

# Estudo da saponificação em pigmentos de urucum

## *Study of saponification reaction in annatto pigments*

Aline Manke NACHTIGALL<sup>1\*</sup>, Pollyanna Ibrahim SILVA<sup>1</sup>,  
Michele Corrêa BERTOLDI<sup>1</sup>, Paulo Cesar STRINGHETA<sup>1</sup>

### Resumo

O trabalho objetivou estudar o efeito de diferentes concentrações de KOH (1, 3 e 5%), tempo (1, 2 e 3 horas) e temperatura de extração (30, 50 e 70 °C) na reação de saponificação da bixina. O progresso da reação foi acompanhado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por colorimetria, e os dados obtidos foram avaliados por análise de regressão. Os teores de bixina e do sal da norbixina foram dependentes da concentração da base utilizada na extração, enquanto o tempo não apresentou efeito no andamento da reação de saponificação. A maior concentração de base propiciou a maior conversão de bixina em sal de norbixina, o que foi confirmado pela avaliação dos parâmetros colorimétricos. Os valores de L\*, b\*, C\* e H\* concordaram com o aumento da concentração do sal de norbixina no meio, ao passo que a redução da coordenada a\* esteve associada à diminuição da bixina que estava sendo convertida em sal de norbixina. Estes resultados podem gerar modificações no atual processo de produção deste pigmento.

**Palavras-chave:** bixina; sal de norbixina; reação de saponificação; CLAE; colorimetria.

### Abstract

This work aimed to evaluate the effect of different concentrations of KOH (1, 3 and 5%), time (1, 2, and 3 hours) and extraction temperature (30, 50 and 70°C) on the saponification reaction of bixin. The reaction progress was monitored by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and by colorimetry, and the data were evaluated by regression analysis. Bixin and norbixin salt contents depended on NaOH concentration, while the extraction time did not present effect on the progress of saponification reaction. The best conversion of bixin to norbixin salt took place with the highest concentration of alkali, which was confirmed by colorimetric analysis. The increase of L\*, b\*, C\*, and H\* values were in agreement with the increase of norbixin salt content, whereas the reduction of a\* was associated to the reduction of bixin content due to the conversion of bixin to norbixin salt. These results could contribute to modify the current production process of this pigment.

**Keywords:** bixin; norbixin salt; saponification reaction; HPLC; colorimetry.

## 1 Introdução

A bixina é o pigmento natural da semente do urucum (*Bixa orellana* L.), representando mais de 80% dos carotenoides presentes. A partir dela, são obtidos os demais pigmentos, como norbixina, sal de norbixina e produtos de degradação térmica (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001; BARETH; STROHMAR; KITZELMANN, 2002; KOUL, KOUL; TIKOO, 2003; BAUTISTA et al., 2004). A bixina ao ser saponificada dá origem a um corante hidrossolúvel constituído pelo sal de norbixina (LIMA et al., 2001). Bixina e norbixina, podem estar presentes em uma extração, tanto na forma *cis* como na *trans* (PRENTICE-HERNANDEZ; RUSIG; CARVALHO, 1993; SCOTTER et al., 1998; SCOTTER; CASTLE; APPLETON, 2001).

O sal da norbixina, como citado anteriormente, é obtido pela extração alcalina dos pigmentos da semente de urucum, a qual pode ser conduzida com hidróxido de sódio ou de potássio (PIMENTEL; STRINGHETA, 1999; KOUL; KOUL; TIKOO, 2003; SHUHAMA, et al. 2003). O derivado desmetilado

da bixina assim obtido é a forma de pigmento normalmente empregada para aplicações em produtos aquosos (PIMENTEL; STRINGHETA, 1999; COSTA; CHAVES, 2005).

A grande demanda dos extratos de urucum com características de elevada qualidade tem acentuado as deficiências dos processos comumente usados para produzir os corantes, incluindo riscos de degradação térmica dos extratos e de oxidação dos pigmentos. Também, as quantidades relativas de bixina e seus produtos de isomerização e de degradação em preparações comerciais de urucum variam dentro de amplos limites, dependendo das condições de processamento (PRENTICE-HERNANDEZ; RUSIG; CARVALHO, 1992). Ainda, de acordo com o solvente e com o pH da extração utilizados, podem coexistir no meio as várias formas dos pigmentos (SILVA, 2007).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho consistiu em estudar a influência de diferentes concentrações do álcali,

Recebido para publicação em 19/2/2008

Aceito para publicação em 3/1/2009 (003230)

<sup>1</sup> Laboratório de Corantes Naturais, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa – UFV, CEP 36570-000, Viçosa – MG, Brasil,

E-mail: anachtigall@gmail.com

\*A quem a correspondência deve ser enviada

do tempo e da temperatura de extração sobre o andamento da reação de saponificação da bixina.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

A matéria-prima utilizada foi a semente do urucum (*Bixa orellana* L.) variedade Embrapa 36/37. As sementes foram colhidas em fevereiro de 2006 em Teixeira de Freitas – BA e foram secas até atingirem o teor de umidade de 9,6%. O teor médio de bixina das sementes, avaliado antes das extrações, foi de 3,4%.

### 2.2 Métodos

#### Extração dos pigmentos

Para a extração dos pigmentos de urucum, foram pesadas cerca de 10 g de sementes de urucum e adicionados 60 mL do solvente extrator. Após a adição do solvente, as amostras foram submetidas à extração sob agitação constante (108 rpm), com o auxílio de um banho de água com agitação e controle de temperatura (Nova Ética, modelo 304/D, São Paulo, Brasil).

O solvente extrator empregado foi o hidróxido de potássio, nas concentrações de 1, 3 e 5%. Para cada concentração, as temperaturas avaliadas foram: 30, 50 e 70 °C. Para cada temperatura, as extrações foram realizadas durante 1, 2 e 3 horas. As condições extratoras foram selecionadas com base em Pimentel (1995) e Silva (2007) e em procedimentos usuais de extração industrial de pigmentos de urucum. As extrações, em cada condição de concentração, temperatura e tempo foram realizadas em triplicata.

Após as extrações, os extratos foram diluídos 125 vezes em uma mistura água:álcool 92,8% (2:1), sendo esta diluição definida em testes preliminares.

#### Quantificação dos pigmentos

Para a técnica de CLAE, a fase móvel selecionada foi a mistura acetonitrila: ácido acético 5% (75:25), com base em Bareth; Strohmar; Kitzelmann (2002). Foi utilizado cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, modelo LC-10 AD VP (Kyoto, Japan), detector UV-Visível e integrador-processador Shimadzu SCL-10A VP, com duas bombas e sistema manual de injeção. As amostras, após diluídas de acordo com o item 2.2.1, foram todas filtradas em membrana Milipore® de nylon, com diâmetro de poro de 0,2 µm, e injetadas no sistema CLAE.

Utilizou-se coluna de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (25 cm × 4,0 mm; 5 µm) marca Merck (Darmstadt, Germany) protegida por uma pré-coluna CLC G-ODS, da marca Shimadzu (Kyoto, Japan). A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e os espectros foram adquiridos no comprimento de onda de 460 nm. O volume de amostra injetado foi de 50 µL.

Os pigmentos de urucum foram identificados e quantificados por CLAE, utilizando-se o método do padrão externo. Os padrões de bixina (97,8%) e norbixina (91,3%) foram preparados

em laboratório, a partir de sementes de urucum, com base na metodologia adaptada de Tocchini e Mercadante (2001) e atingindo graus de pureza semelhantes. As curvas analíticas (área *versus* concentração) para bixina e norbixina foram obtidas através da análise de soluções dos padrões com concentrações de 50 a 500 mg.L<sup>-1</sup> nas mesmas condições de análise das amostras, obtendo-se coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,986 e 0,981, respectivamente. As análises das amostras foram realizadas em três repetições.

#### Análise colorimétrica dos extratos

Os extratos foram caracterizados pela leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares “L\*” (luminosidade), “a\*” (intensidade de vermelho e verde) e “b\*” (intensidade de amarelo e azul), empregando-se a escala de cor CIELAB, com iluminante D65 e ângulo de observação de 10°, utilizando-se colorímetro Hunter Lab, modelo Colorquest XE (Reston, USA).

Os valores de C\* (saturação de cor) e H\* (ângulo de tonalidade) foram calculados a partir dos dados de a\* e b\*, de acordo com as Equações 1 e 2.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

$$H^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (2)$$

#### Análises estatísticas

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento fatorial completo 3<sup>3</sup>, com três repetições. Avaliou-se o efeito da concentração de KOH (1, 3 e 5%), da temperatura de extração (30, 50 e 70 °C) e do tempo de extração (1, 2 e 3 h) sobre o rendimento de bixina e norbixina, e as variáveis colorimétricas L\*, a\* e b\*, C\* e H\* (variáveis dependentes). Os dados obtidos foram analisados por regressão e ajustados ao polinômio mostrado na Equação 3:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \text{CO} + \beta_2 \text{TE} + \beta_3 \text{TA} + \beta_{11} \text{CO}^* \text{CO} + \beta_{22} \text{TE}^* \text{TE} + \beta_{33} \text{TA}^* \text{TA} + \beta_{12} \text{CO}^* \text{TE} + \beta_{13} \text{CO}^* \text{TA} + \beta_{23} \text{TA}^* \text{TE} \quad (3)$$

em que:

- $\beta_n$ : coeficientes de regressão;
- Y: variável dependente analisada (teor de bixina, teor do sal de norbixina e variáveis colorimétricas L\*, a\*, b\*, C\* e H\*); e
- CO, TE e TA: variáveis independentes – concentração de KOH, tempo e temperatura de extração, respectivamente.

Para o cálculo da análise de variância ( $p \leq 0,05$ ) dos coeficientes de regressão, dos coeficientes de correlação do modelo e dos gráficos tridimensionais, utilizou-se o programa estatístico SAS for Windows V8 (Cary, USA).

## 3 Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão apresentados os coeficientes do modelo de regressão, os coeficientes de variação e de determinação do

modelo para cada variável resposta, obtidos a partir dos dados experimentais.

Os coeficientes de variação para o rendimento de bixina (37,15%) e do sal de norbixina (52,28%) foram elevados. Isto pode ser atribuído possivelmente à formação de outros compostos como produtos de degradação, em razão do uso de aquecimento durante o processo de extração. De fato, a hidrólise alcalina do grupamento éster metílico da bixina leva à formação de pigmentos como a norbixina (lipossolúvel), o sal da norbixina (hidrossolúvel) e vários produtos de degradação térmica, que têm como características a lipossolubilidade e uma coloração amarela mais estável (PRESTON; RICKARD, 1980; SCOTTER, 1995; SCOTTER; CASTLE; APPLETON, 2001).

Distintos procedimentos de extração podem levar à formação de diferentes perfis de isômeros pelo efeito de luz e oxigênio durante a extração e a manipulação, o que pode explicar os elevados coeficientes de variação. A degradação térmica da 9'-*cis*-bixina apresenta-se termodinamicamente favorável. Entretanto, esta degradação é complicada pelas inúmeras reações de isomerização competitivas que podem ocorrer, a diferentes velocidades em direção ao equilíbrio, além da simultânea e irreversível formação dos compostos de degradação de 17 carbonos (SCOTTER et al., 1998; SCOTTER; CASTLE; APPLETON, 2001).

O tempo de extração não apresentou efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) em nenhuma das variáveis analisadas, exceto em  $H^*$ . Assim, do ponto de vista tecnológico, seria conveniente a redução do tempo de extração dos pigmentos de urucum, o que implicaria na diminuição dos gastos com energia e produção de efluentes, além do aumento da eficiência do processo. Silva (2007) também não observou efeito do tempo no rendimento de extração do pigmento ao utilizar soluções de KOH de 0,6 a 5%.

Os efeitos lineares da concentração de KOH e da temperatura de extração influenciaram significativamente as respostas de todas as variáveis. Pela observação da intensidade dos efeitos (coeficientes da regressão), verificou-se maior influência dos efeitos lineares nas variáveis dependentes que dos efeitos quadrático e de interação. A concentração de KOH foi o fator que mais influenciou a variação das respostas analisadas, apresentando um efeito positivo no rendimento do sal da norbixina e parâmetros  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $H^*$ , e negativo no rendimento de bixina e parâmetro  $a^*$ . Observou-se que o efeito quadrático da concentração da base influenciou significativamente todas as variáveis dependentes, exceto o parâmetro colorimétrico  $a^*$ . Apesar de significativos para alguns parâmetros ( $L^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$ ), os efeitos quadráticos da temperatura e da interação exerceram pouca influência sobre as variáveis (Tabela 1). Os diagramas de superfície apresentados nas Figuras 1 e 2, elaborados a partir do modelo de regressão, estabelecem a variação do teor de bixina e do sal de norbixina em função da concentração da base (KOH) e da temperatura, respectivamente.

A concentração de bixina diminuiu com o aumento da concentração da base e com o aumento da temperatura de extração, sendo o efeito da concentração o mais intenso (Figura 1). Efeito contrário, e coerente, pode ser observado para o rendimento do sal de norbixina, uma vez que ela é derivada da conversão da bixina durante o processo de saponificação. Também se observou uma ligeira queda no rendimento da formação do sal de norbixina a partir de uma determinada concentração da base, para uma temperatura de extração fixa, o que pode estar associado a uma possível degradação do pigmento em função do excesso de KOH no meio (Figura 2).

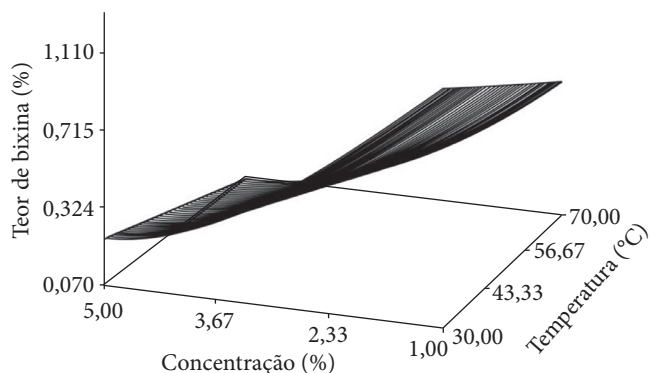
Este fato confirma o observado por Silva (2007) em que a reação de saponificação da bixina em norbixina ocorreu em valores de pH acima de 10 e foi dependente, em grande parte, da concentração da base utilizada e do tipo de base e, em menor extensão, do tempo e da temperatura de extração.

**Tabela 1.** Coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) das variáveis independentes.

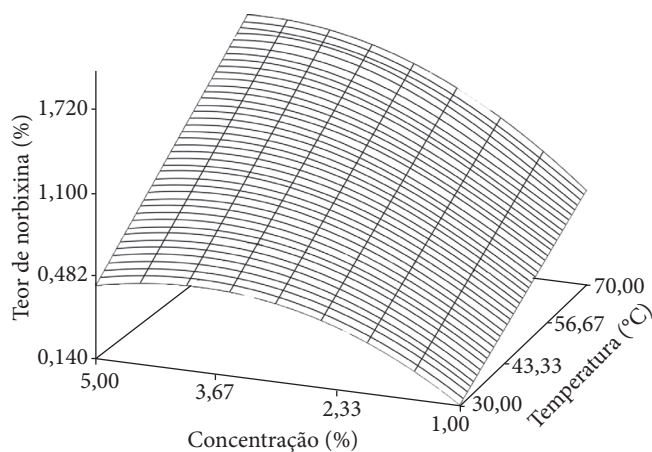
Coeficientes	( $p \leq 0,05$ )	TBIX	TNORBIX	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$H^*$
Linear	$\beta_0$	1,941	-1,084	44,98	25,81	28,41	35,92	53,06
	$\beta_1$	-0,532	0,472	3,436	-1,546	6,991	5,773	5,729
	$\beta_2$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,965
	$\beta_3$	-0,013	0,015	0,206	-0,071	0,412	0,356	0,085
Quadrático	$\beta_{11}$	0,043	-0,074	-0,250	ns	0,480	-0,364	-0,413
	$\beta_{22}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	$\beta_{33}$	ns	ns	-0,001	ns	-0,003	-0,003	ns
Interação	$\beta_{12}$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,425
	$\beta_{13}$	ns	ns	ns	ns	ns	0,034	ns
	$\beta_{23}$	0,001	0,004	-0,013	ns	0,031	ns	ns
R2		86,80	69,21	79,58	57,95	85,04	82,83	74,21
CV (%)		37,15	52,28	2,080	13,65	3,690	2,850	3,710

ns: não significativo a 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ).

TBIX = Teor de bixina (%); TNORBIX = Teor do sal de norbixina (%);  $L^*$  = Luminosidade;  $a^*$  = coordenada colorimétrica com intensidade variável em vermelho e verde;  $b^*$  = coordenada colorimétrica com intensidade variável em amarelo e azul;  $C^*$  = saturação de cor;  $H^*$  = ângulo de tonalidade.



**Figura 1.** Variação do teor de bixina (%) em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).



**Figura 2.** Variação do teor do sal de norbixina (%) em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).

Em geral, quanto mais concentrada a base, mais completa será a conversão da bixina em norbixina e seu sal. Tempos de extração mais prolongados podem proporcionar maior conversão da bixina em norbixina, porém podem também ocasionar degradação de compostos. Quando temperaturas mais elevadas são utilizadas, há um aumento no rendimento de extração dos pigmentos, porém com pouco incremento na reação de hidrólise da bixina em norbixina. De acordo com Silva (2007), o que se nota de forma marcante é a isomerização *cis-trans* da bixina e da norbixina, sendo as configurações *trans* destas moléculas consideradas mais estáveis.

Prentice-Hernandez; Rusig; Carvalho (1992) observaram, ao empregar NaOH, que a saponificação da bixina começa a ocorrer a partir de uma concentração de base de 0,4% e acima desta concentração ocorre isomerização da *cis*-bixina para sua forma *trans*.

As alterações sofridas pelos pigmentos ao longo do processo de extração implicaram em alterações na coloração dos extratos.

Estas podem ser confirmadas pelas alterações dos parâmetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $H^*$  em função da concentração da base e da temperatura de extração, bem como as mudanças verificadas em  $H^*$  em função da concentração da base e do tempo de extração, conforme apresentado nas Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

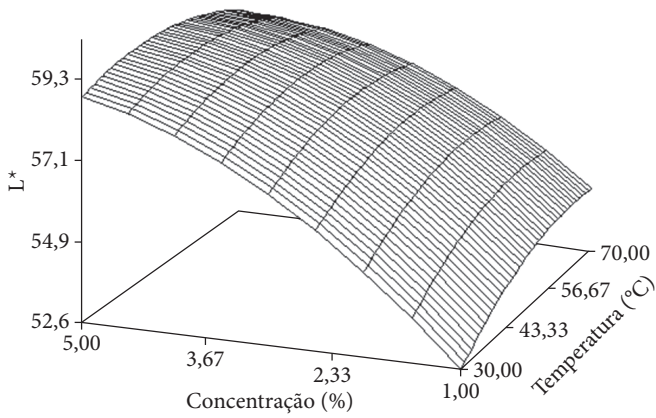
Os parâmetros colorimétricos  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $H^*$  aumentaram com a elevação da temperatura de extração e da concentração da base (Figuras 3, 5, 6 e 8). Isso indica um aumento na luminosidade e na intensidade da cor amarela do extrato, concordando com a elevação da concentração do sal de norbixina (Figura 2). Foi verificada, também, a elevação de  $H^*$  proporcional ao aumento no tempo de extração (Figura 7). Em contrapartida, percebeu-se uma diminuição da intensidade da coloração vermelha ( $a^*$ ), em função das maiores concentrações da base e das temperaturas mais elevadas (Figura 4), concordando com a redução do teor de bixina no meio (Figura 1).

Cardarelli; Benassi; Mercadante (2007) correlacionaram, por meio de análise multivariada, o teor de bixina obtida por diferentes solventes orgânicos e as coordenadas colorimétricas de seus extratos. Os autores encontraram correlação positiva entre o teor de bixina e a coordenada  $a^*$  ( $r = 0,930$ ) e negativa com  $b^*$  ( $r = -0,80$ ) e  $L^*$  ( $r = -0,84$ ). Esta relação também foi verificada no presente trabalho, em que o teor de bixina correlacionou-se positivamente com  $a^*$  ( $r = 0,80$ ) e negativamente com  $b^*$  ( $r = -0,90$ ),  $L^*$  ( $r = -0,88$ ),  $C^*$  ( $r = -0,85$ ) e  $H^*$  ( $r = -0,87$ ). Em contrapartida, o teor do sal de norbixina apresentou correlação negativa com  $a^*$  ( $r = -0,81$ ) e positiva com  $H^*$  ( $r = 0,80$ ).

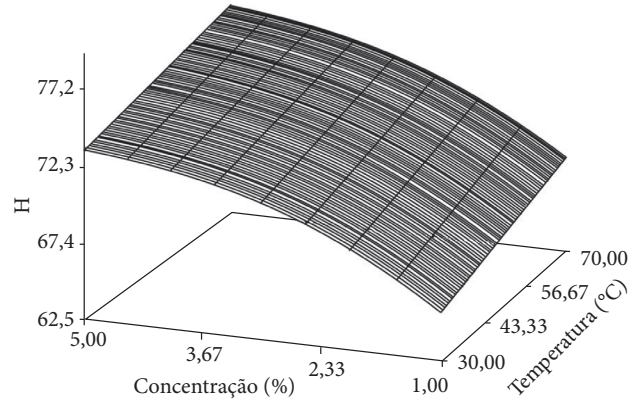
Particularmente para extratos contendo pigmentos de urucum, quando se almeja a obtenção de corante vermelho, o desejado é que se observe aumento da coordenada  $a^*$ , devido à maior presença da bixina e diminuição da coordenada  $b^*$ . Visto que o aumento da coordenada  $b^*$  pode estar associado ao incremento do sal de norbixina no meio ou, de acordo com Constant (1999) e Silva (2007), ser consequência da presença de compostos de degradação ou, ainda, de outros carotenoides presentes nas sementes de urucum. Silva (2001), ao trabalhar com licopeno, verificou que a diminuição de  $a^*$  e o aumento de  $b^*$  estavam associados à formação de produtos de degradação oriundos do pigmento.

De uma forma geral, a melhor concentração de KOH para a produção de sal de norbixina foi a de 5%, associada ou não com temperatura, uma vez que o efeito da base mostrou-se mais intenso que o da temperatura. Já para a obtenção de bixina, a melhor condição extratora foi alcançada com KOH 1% em temperatura ambiente.

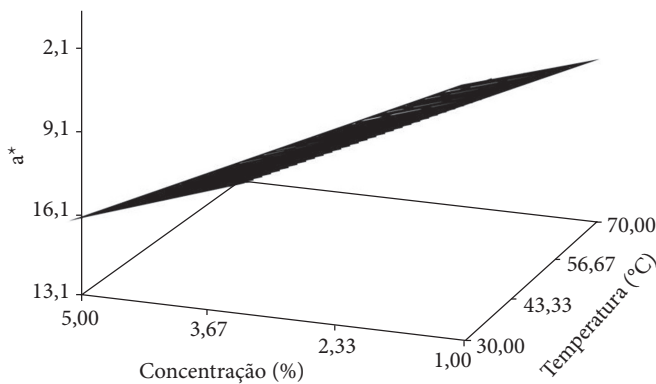
Os dados apresentados neste trabalho possibilitaram a sugestão de algumas alterações no processo industrial de produção de norbixina e seu sal, como um aumento da concentração da base associado à redução do tempo e da temperatura de extração, o que implicaria na redução do consumo de energia e, conseqüentemente, redução dos gastos gerados pela empresa processadora, além da obtenção de um produto de maior qualidade, pela redução dos compostos de degradação.



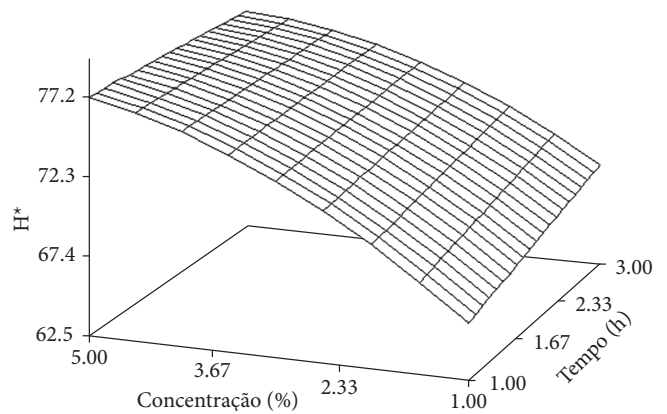
**Figura 3.** Variação da coordenada L\* em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).



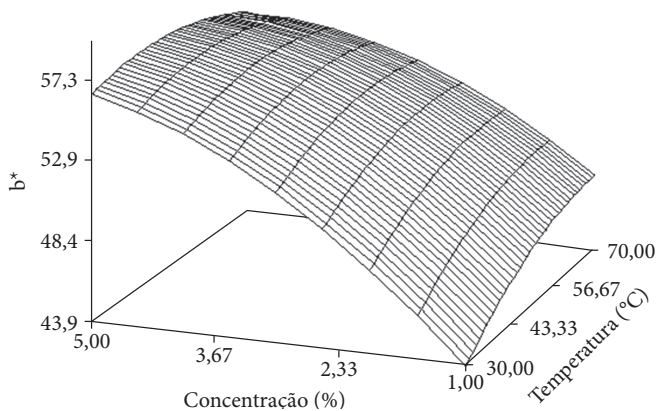
**Figura 6.** Variação do valor de H\* em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).



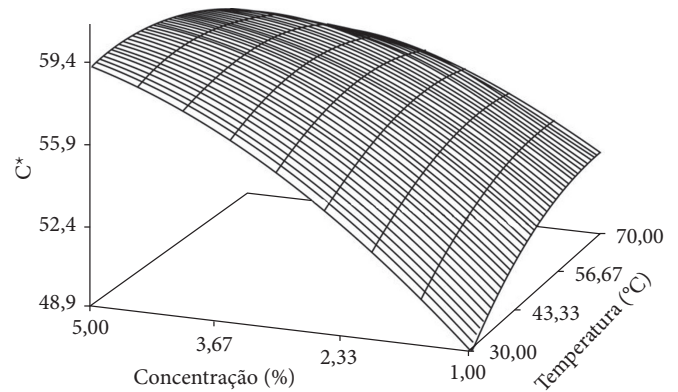
**Figura 4.** Variação da coordenada a\* em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).



**Figura 7.** Variação do valor de H\* em função da concentração de KOH (%) e do tempo de extração (h).



**Figura 5.** Variação da coordenada b\* em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).



**Figura 8.** Variação do valor de C\* em função da concentração de KOH (%) e da temperatura de extração (°C).

## 4 Conclusões

A concentração da base utilizada na extração dos pigmentos de urucum foi o fator que exerceu maior influência na reação de saponificação da bixina. Esses dados condizem com a realidade das indústrias extratoras que empregam elevadas concentrações de álcali, no entanto verifica-se que o uso de temperaturas elevadas e os longos períodos de extração utilizados são desnecessários e incorrem em gastos sem sentido.

O emprego da colorimetria foi útil na confirmação das alterações ocorridas durante a saponificação verificadas por meio da quantificação do teor de bixina e do sal de norbixina. Os valores de  $L^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $H^*$  concordaram com o aumento da concentração do sal de norbixina no meio, ao passo que a redução da coordenada  $a^*$  esteve associada à diminuição da bixina que foi convertida em sal de norbixina.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) a bolsa de pós-doutorado concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o suporte financeiro.

## Referências bibliográficas

- BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. **European Food Research Technology**, v. 215, n. 4, p. 359-364, 2002.
- BAUTISTA, A. R. P. L. et al. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 625-629, 2004.
- CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. **Food Science and Technology**, 2007. (No prelo).
- CONSTANT, P. B. L. **Microencapsulamento de bixina: Agentes encapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações**. Viçosa, 1999, 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa – UFV).
- COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.
- KOUL, V. K.; KOUL, S.; TIKOO, C. L. Process optimization for extraction and purification of bixin from annatto. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 10, p. 545-547, 2003.
- LIMA, L. R. P. et al. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.
- PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, n. 1, p. 53-57, 1999.
- PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P. R. N. Efeito do pH na quantidade de bixina obtida em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 182-187, 1992.
- PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P. R. N. Influência do tempo de aquecimento na degradação térmica de bixina em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 36, n. 4, p. 819-828, 1993.
- PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 47-56, 1980.
- SCOTTER, M. J. Characterization of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 177-185, 1995.
- SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 365-375, 2001.
- SCOTTER, M. J. et al. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) Food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1031-1038, 1998.
- SILVA, A. G. **Extração e estabilidade dos carotenóides obtidos de tomate processado (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Viçosa, 2001. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa – UFV.
- SILVA, P. I. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa, 2007. 145 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa – UFV.
- SHUHAMA, I. K. et al. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 93-97, 2003.
- TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310-313, 2001.