal Agricultural food Chemistry**, v. 48, 484-488, 2000.
- SCOTTER. M. J.**, Characterization of the Coloured Thermal Degradation Products of Bixin from Annatto and a Revised Mechanism for their Formation. **Food Chemistry**, 53, v.2, 177-185, 1995.
- SEWELL, P.A. e CLARKE, B.**, Chromatographic Separations- **Analytical Chemistry by Open Learning** John Wiley & Sons, 335p.,1994.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G. C. E MORRIL, T. C.**, Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. ED. Guanabara Dois, 3^a ed., 1979, 299p.
- SIMPSON K. I., GUIMARÃES, I. G. E WILBERG, V. C.** Isolation and Purification of Bixin on a C-18 Reverse Phase Column. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 13(2) 164-167, 1993.
- SNYDER, L. R, CARR. P. W, RUTAN, S. C.** Solvatochromically Based Solvent-Selectivity Triangle. **J. Chromatography A**. 656, 537-547, 1993.
- SNYDER, KIRKLAND, J. J.**, Introduction to Modern Liquid Chromatography, sec. Ed., John Wiley & Sons, INC, 863p, 1979.
- SNYDER, KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L.**, Practical HPLC Method Development, sec. Ed. John Wiley & Sons, INC., 765p., 1997.
- SPERANZA G., MANITTO P. e MONYI D.**, Interaction Between Singlet Oxygen and Biologically Active Compounds in Aqueous Solution. III. Physical and Chemical $^1\text{O}_2$ – Quenching Rate Constants of 6, 6-Diapocarotenoids. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, 8, 51-61, 1990.
- STAHL, E.** Thin-Layer Chromatography, A laboratory Handbook, Springer-Verlag, 1041p., 1969.

- STILL, W.C.**, Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separation with Moderate Resolution, **Journal Organic Chemistry**, 43, 292-309, 1978.
- SURMATIS, J. D.**, Isomerizing Cis-Carotenoids to all-Trans-Carotenoids **US. Patent 3.989.757**, nov, 2, 1976.
- SUZUKI, M.**, Adsorption Engineering, Chemical, Engineering Monographs 25, Elsevier Science Publishing Company INC, 295p., 1990.
- TAVARES, L.E., DIAS, A R., ATAÍDE, C. H. e BARROZO, M. A. S.** Extração Mecânica Da Bixina Em Leito De Jorro: Influência Do “Draft”, Da Carga Do Material E Da Vazão De Ar. II Congresso De Engenharia De Processos Do Mercosul, **EMPROMER’ 99** – Florianópolis-Santa Catarina Brasil, 1999.
- TAYLOR, L** Herbal Secrets of the Forest, 2 ed. Sage Press, Inc., 2002. **apud** RAINTREE NUTRITION - Tropical Plant Data Base-Annatto (*Bixa Orellana*). Artigo disponível em <<http://www.rain-tree.com/annato.htm>>. Consultado em 02/07/2003.
- THRESIAMMA, K. C. GEORGE, J. KUTTAN, R.** Protective Effect of Curcumin, Elagic Acid and Bixin on Radiation Induced Genotoxicity. **J. Exp Clin. Cancer Res.**, 17 (4) 431-434, 1998. **apud. ANTUNES, L. M. G. E ARAÚJO, M. C. P.** Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. Ver. Nutr., Campinas, 13 (2), 81-88, maio/ago., 2000.
- TRINE, N., MALTERUD, K. E., PARTALI, V. SLIWKA, H-R.** Synthesis of a Triantioxidant Compound: Combination of β -Apo-8’carotenoic Acid, Selenocapryloic Acid and Trolox in a Triglyceride. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.112, 59-65, 2001.
- VÁZQUEZ-YANES, C. A. I., BATAIS MUÑOS, ALCOCOR SILVA, M. GUAL DÍAZ e C. SÁNCHEZ DIRSO**, 1999. Árboles Y Arbustos Potencialmente Valiosos Para La Restauración Ecológica Y La Reflorestación. Reporte Técnico Del Proyecto. CONABIO-

- Institution De Ecología, UNAM. .Disponível em <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/introd.J084.html>. Consultado em 26/01/2002.
- VEASH, N.** A New threat to Amazon Rainforest's Treasures. **The Independent** (UK) Oct. 16, 2000. Disponível em: <<http://forests.org/archive/brazil/biopanew.htm>> Consultado em: agosto de 2003.
- WANKAT, P.C.**, Large-Scale Adsorption and Chromatography, v. 1, CRC Press, INC., 182p, 1986.
- WEISS J. F e LANDAUER M. R.**. Protection Against Ionizing Radiation by Antioxidant Nutrients and Phytochemicals. **Toxicology**, 189, 1-20, 2003.
- YABIKU, Y. H. e TAKAHASHI, M. Y.** Determinação de Bixina em semente de Urucum: Estudo Colaborativo. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz** . V.52, n 1, 231-236, 1992.
- YABIKU, Y. H. e TAKAHASHI, M. Y.** Avaliação dos Métodos Analíticos para Determinação de Bixina em Grãos de Urucum e suas correlações. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCUM, CAMPINAS, ITAL, p 275-9, 1991.
- ZHANG, L.X., COONEY R. V. e BERTRAM J. S.** Carotenoids Gap Junction Communication and Inhibit Lipid Peroxidation in C3H/10T1/2 Cells: Relations to Their Cancer Chemopreventive Action. **Carcinogenesis**, v 12, 2109-2114, 1991.

ANEXO A

BALANÇO DE MASSA - EXTRAÇÃO ALCOÓLICA AMONICAL

Massa de semente: 100,004g

Solução extratora: etanol amoniacal 3% *

(500ml etanol absoluto + 38 g de Na₂SO₄+ 120 mL de NH₄OH 28 %)

Obs.: * Solução filtrada para eliminação do sal.

Determinação do teor de bixina na semente.

10,422 g de sementes foram transferidas para um Becker de 50 mL, ao qual foi acrescido 25 mL de clorofórmio. Submetida à agitação em cuba de ultrason, a solução, após repouso, era transferida com auxílio de uma pipeta Pasteur para um balão de 500mL. Foram realizados seis ciclos sucessivos de extração até esgotar o conteúdo de bixina das sementes, resultando em uma solução levemente corada. Aferido o balão, retirou-se uma alíquota para análise do teor de bixina.

Teor encontrado - 1,31 %.

Extração amoniacal

Procedeu-se 3 ciclos de extração com 100 mL da solução amoniacal. A cada ciclo efetuado, agitava-se por 15 min a 45 ° C. Terminada a agitação filtrava-se a solução e lavava-se com mais 20mL de solução, incorporando ao filtrado anterior. Desta solução, depois de medido o volume resultante, retirava-se uma alíquota de 5 mL para determinação da massa de extrato seco e verificação do percentual de bixina. As sementes provenientes deste ciclo de extração foram então conduzidas ao próximo ciclo, repetindo-se todas as operações. A Tabela 1 apresenta os resultados relacionados ao extrato amoniacal.

As soluções originadas em cada ciclo foram submetidas à precipitação. A massa de precipitado foi obtida de forma indireta, através da determinação da concentração residual mantida na solução após a precipitação com ácido acético. Neste ensaio não foi determinado a pureza dos cristais obtidos a cada ciclo de extração. A Tabela 2 apresenta os resultados relacionados às análises após precipitação.

As diferenças encontradas nas concentrações de bixina nos dois processos de extração se deve, além dos erros inerentes à coleta de volumes, também à diferenças na amostragem das sementes. Observa-se que junto com as sementes encontra-se uma grande quantidade de pequenos pedaços de casca e também estames que se acumulam, em função da movimentação da embalagem além de finos resultantes do atrito entre as sementes. Desta forma, quando as sementes são amostradas, não se tem garantia de homogeneidade.

Tabela 1 - Avaliação do teor de bixina em função dos ciclos de extração amoniacal

Ciclo	Extrato obtido (mL)	Sólidos totais (mg/mL)	% bixina (mg/mL)	Bixina/ST (%)	Total bix.solução (g)	% de extração (%)
1	98	36,94	7,089	19,2	0,694	52,57
2	110	14,02	3,869	27,6	0,425	31,97
3	107	6,98	1,965	28,1	0,21	15,8
					1.329 (total)	

Tabela 2 – Avaliação do teor de bixina após precipitação com ácido acético

ciclos	Vol. original (mL)	Bixina em sol. (mg/mL)	Total Bixina solução (mg)	Massa de pptado * (mg)
1	98	1,3	127 mg	567
2	110	0,922	101,5	323,5
3	107	1,095	117	93

* medida indireta

Rendimento em precipitado → $567 + 323,5 + 93 = 0,983\text{g}$

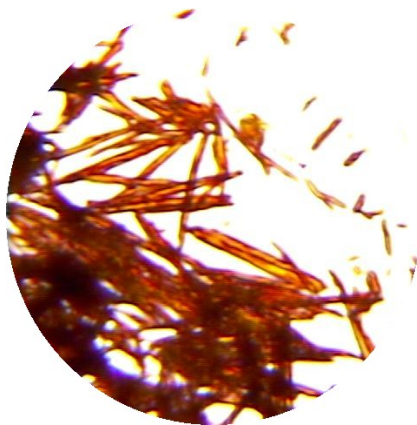
Massa extraída (disponível em solução amoniacal com três ciclos de extração) = 1,329g

Rendimento de processo (precipitação) $0,983 / 1,329 = 73,96 \%$

ANEXO B

Microfotografias de bixina e derivados

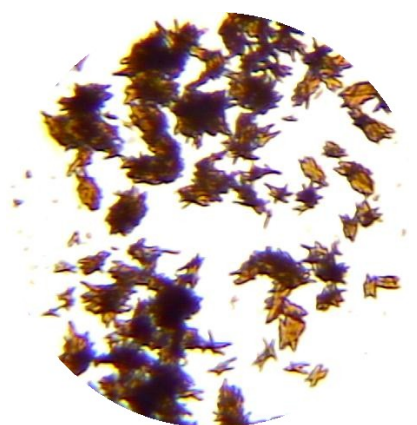
1 - CRISTAIS DE BIXINA



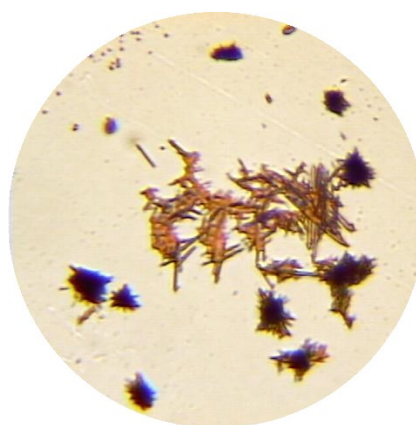
Solvente clorofórmio ampliação 400x



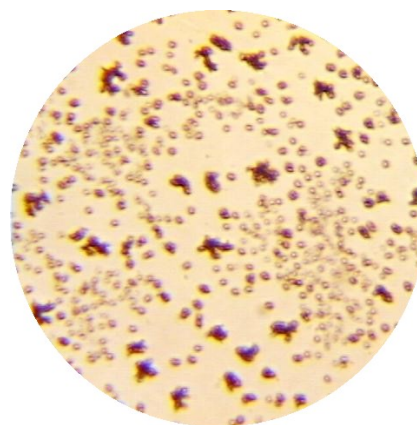
Solvente acetato de etila ampliação 400x



Solvente acetona ampliação 400x



Solvente éter etílico ampliação 400x



Solvente etanol ampliação 400x

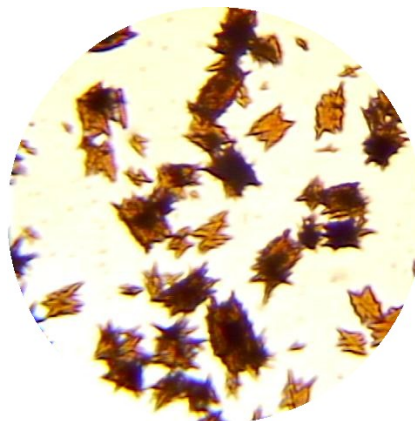
ANEXO B

Microfotografias de bixina e derivados

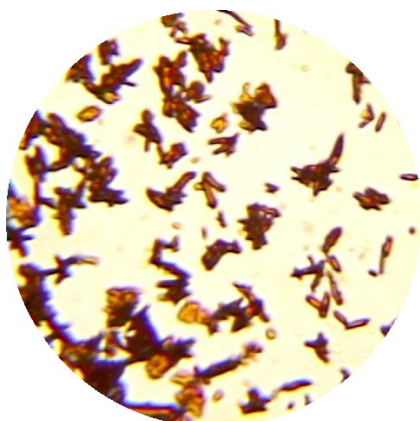
1 - CRISTAIS DE DERIVADO AMONICAL



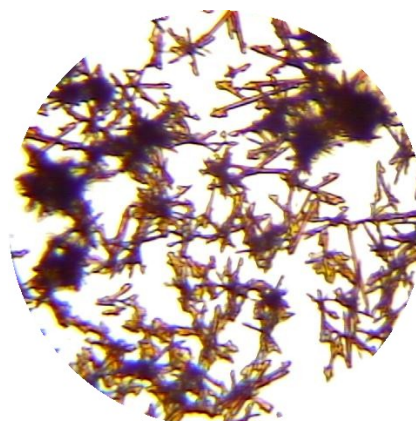
Solvente clorofórmio ampliação 400x



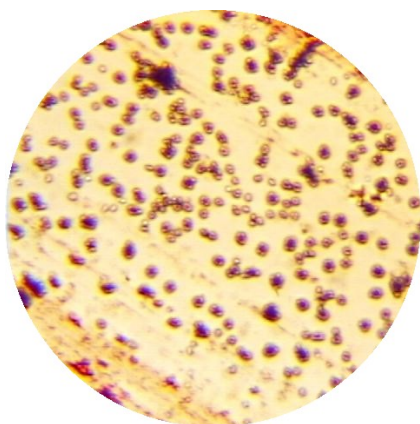
Solvente acetato de etila ampliação 400x



Solvente acetona ampliação 400x

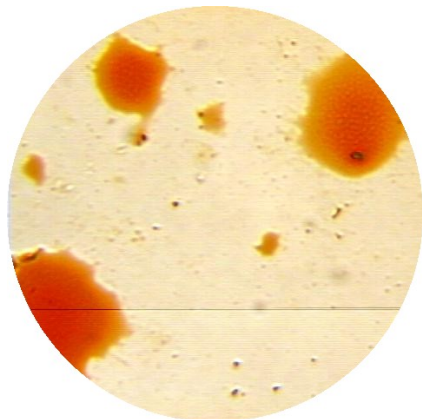


Solvente éter etílico ampliação 400x



Solvente etanol ampliação 400x

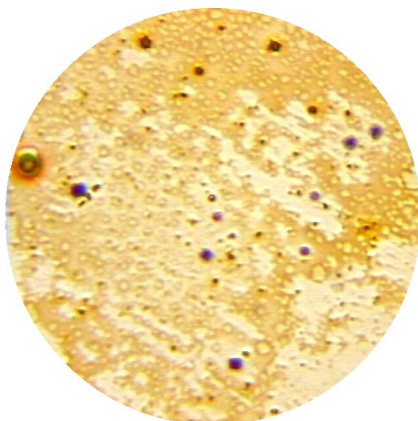
ANEXO B
Microfotografias de bixina e derivados
1 – DERIVADO CÁLCICO



Solvente clorofórmio ampliação 400x



Solvente acetato de etila ampliação 400x



Solvente acetona ampliação 400x

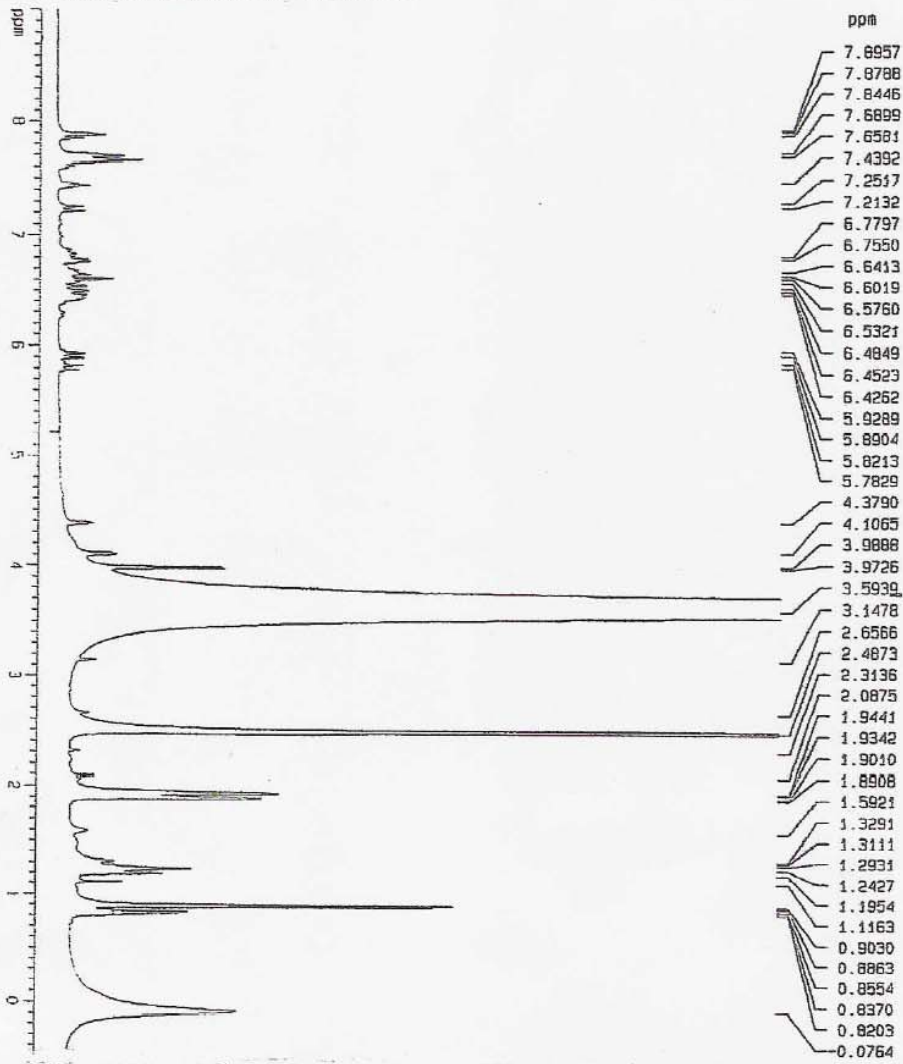


Solvente éter etílico ampliação 400x



Solvente etanol ampliação 400x

ANEXO C
ESPECTRO DE RMN DA CIS BIXINA



Current Data Parameters
NAME Bixina-cis
EXPNO 1
PROCNO 1

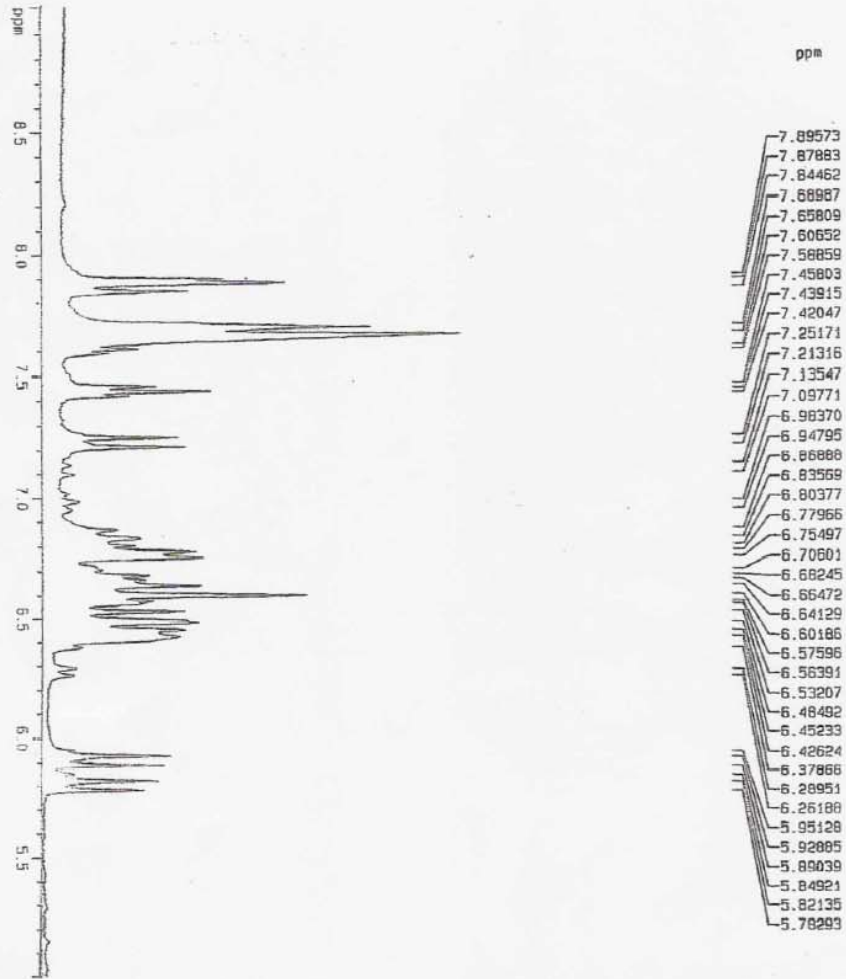
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20050203
Time 9.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Nal11 Inv1
PULPROG zg30
TD 65536
FID SOLVENT DMSO
AQ 56
RG 2
SIH 6250.825 Hz
FIDRES 0.126998 Hz
AQ 3.9715316 sec
RG 45.3
OH 60.000 usec
DE 5.00 usec
TE 303.4 K
D1 1.00000000 sec
ICREST 0.00000000 sec
KCMR 0.01500000 sec

NAME CHANNEL f1 ventanaviva
NUC1 1H
P1 7.00 usec
PL1 -2.00 dB
SFO1 400.1326988 MHz

IF2 - Processing parameters
SI 32766
SF 400.1326988 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ID NMR pilot parameters
CX 20.00 cm
CY 600.00 cm
F1P 9.000 ppm
F1 3801.17 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -200.005 Hz
PPHCH 0.47500 ppm/cm
HZCN 199.06175 Hz/cm

- 7.8957
- 7.8788
- 7.6446
- 7.6899
- 7.6581
- 7.4392
- 7.2517
- 7.2132
- 6.7797
- 6.7550
- 6.6413
- 6.6019
- 6.5760
- 6.5321
- 6.4849
- 6.4523
- 6.4262
- 5.9289
- 5.8904
- 5.8213
- 5.7829
- 4.3790
- 4.1065
- 3.9888
- 3.9726
- 3.5939
- 3.1478
- 2.6566
- 2.4873
- 2.3136
- 2.0875
- 1.9441
- 1.9342
- 1.9010
- 1.8908
- 1.5921
- 1.3291
- 1.3111
- 1.2931
- 1.2427
- 1.1954
- 1.1163
- 0.9030
- 0.8863
- 0.8554
- 0.8370
- 0.8203
- 0.0764



Current Data Parameters
NAME D:\ms-c15
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20050203
Time 5.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm HLL1inc1
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 56
DS 2
SWH 8230.425 Hz
FIDRES 0.122688 Hz
AQ 3.5715316 sec
RG 45.3
DE 60.600 uvert
TE 303.4 K
O1 1.00000000 dec
RGRES 0.00000000 sec
HCHRES 0.01500000 sec

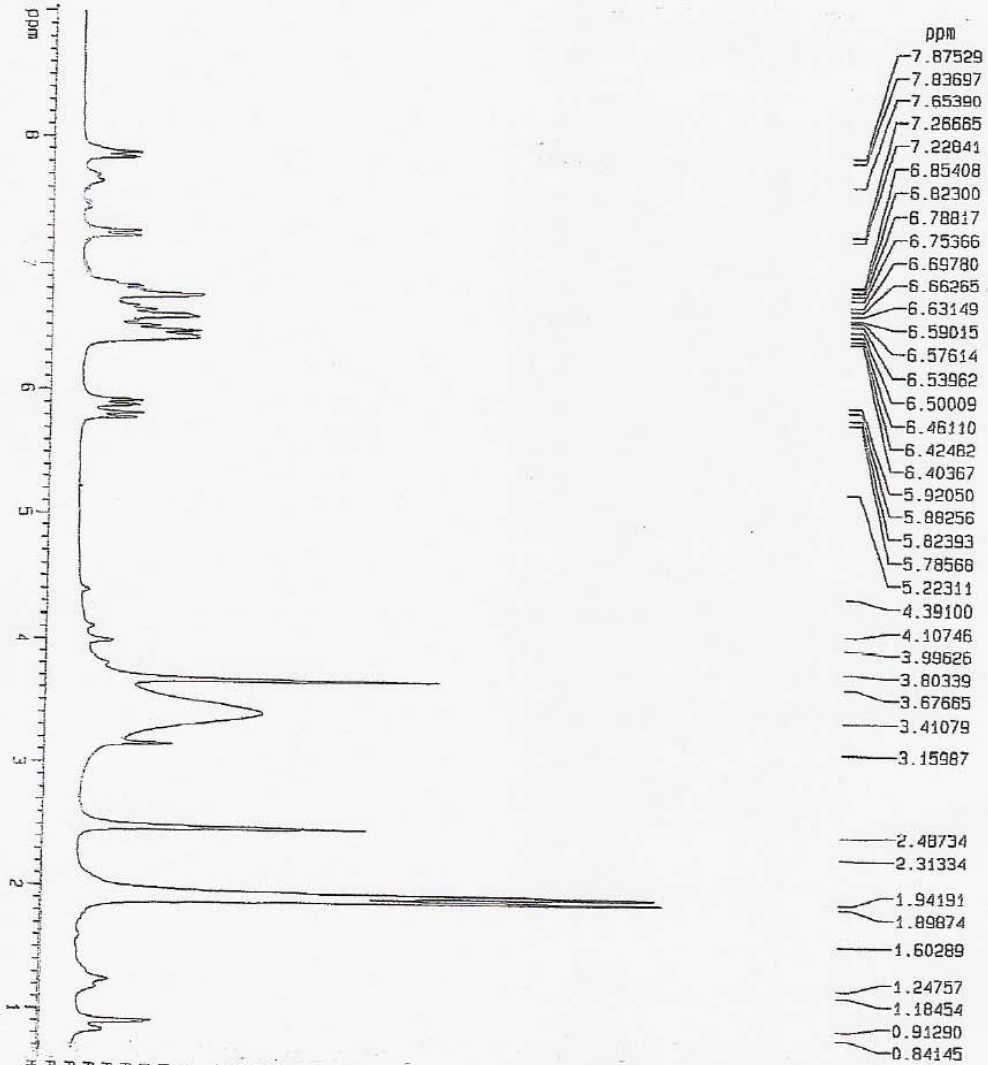
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 uvert
PL1 -2.00 dB
SFO1 400.1320000 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LG 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

10 MHz plot parameters
CX 20.00 cm
CY 4000.00 cm
FIP 9.000 MHz
F1 3601.17 Hz
FPP 5.000 MHz
F2 2810.65 Hz
FREQHZ 0.281065 MHz/cm
HZCM 50.120000 Hz/cm

ANEXO D

ESPECTRO DE RMN DA CIS BIXINA



- 7.87529
- 7.83697
- 7.65390
- 7.26665
- 7.22841
- 6.85408
- 6.82300
- 6.78817
- 6.75366
- 6.69780
- 6.66265
- 6.63149
- 6.59015
- 6.57614
- 6.53962
- 6.50009
- 6.46110
- 6.42482
- 6.40367
- 5.92050
- 5.88256
- 5.82393
- 5.78566
- 5.22311
- 4.39100
- 4.10746
- 3.99626
- 3.80339
- 3.67665
- 3.41079
- 3.15987
- 2.48734
- 2.31334
- 1.94191
- 1.89674
- 1.60289
- 1.24757
- 1.18454
- 0.91290
- 0.84145

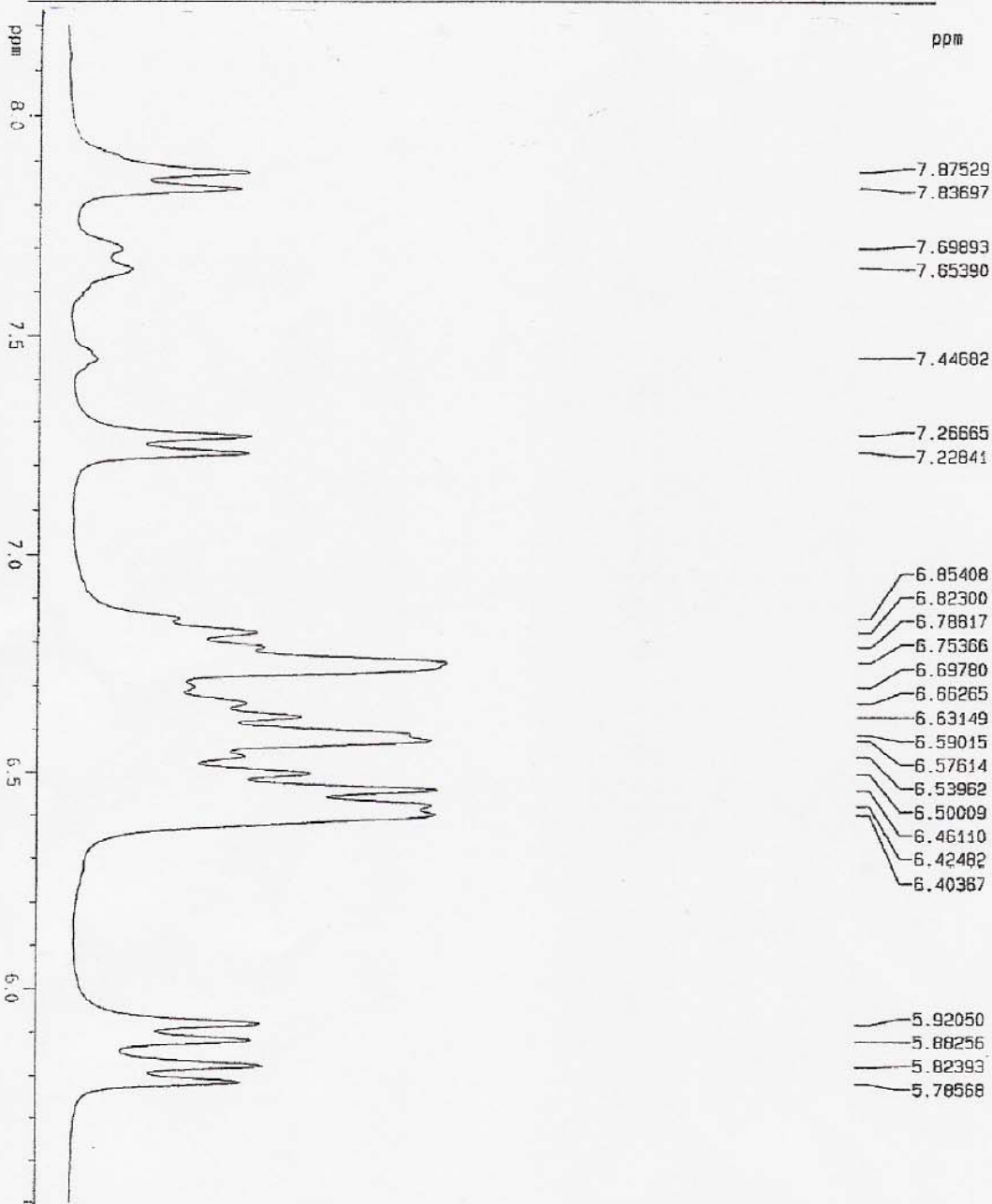
Current Data Parameters
 NAME Bixina-trans
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20050202
 Time 18.54
 INSTRUM spect
 PROBRD 5 mm Multic1
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 13
 DS 2
 SWH 6350.825 Hz
 FIDRES 0.126988 Hz
 AQ 3.9715316 sec
 RG 50.9
 DW 60.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 303.2 K
 D1 1.00000000 sec
 MDEPRST 0.00000000 sec
 MCHNK 0.01500000 sec

NAME CHANNEL 11 structure
 NUC1 1H
 P1 7.50 usec
 PL1 -2.00 dB
 SFO1 400.1320988 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 400.1300889 MHz
 HDW EN
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

10 MHz plot parameters
 CX 20.00 cm
 CY 10.00 cm
 FIP 9.000 ppm
 F1 1601.17 Hz
 F2P -0.050 ppm
 F2 -20.01 Hz
 PPKCH 0.45920 ppm/Hz
 ZCH 181.03987 Hz/Hz



Current Data Parameters
 NAME Bixina-trans
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20050202
 Time 16.54

INSTRUM spect
 PROBRD 5 mm Multinuc1
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 13
 DS 2

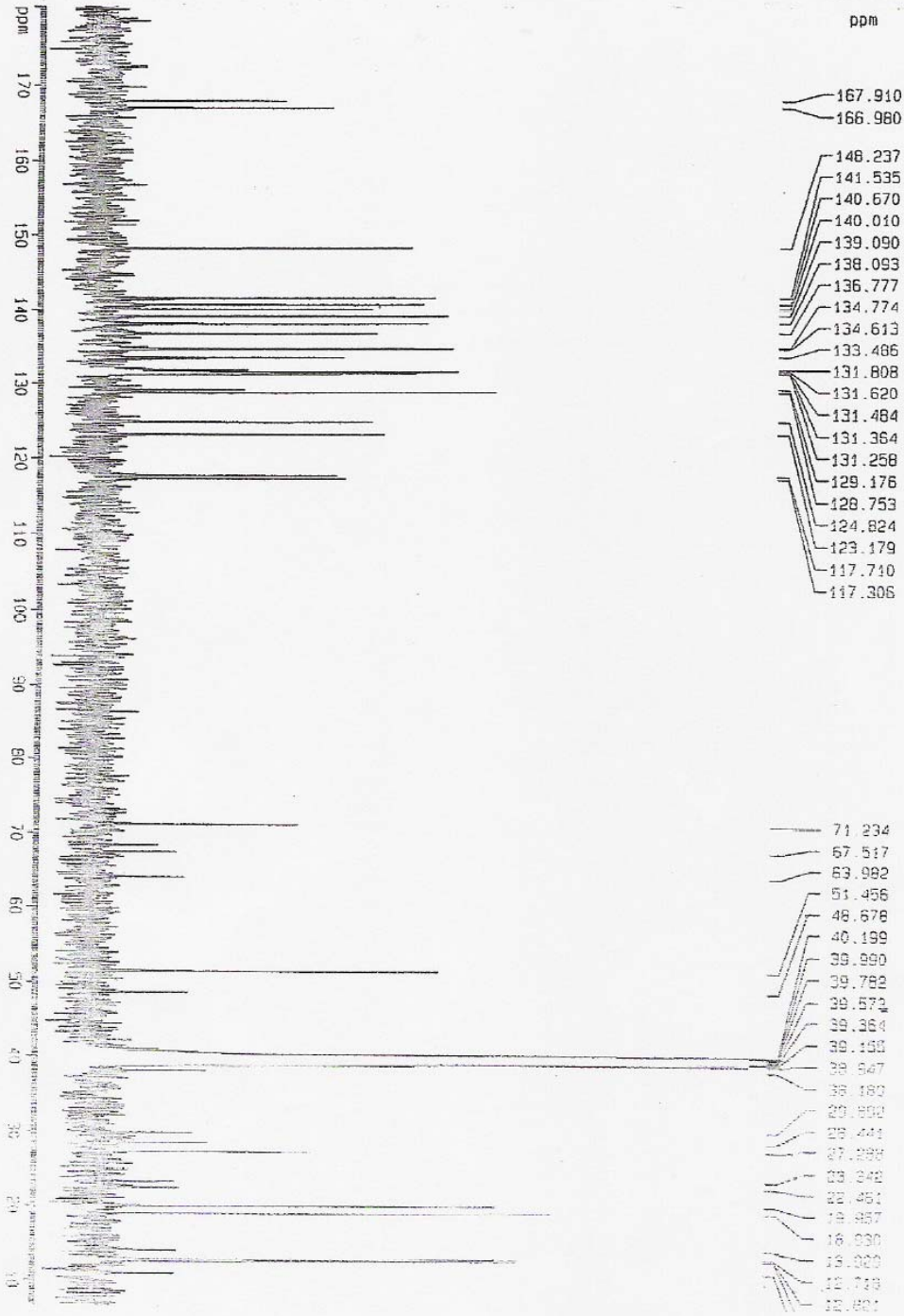
SWH 8250.825 Hz
 FIDRES 0.125893 Hz
 AQ 3.9715916 sec
 RG 50.8
 DW 60.600 usec
 DE 6.400 usec
 TE 303.3 K

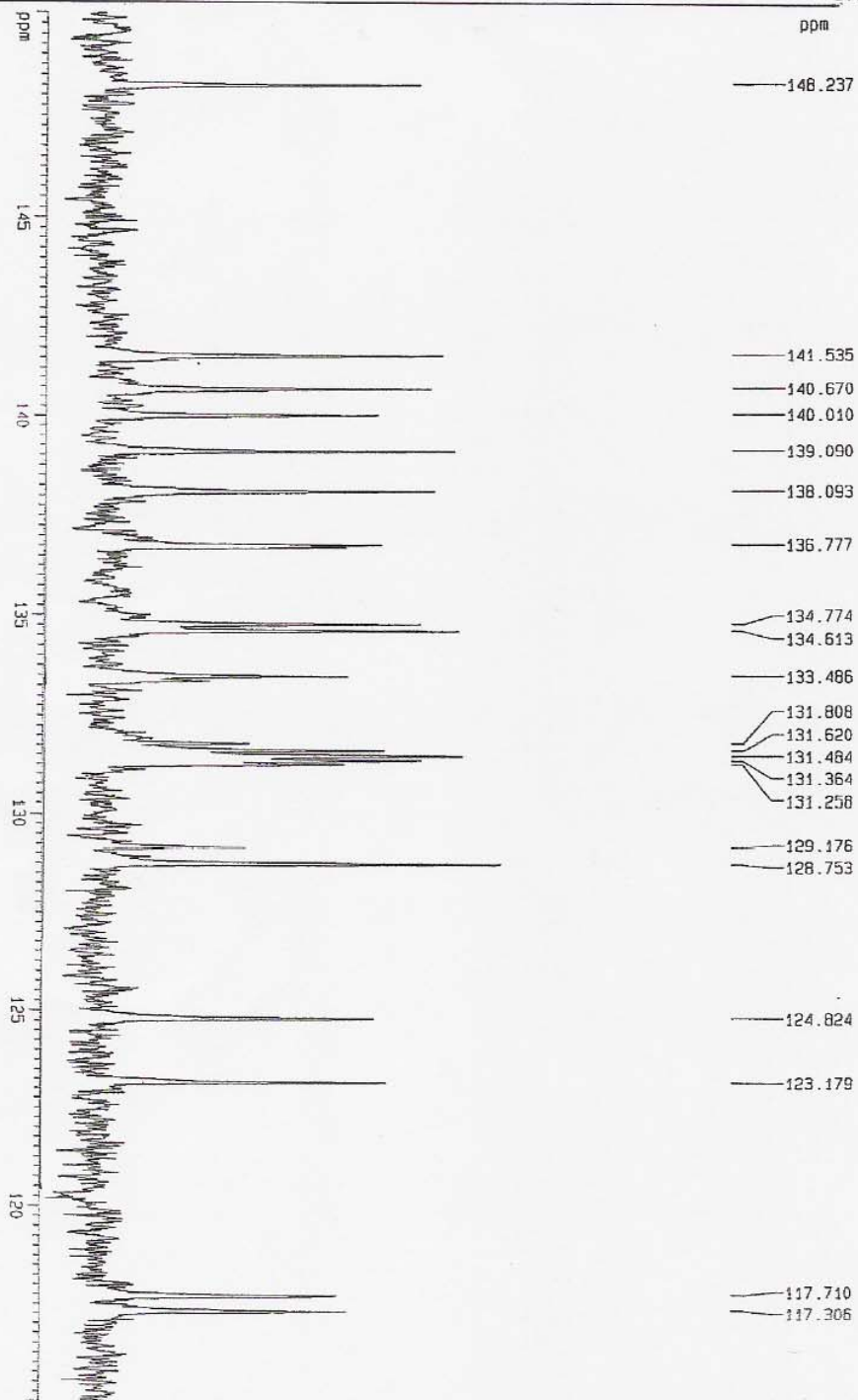
DT 1.000000000 sec
 NUCREST 0.000000000 sec
 MCOMRK 0.015000000 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 1H
 P1 7.60 usec
 PL1 -2.00 dB
 SFO1 400.1320989 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32789
 SF 400.1300989 MHz
 MDW FM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ID NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 CY 30.00 cm
 F1P 8.200 ppm
 F1 3281.07 Hz
 F2P 5.500 ppm
 F2 2200.72 Hz
 PPMCM 0.13500 ppm/cm
 HZCM 54.01756 Hz/cm

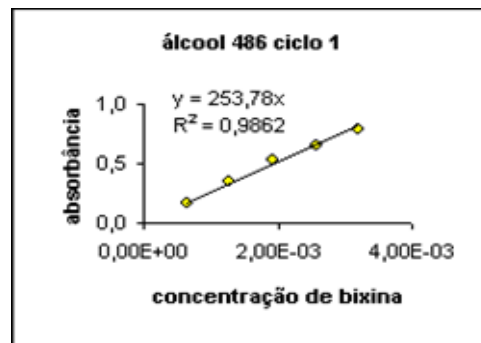




ANEXO E - COEFICIENTE de absorvidade de bixina em solução alcoólica

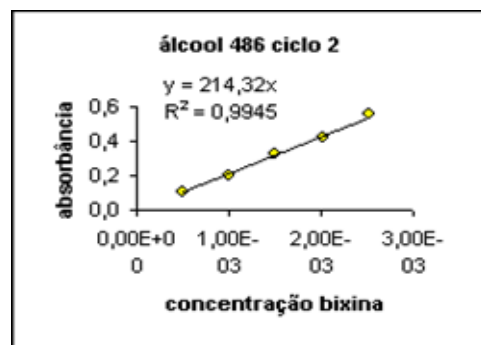
Primeiro ciclo				
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)	Abs	
0,02	3,21E-01	6,43E-04	0,162	
0,04	3,21E-01	1,29E-03	0,348	
0,06	3,21E-01	1,93E-03	0,530	
0,08	3,21E-01	2,57E-03	0,655	
0,1	3,21E-01	3,21E-03	0,781	

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



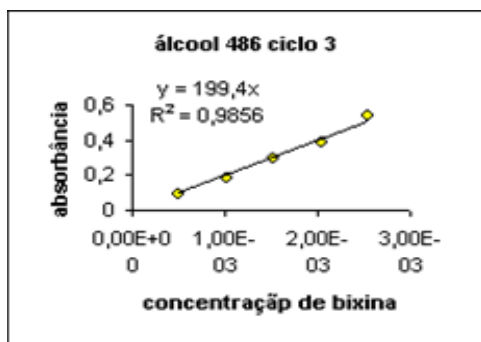
Segundo ciclo				
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)	Abs	
0,02	2,52E-01	5,03E-04	0,104	
0,04	2,52E-01	1,01E-03	0,200	
0,06	2,52E-01	1,51E-03	0,325	
0,08	2,52E-01	2,01E-03	0,419	
0,1	2,52E-01	2,52E-03	0,556	

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



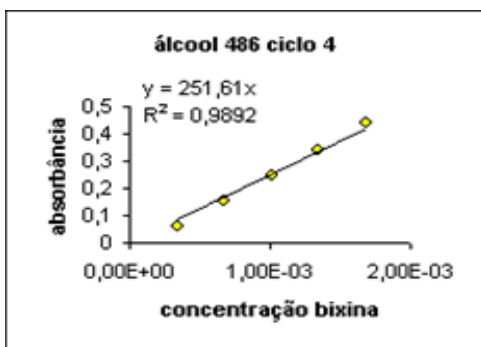
Terceiro ciclo				
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)	Abs	
0,02	2,54E-01	5,09E-04	0,095	
0,04	2,54E-01	1,02E-03	0,187	
0,06	2,54E-01	1,53E-03	0,295	
0,08	2,54E-01	2,03E-03	0,385	
0,1	2,54E-01	2,54E-03	0,537	

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



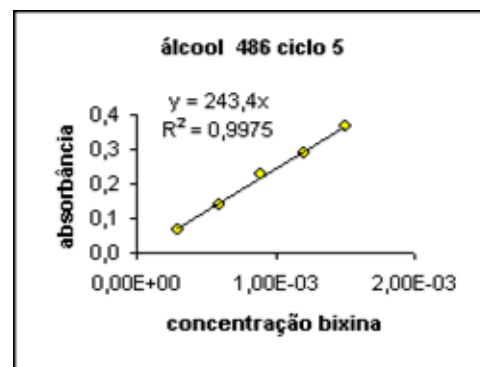
Quarto ciclo				
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)	Abs	
0,02	1,68E-01	3,36E-04	0,062	
0,04	1,68E-01	6,72E-04	0,156	
0,06	1,68E-01	1,01E-03	0,246	
0,08	1,68E-01	1,34E-03	0,339	
0,1	1,68E-01	1,68E-03	0,437	

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



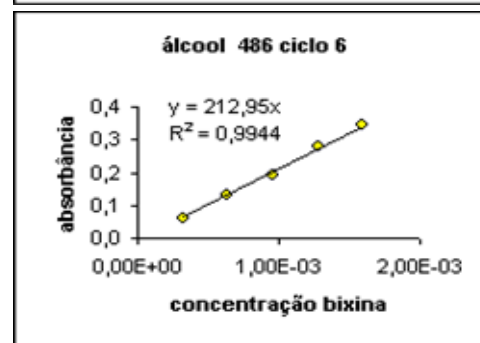
Quinto ciclo				Abs
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)		
0,02	1,50E-01	3,00E-04		0,067
0,04	1,50E-01	6,00E-04		0,139
0,06	1,50E-01	8,99E-04		0,226
0,08	1,50E-01	1,20E-03		0,290
0,1	1,50E-01	1,50E-03		0,366

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



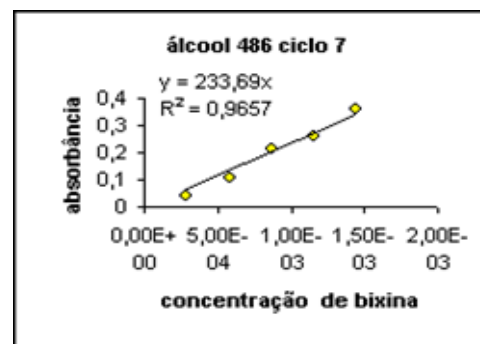
Sexto ciclo				Abs
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)		
0,02	1,59E-01	3,19E-04		0,061
0,04	1,59E-01	6,38E-04		0,130
0,06	1,59E-01	9,56E-04		0,192
0,08	1,59E-01	1,28E-03		0,278
0,1	1,59E-01	1,59E-03		0,345

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



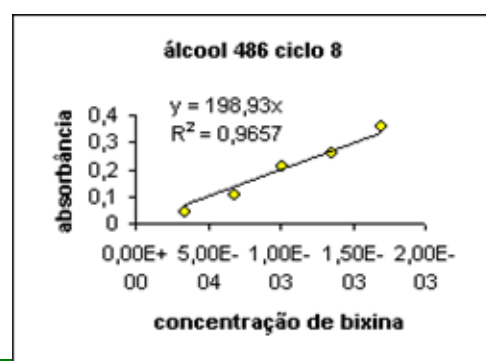
Sétimo ciclo				Abs
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)		
0,02	1,45E-01	2,89E-04		0,039
0,04	1,45E-01	5,78E-04		0,106
0,06	1,45E-01	8,68E-04		0,211
0,08	1,45E-01	1,16E-03		0,262
0,1	1,45E-01	1,45E-03		0,357

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



Oitavo ciclo				Abs
Vol.alíquota (mL)	Conc.matriz (mg/mL)	* conc. Final (mg/mL)		
0,02	1,70E-01	3,40E-04		0,039
0,04	1,70E-01	6,79E-04		0,106
0,06	1,70E-01	1,02E-03		0,211
0,08	1,70E-01	1,36E-03		0,262
0,1	0,1698606	0,001698606		0,357

* Alíquotas finais diluídas para 10 mL



ANEXO F

Valores de absorvância durante monitoramento de hidrólise**Tabela 1** - Absorvância da bixina em soluções de NaOH 0,02N (absorção em 482 nm).

Temperatura 5° C			Temperatura 25 ° C			Temperatura 40 ° C		
Tempo		Abs/Abs max	Tempo		Abs/Abs max	Tempo		Abs/Abs max
horas	Abs.		horas	Abs.		horas	Abs.	
0	0,337	0,54	0	0,244	0,43	0	0,315	0,60
0,18	0,323	0,52	0,10	0,283	0,51	0,17	0,360	0,68
0,35	0,367	0,59	0,23	0,310	0,55	0,33	0,410	0,78
0,52	0,359	0,58	0,43	0,339	0,60	0,52	0,444	0,84
15,60	0,538	0,87	0,60	0,367	0,65	15,58	0,523	0,99
15,78	0,515	0,83	0,77	0,386	0,69	15,80	0,510	0,97
16,00	0,517	0,83	0,93	0,404	0,72	16,02	0,512	0,97
16,18	0,527	0,85	15,83	0,502	0,90	16,75	0,519	0,98
20,67	0,556	0,90	16,03	0,507	0,90	20,65	0,511	0,97
20,97	0,534	0,86	16,23	0,498	0,89	20,95	0,506	0,96
21,35	0,537	0,87	16,45	0,456	0,81	21,00	0,528	1,00
21,40	0,517	0,83	20,92	0,499	0,89	21,40	0,492	0,93
21,73	0,544	0,88	21,17	0,494	0,88	21,47	0,508	0,96
22,62	0,540	0,87	21,63	0,498	0,89	21,75	0,511	0,97
22,68	0,550	0,89	21,92	0,478	0,85	70,00	0,497	0,94
69,98	0,525	0,84	22,00	0,500	0,89	70,17	0,484	0,92
70,15	0,542	0,87	22,17	0,549	0,98	89,67	0,489	0,93
89,65	0,561	0,90	22,82	0,560	1,00	89,92	0,482	0,91
89,90	0,587	0,95	22,87	0,551	0,98	117,53	0,484	0,92
117,57	0,540	0,87	70,22	0,541	0,96	117,67	0,472	0,89
117,73	0,553	0,89	70,47	0,527	0,94	142,08	0,484	0,92
142,15	0,570	0,92	89,88	0,555	0,99	142,25	0,489	0,93
142,25	0,570	0,92	90,13	0,541	0,96	166,75	0,480	0,91
166,73	0,568	0,91	116,88	0,544	0,97	184,50	0,495	0,94
160,40	0,578	0,93	116,97	0,561	1,00	259,42	0,480	0,91
235,40	0,658	1,06	142,38	0,556	0,99	309,75	0,476	0,90
285,73	0,583	0,94	142,55	0,559	1,00			
285,98	0,618	0,99	167,30	0,557	0,99			
309,82	0,587	0,95	184,72	0,558	0,99			
328,48	0,575	0,93	259,63	0,554	0,99			
765,82	0,617	0,99	310,05	0,554	0,99			
765,98	0,621	1,00	310,22	0,555	0,99			
			334,13	0,551	0,98			
			352,80	0,551	0,98			
			790,30	0,544	0,97			
			790,38	0,549	0,98			

Tabela 2 - Absorbância da bixina em soluções de NaOH 0,1N (absorção em 482 nm).

Temperatura 5° C			Temperatura 25 ° C			Temperatura 40 ° C		
Tempo		Abs/Abs max	Tempo		Abs/Abs max	Tempo		Abs/Abs max
horas	Abs.		horas	Abs.		horas	Abs.	
0,00	0,283	0,46	0	0,182	0,32	0	0,332	0,62
0,17	0,313	0,51	0,08	0,242	0,42	0,17	0,381	0,71
0,33	0,341	0,56	0,22	0,275	0,48	0,37	0,424	0,79
0,53	0,353	0,57	0,37	0,325	0,57	0,53	0,458	0,85
46,17	0,530	0,86	0,53	0,360	0,63	46,20	0,519	0,97
46,33	0,532	0,87	0,72	0,389	0,68	46,37	0,537	1,00
46,83	0,536	0,87	46,33	0,564	0,99	46,78	0,532	0,99
66,75	0,557	0,91	46,58	0,531	0,93	66,78	0,526	0,98
67,00	0,556	0,91	47,00	0,566	0,99	66,95	0,530	0,99
90,67	0,555	0,90	66,92	0,569	1,00	93,87	0,513	0,96
90,78	0,558	0,91	67,17	0,557	0,98	93,98	0,518	0,96
118,20	0,556	0,91	94,00	0,561	0,98	118,23	0,511	0,95
118,42	0,547	0,89	94,17	0,554	0,97	118,47	0,519	0,97
143,08	0,570	0,93	118,42	0,551	0,97	143,12	0,522	0,97
143,25	0,574	0,93	118,67	0,556	0,98	143,28	0,516	0,96
160,67	0,596	0,97	143,25	0,570	1,00	160,63	0,530	0,99
160,83	0,575	0,94	143,50	0,568	1,00	160,83	0,526	0,98
235,67	0,593	0,97	160,83	0,566	0,99	235,87	0,516	0,96
286,08	0,578	0,94	161,00	0,566	0,99	238,12	0,509	0,95
286,25	0,561	0,91	236,00	0,553	0,97	286,28	0,505	0,94
309,75	0,614	1,00	286,25	0,553	0,97			
310,08	0,577	0,94	286,42	0,549	0,96			
329,00	0,572	0,93	309,92	0,546	0,96			
765,08	0,577	0,94	310,08	0,546	0,96			
765,25	0,574	0,93	329,17	0,544	0,95			
			765,33	0,505	0,89			
			765,50	0,504	0,88			

Tabela -3 Absorbância da bixina em soluções de NaOH 0,5N (absorção em 482 nm).

Temperatura 5° C			Temperatura 25 ° C			Temperatura 40 ° C		
Tempo		Abs/Abs max	Tempo		Abs/Abs max	Tempo		Abs/Abs max
horas	Abs.		horas	Abs.		horas	Abs.	
0	0,073	0,18	0	0,073	0,18	0,00	0,081	0,18
0,38	0,085	0,21	0,25	0,073	0,18	0,38	0,102	0,22
21,72	0,122	0,30	0,33	0,077	0,19	21,75	0,424	0,93
21,88	0,123	0,30	0,67	0,092	0,23	21,83	0,416	0,91
46,38	0,146	0,36	21,92	0,223	0,56	46,42	0,425	0,93
46,63	0,142	0,35	22,17	0,230	0,57	46,67	0,432	0,94
63,97	0,146	0,36	46,67	0,294	0,73	64,17	0,456	1,00
64,30	0,153	0,38	46,92	0,295	0,74	64,33	0,458	1,00
139,13	0,183	0,45	64,17	0,309	0,77	139,25	0,450	0,98
189,63	0,204	0,50	65,67	0,321	0,80	139,42	0,450	0,98
189,80	0,188	0,46	139,42	0,357	0,89	189,58	0,432	0,94
213,30	0,264	0,65	190,00	0,369	0,92	189,92	0,443	0,97
213,47	0,237	0,58	190,08	0,370	0,92			
232,63	0,230	0,57	213,50	0,373	0,93			
670,63	0,406	1,00	213,83	0,369	0,92			
670,72	0,406	1,00	232,92	0,376	0,94			
			671,00	0,400	1,00			
			671,08	0,401	1			

ANEXO G

Resumo de dados obtidos de colunas preparativas.

Fase móvel	Altura coluna cm ²	Seção coluna cm ²	ρ sílica g/cm ³	Pico 1 VC			Pico 2 VC		
				inicial	centro	final	inicial	centro	final
Acet/hex									
90/10	20,94	0,931	2,51	2,75	3,24	4,16	15,62	16,44	17,28
90/10	20,78	0,931	2,15	1,46	1,18	3,03	15,41	16,25	17,9
90/10	20,92	0,931	3,09	1,22	1,36	2,74	17,36	29,66	31,03
80/20	20,94	0,931	2,18	1,73	1,88	3,89	41,76	42,31	42,94
80/20	17,87	0,292	3,55	1,21	2,0	3,98	45,27	45,66	47,25
70/30	21,12	0,931	2,27	2,11	2,64	3,72	30,85	31,12	31,53
50/50	17,64	0,292	3,49	2,75	6,21	8,86	61,45	62,83	64,59
40/60	20,78	0,931	2,55	3,06	3,64	4,6	18,69	19,83	21,45
30/70	18,14	0,292	3,07	18,28	19,42	20,68	82,2	87,03	89,42

Obs. Corridas conduzidas sem a prévia secagem dos solventes e da sílica.

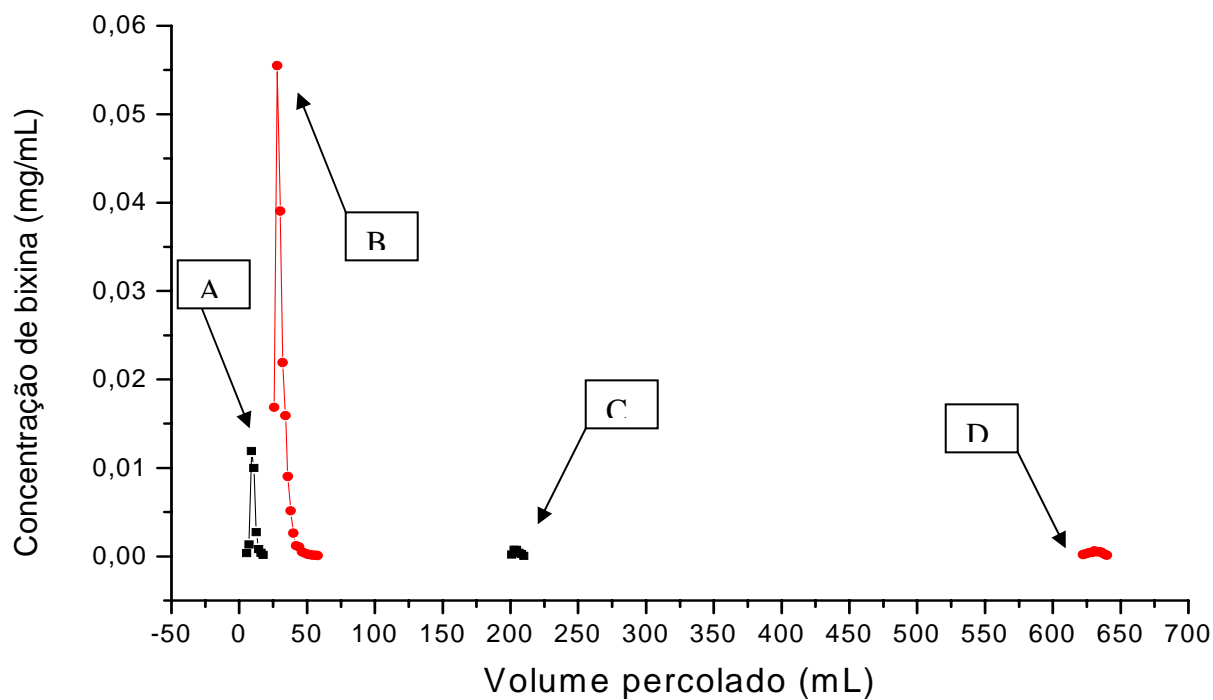
Todas as corridas foram elaboradas sem condicionamento das colunas como também não se procedeu a secagem dos reagentes, em particular o acetato.

Mesmo que, nas corridas com a mesma polaridade, tenha ocorrido variações dos valores dos volumes de coluna, não apenas para experimentos com colunas de diferentes seções, mas também para aqueles com seções de mesma área, ainda assim foram obtidas separações em todas aos experimentos.

Os desvios encontrados estão relacionados à eficiência do empacotamento, ao condicionamento da coluna, secagem dos reagentes entre outros fatores.

ANEXO H

Cromatogramas de duas colunas com diferentes secções

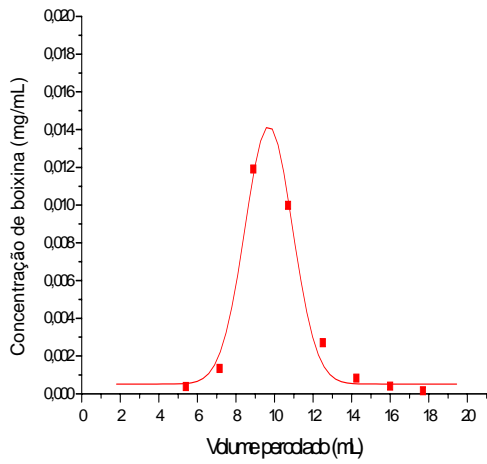


Cromatograma da bixina em coluna flash, mostrando dados de duas colunas com diferentes secções $0,292 \text{ cm}^2$ e $0,913 \text{ cm}^2$.

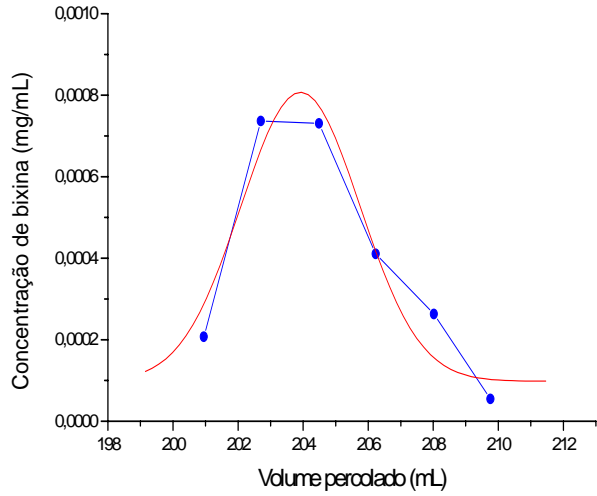
Fase móvel acetato de etila/hexano 80/20

A- Primeiro pico coluna de menor diâmetro ($0,292 \text{ cm}^2$), B primeiro pico na coluna de diâmetro maior ($0,931 \text{ cm}^2$), C- segundo pico na coluna de menor diâmetro e D,- segundo,pico na coluna de diâmetro maior.

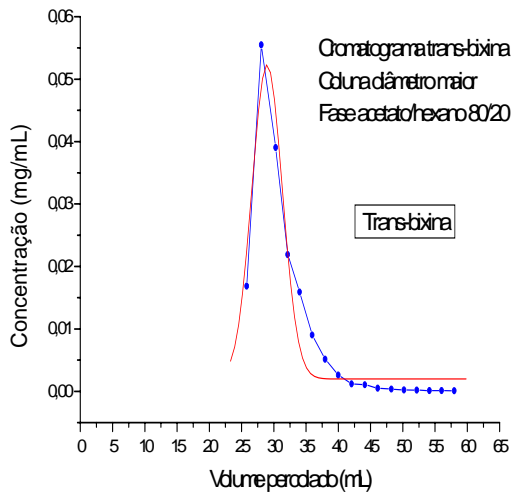
Picos A, B, C e D em ampliados.



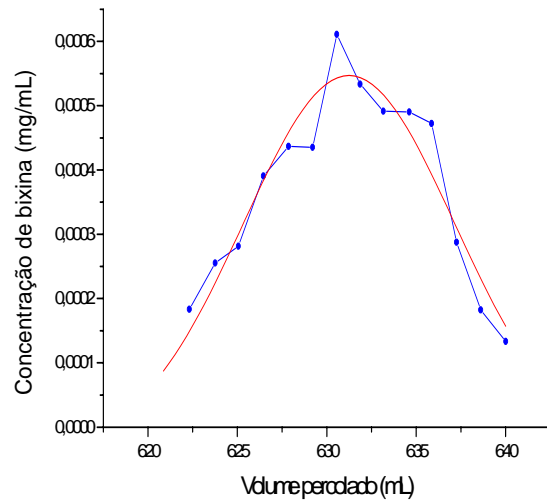
Pico A



Pico C



Pico B



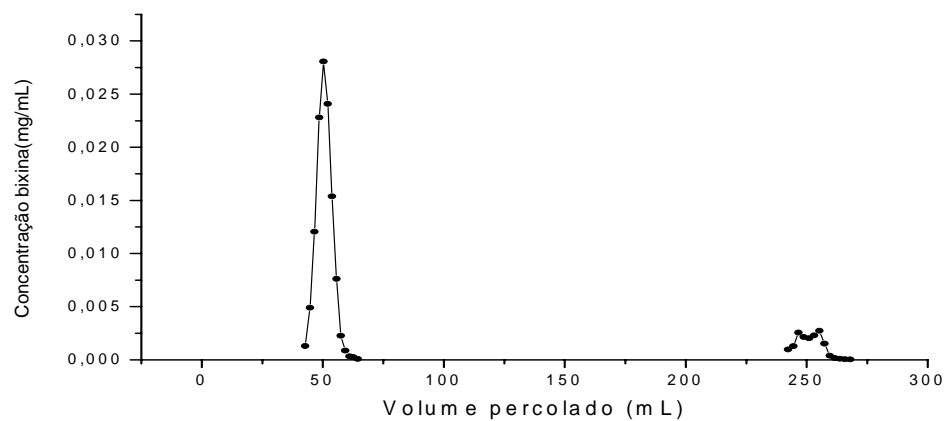
Pico D

ANEXO I

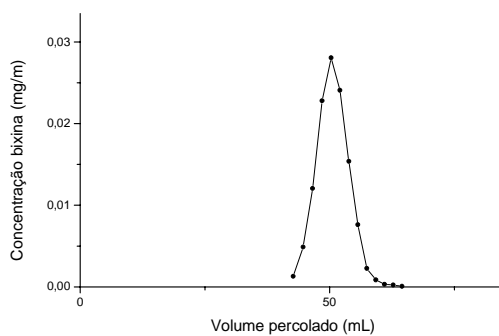
Cromatograma –Pico 2 deformado

Cromatograma de bixina, fase móvel 70/30 acetato de etila/hexano.

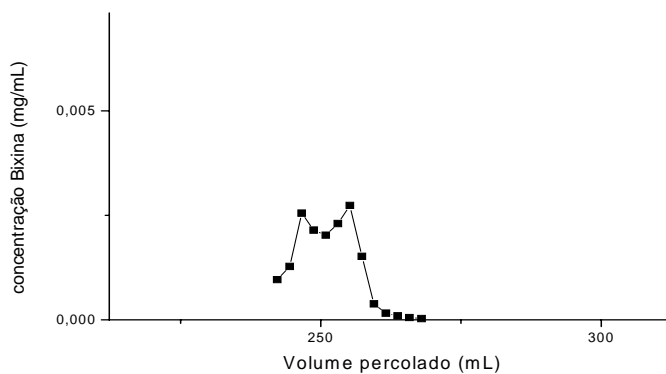
Coluna: sílica gel 60 200-240 mesh.



Cromatograma de bixina, fase móvel 70/30 acetato de etila/hexano,
coluna sílica gel 60 200-240 mesh.



Bixina; primeiro pico, volume percolado até o centro do pico: 50,3 mL.



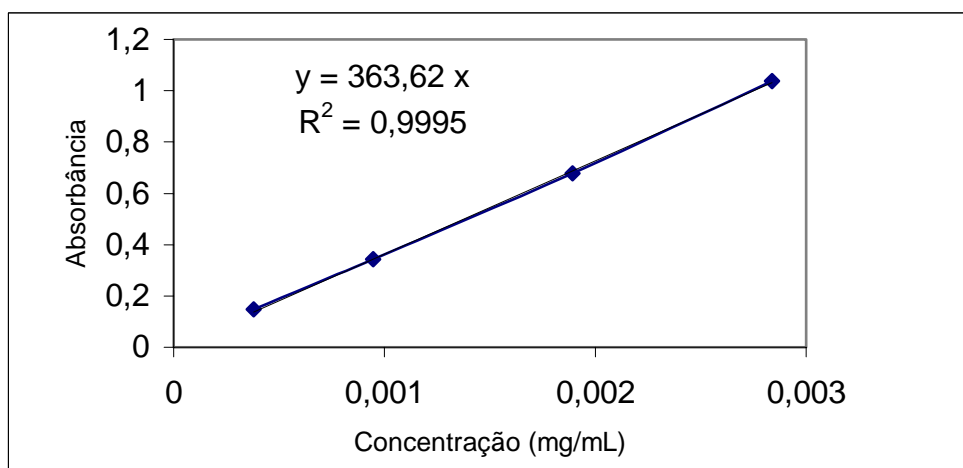
Bixina: segundo pico, volume eluído de 240 a 270 mL

Anexo J										
Planilha de Dados cromatográficos obtidos da coluna flash										
Fase móvel acetato de etila / hexano 90/10 v/v										
A	B	C	D	E	F	G	H			
(cm)	(cm)	(mL)	(cm)	(mL)	(cm)	(mL)	(mL)			
30,620	9,840	18,700	4,305	4,008	20,780	19,346	14,692			
I	J	K	L	M	N	O	P	Q		
(g)	(mL)	(g/cm ³)	(mg)	(mL)	(mL)	486nm	(mg/mL)	(mL)		
10,0003	4,654	2,149	140,300	0,060	10mL	0,818	0,473	0,414		
<p>A- comprimento da coluna de vidro; B- nível de sílica abaixo do topo; C- Hexano adicionado à coluna D- altura do hexano acima do leito; E- volume de hexano (excesso) $= (D * 0,931)$ (área da seção da coluna), F- altura do empacotamento (A-B); G- volume do leito empacotado ($F * 0,931$) H- volume total dos poros (calculado) - VC = (C-E); I- massa de sílica no leito J- volume ocupado pela sílica (G-H); K- densidade da sílica (calculada) = (G-H); L- massa de sílica incorporada à amostra; M- alíquota da matriz de bixina; N- volume de diluição da alíquota O- absorvância da alíquota após diluição; P- Concentração da matriz Q- alíquota da matriz incorporada à sílica (em L) correspondendo à 0,196 mg de bixina</p>										
<p>Massa obtidas da coluna flash</p> <p>pico P1 0,168 mg</p> <p>pico P2 0,015 mg</p> <p>Total 0,183 mg de um total incorpornado de 0,196 mg</p>										
R	S	T	U	V	X1	X2	Y1	Y2	Z1	Z2
1,203	20,780	14,692	0,707	1,701	1,461	15,406	0,945	0,135	1,801	16,2496
a				a	a	a				
1,547				2,188	3,030	17,900				
R	Vazão média até; 1º pico, (fração): 37 ; e até o 2º 170									
S	Altura da coluna empacotada									
T	Volume da coluna (poros)									
U	Volume por unidade de comprimento									
V	Velocidade média do solvente através da coluna: pico 1 e pico 2									
X1	Volume equivalente de coluna (1º pico)									
X2	Volume equivalente de coluna (2º pico)									
Y1	Velocidade de deslocamento do 1º pic (cm/min)									
Y2	Velocidade de deslocamento do 2º pico									
Z1	Volume de coluna centro pico 1									
Z2	Volume de coluna centro pico 2									
Numero de frações: picos 1 e 2:				14	a	37	133	a	170	
Vol. início-fim 1º pico		21,46	44,51							
Vol. início-fim 2º pico		226,34	262,99							
Vol. centro do pico 1		26,46								
Vol. centro do pico 2		238,74								

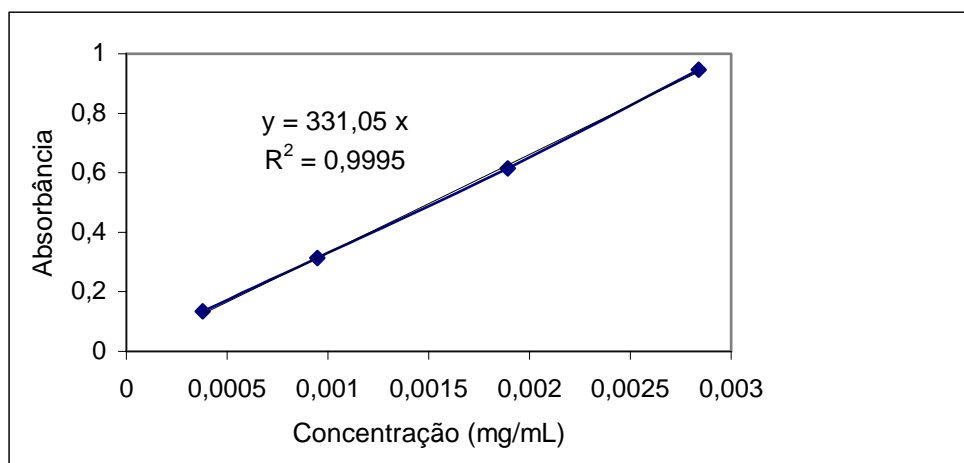
Curva de calibração da bixina em acetato de etila 90/10 v/v

Pontos	Alíquota (mL)	Diluição (mL)	concentração. (mg/mL)	Absorbância	
				486 nm	456 nm
1	0,06	10	0,002838	0,946	1,038
2	0,04	10	0,001892	0,615	0,677
3	0,06	10	0,000946	0,313	0,344
4	0,08	10	0,0003784	0,134	0,147

Coefficiente de absorvidade em 486 nm



Coefficiente de absorvidade em 454 nm



ANEXO J Planilha

Planilha de dados cromatográficos (cromatografia flash)

Fase móvel . Acetato de etila /hexano 90/10 v/v

Fração	Volume			Fator de diluição.	Absorbância	Coefficiente	Massa	
	Coletado (mL)	momento da análise (mL)	integrado (mL)		486nm	de Absortividade 486nm	da fração (g)	integrada (g)
1	1,4		1,4					
2	2,55		3,95					
3	2,5		6,45					
4	2,33		8,78					
5	2,25		11,03					
6	1,75		12,78					
7	1,33		14,11					
8	1,25		15,36					
9	1,1		16,46					
10	1		17,46					
11	1		18,46					
12	1		19,46					
13	1		20,46					
14	1	0,97	21,46	2	0,069	331,05	0,0004	0,0004
15	1	0,97	22,46	4	0,567	331,05	0,00665	0,00704
16	1	0,97	23,46	13,5	0,188	331,05	0,00744	0,01448
17	1	0,95	24,46	7,66	0,978	331,05	0,0215	0,03598
18	1	0,95	25,46	11	0,984	331,05	0,03106	0,06704
19	1	0,95	26,46	26	0,454	331,05	0,03387	0,10091
20	0,95	0,85	27,41	26	0,365	331,05	0,02437	0,12528
21	0,95	0,85	28,36	26	0,242	331,05	0,01616	0,14143
22	0,9	0,85	29,26	26	0,15	331,05	0,01001	0,15145
23	0,95	0,9	30,21	26	0,086	331,05	0,00608	0,15752
24	0,95	0,85	31,16	16	0,084	331,05	0,00345	0,16098
25	0,95	0,85	32,11	7,66	0,112	331,05	0,0022	0,16318
26	0,9	0,85	33,01	3	0,192	331,05	0,00148	0,16466
27	0,95	0,9	33,96	3	0,113	331,05	0,00092	0,16558
28	0,8	0,75	34,76	4	0,057	331,05	0,00052	0,1661
29	0,9	0,8	35,66	4	0,038	331,05	0,00037	0,16646
30	0,8	0,75	36,46	4	0,038	331,05	0,00034	0,16681
31	0,8	0,75	37,26	4	0,032	331,05	0,00029	0,1671
32	1	0,95	38,26	4	0,026	331,05	0,0003	0,1674
33	1,25	1,1	39,51	4	0,02	331,05	0,00027	0,16766
34	1,25	1,1	40,76	2	0,023	331,05	0,00015	0,16781
35	1,25	1,1	42,01	2	0,02	331,05	0,00013	0,16795
36	1,25	1,1	43,26	2	0,026	331,05	0,00017	0,16812
37	1,25	1,1	44,51	2	0,023	331,05	0,00015	0,16827
38	1,25		45,76					
39	1,3		47,06					
40	1,3		48,36					

Da fração 38 a fração 132 não foi detectada bixina

Continuação da página anterior

130	1,55		221,84					
131	1,5		223,34					
132	1,5		224,84					
133	1,5	1,5	226,34	2	0,019	331,05	0,00017	0,00017
134	1,5	1,5	227,84	2	0,022	331,05	0,0002	0,00037
135	1,55	1,55	229,39	2	0,024	331,05	0,00022	0,0006
136	1,35	1,35	230,74	2	0,026	331,05	0,00021	0,00081
137	1,4	1,4	232,14	2	0,024	331,05	0,0002	0,00101
138	1,4	1,4	233,54	1	0,052	331,05	0,00022	0,00123
139	1,3	1,3	234,84	2	0,049	331,05	0,00038	0,00162
140	1,35	1,35	236,19	2	0,046	331,05	0,00038	0,00199
141	1,3	1,3	237,49	2	0,068	331,05	0,00053	0,00253
142	1,25	1,25	238,74	2	0,082	331,05	0,00062	0,00314
143	1,25	1,25	239,99	2	0,071	331,05	0,00054	0,00368
144	1,25	1,25	241,24	2	0,066	331,05	0,0005	0,00418
145	1,2	1,2	242,44	2	0,062	331,05	0,00045	0,00463
146	1,2	1,2	243,64	2	0,063	331,05	0,00046	0,00509
147	1,2	1,2	244,84	2	0,065	331,05	0,00047	0,00556
148	1,2	1,2	246,04	2	0,062	331,05	0,00045	0,00601
149	1,1	1,1	247,14	2	0,077	331,05	0,00051	0,00652
150	1	1	248,14	2	0,08	331,05	0,00048	0,007
151	1	1	249,14	2	0,083	331,05	0,0005	0,0075
152	1	1	250,14	2	0,09	331,05	0,00054	0,00805
153	1	1	251,14	2	0,085	331,05	0,00051	0,00856
154	0,95	0,95	252,09	2	0,064	331,05	0,00037	0,00893
155	0,95	0,95	253,04	2	0,57	331,05	0,00327	0,0122
156	0,9	0,9	253,94	2	0,061	331,05	0,00033	0,01253
157	0,8	0,8	254,74	5	0,019	331,05	0,00023	0,01276
158	0,8	0,8	255,54	5	0,02	331,05	0,00024	0,013
159	0,85	0,85	256,39	5	0,02	331,05	0,00026	0,01326
160	0,8	0,8	257,19	4	0,045	331,05	0,00043	0,01369
161	0,75	0,75	257,94	4	0,024	331,05	0,00022	0,01391
162	0,75	0,75	258,69	4	0,022	331,05	0,0002	0,01411
163	0,75	0,75	259,44	4	0,024	331,05	0,00022	0,01433
164	0,75	0,75	260,19	4	0,025	331,05	0,00023	0,01455
165	0,7	0,7	260,89	4	0,025	331,05	0,00021	0,01477
166	1	1	261,89	4	0,024	331,05	0,00029	0,01506
167	0,4	0,4	262,29	1	0,025	331,05	3E-05	0,01509
168	0,3	0,3	262,59	1	0,016	331,05	1,4E-05	0,0151
169	0,2	0,2	262,79	1	0,012	331,05	7,2E-06	0,01511
170	0,2	0,2	262,99	1	0,008	331,05	4,8E-06	0,01511