



EXTRAÇÃO DA BIXINA DA SEMENTE DE URUCUM

KAROLYNA B. MIGUEL^{1*}, MIRIA H. M. REIS²

^{1,2}Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Faculdade de Engenharia Química
*e-mail: karolynabm@hotmail.com

RESUMO – Atualmente, a demanda do consumidor por produtos naturais tem crescido no cenário mundial. O urucum é o fruto da árvore urucuzeiro, conhecida cientificamente como *Bixa orellana L.*, que é rico em carotenoides. Industrialmente, devido à sua reconhecida capacidade antioxidante, o urucum é empregado em formulações farmacêuticas e cosméticas, e em alimentos como corante natural em substituição aos aditivos químicos. Na porção externa das suas sementes encontra-se, como o principal carotenoide, a bixina. Muitos solventes orgânicos (etanol, clorofórmio, metanol, acetona, entre outros) têm sido utilizados na extração dos carotenoides das sementes de urucum e neste trabalho explora-se a extração exclusiva com água que apresentou uma alternativa viável para o processo de extração da bixina. As extrações foram realizadas a 50°C através de um agitador magnético e soxleth com controle de temperatura e foram utilizados clorofórmio, etanol, mistura etanol:água (1:1) e água na proporção de 1:30(massa:volume).

Palavras-chave: Urucum, extração, bixina

INTRODUÇÃO

O aumento do mercado consumidor, as mudanças sociológicas e o progresso tecnológico levaram a mudanças no processamento de alimentos, o que reflete também na utilização de corantes (FABRI e TERAMOTO, 2015). Atualmente, os corantes naturais vêm ganhando destaque no mundo. A restrição ao uso de corantes sintéticos na indústria alimentícia é uma tendência mundial, levando ao interesse de se substituir estes corantes pelos naturais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Muitos fotoquímicos são usados como corantes naturais, tais como antocianinas (GORDILLO *et al.*, 2018), betacianinas (WICZKOWSKI *et al.*, 2018), bixina e curcumina (ZHANG; ZHONG, 2013). Os corantes naturais podem apresentar eficiência semelhante aos corantes derivados de produtos químicos e, além disso, são mais seguros e trazem benefícios à saúde, visto que podem contribuir para as propriedades

funcionais dos alimentos (CAROCHO *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016).

No âmbito dos produtos naturais e da sua utilização como alternativa em substituição aos aditivos químicos nos alimentos, destaca-se o uso de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Entre os carotenoides mais usados como aditivos alimentares estão os corantes a base de urucum (BOLOGNESI; GARCIA, 2018). O urucum é uma importante fonte de corante natural para as indústrias alimentícia, farmacêutica e têxtil, representando 90% dos aditivos naturais utilizados no Brasil (SOUSA *et al.*, 2016). O corante é extraído do pericarpo da semente do urucum (*Bixa orellana L.*), sendo o urucuzeiro uma planta nativa da América Central e do Sul. A bixina é o principal pigmento natural da semente do urucum, representando mais de 80% dos carotenoides presentes na semente (DOS SANTOS; LOURENZANI, 2018; MANTOVANI *et al.*, 2013). A partir da bixina são obtidos os demais pigmentos, como norbixina, sal de norbixina e demais produtos de degradação térmica

(BARETH *et al.*,2002; TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). A Figura 1 apresenta as estruturas moleculares dos dois principais corantes do urucum, a bixina e a norbixina.

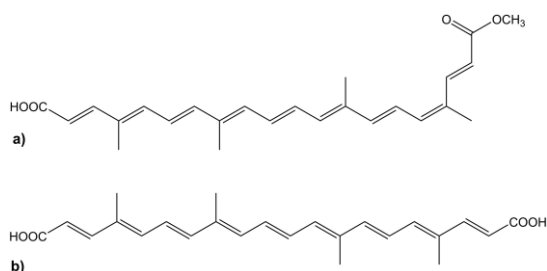


Figura 1 Representação molecular da a) Bixina e b) Norbixina

A bixina é extraída das sementes de urucum por diferentes formas, como a extração em meio aquoso alcalino, em óleo, que resulta na remoção da bixina e de outras moléculas, e a extração com solvente, que resulta na extração mais efetiva do pigmento bixina. Na extração em óleo, ocorre a abrasão do exocarpo submerso em óleo quente (70 °C) promovendo a suspensão dos pigmentos de maior concentração, além de outros produtos de degradação térmica (TAHAM *et al.*,2015) . Na indústria, a extração em meio aquoso alcalino é mais utilizada, geralmente soluções com hidróxido de sódio ou de potássio. Neste processo, os carotenoides são transformados em “sal de norbixina” solúvel em água (CARVALHO *et al.*, 2010). A extração com solventes como acetona, etanol, clorofórmio, hexano e acetato de etila, por conta da maior afinidade com os pigmentos do urucum, promove uma extração mais pura da bixina (DAVID *et al.*, 2022). Contudo, o uso de solventes orgânicos representa um custo adicional ao processo, além de exigir etapas sequenciais de remoção do solvente.

De fato, ainda existem poucas informações precisas e ensaios robustos sobre a extração da bixina de sementes de urucum em solução aquosa. Handayani *et al.* (2021) realizaram a extração aquosa dos pigmentos do urucum em meios ácido e básico (valores de pH ajustados em 4 e 9, respectivamente), obtendo extratos com coloração mais intensa quanto a extração foi realizada em meio ácido e em temperaturas mais elevadas (80°C). Husa *et al.* (2018) compararam o uso de água, acetona e metanol para extração de bixina de sementes de

urucum e reportaram concentrações de bixina de 477,19, 602,90 e 817,71 ppm nos extratos aquoso, em acetona e metanólico, respectivamente. Portanto, embora o rendimento da extração com água seja inferior que com os demais solventes, o uso da água pode ser encorajado devido às vantagens da água. A água é um solvente polar que pode ser usado para extrair bixina. Em relação a conservação dos extratos da semente de urucum, a água apresenta uma melhor estabilidade de armazenamento, por manter a sua cor por aproximadamente 25 dias a mais do que os solventes metanol e a acetona, entretanto o teor de bixina no extrato com acetona foi maior (HUSA *et al.*, 2018).

Assim, neste trabalho será avaliada a cinética da extração aquosa de bixina presente em sementes de urucum. A partir da definição do tempo de extração, será feita então uma comparação da concentração de bixina presente nos extratos obtidos com diferentes solventes (clorofórmio, água e etanol).

METODOLOGIA

As sementes de urucum foram obtidas no comércio local da cidade de Uberlândia-MG e armazenadas em sacos de polietileno de cor escura em refrigerador (a -5°C) para posterior análises e processamentos.

Caracterização das sementes

As sementes de urucum foram caracterizadas quanto à umidade e cinzas de acordo com os métodos oficiais 935.29 publicados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Cinética de extração aquosa

As extrações utilizando água destilada como solvente foram realizadas na temperatura de 50°C e com razão semente:solvente de 1:30 (massa: volume).

As extrações foram realizadas sob agitação magnética a 150 rpm com controle de temperatura (Ika MAG HS 7). As extrações foram realizadas em tempos estabelecidos de 3 até 80 min a fim de avaliar a cinética da extração.

Os perfis de concentração da bixina foram ajustados aos modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem, conforme sugerido na literatura (YAN et al., 2017) e apresentados nas Equações (1) e (2). Valores dos coeficientes de determinação (R^2) foram usados como critérios para adequação de ajuste de dados. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

$$\ln(C_e - C_t) = \ln(C_e) - k_1 t \quad (1)$$

$$\left(\frac{t}{C_t}\right) = \left(\frac{1}{k_2 C_e^2}\right) + \left(\frac{t}{C_e}\right) \quad (2)$$

Onde C_t é a concentração (g de bixina/ 100 g de semente) no dado tempo de extração t (min), C_e é a concentração (g de bixina/ 100 g de semente) no equilíbrio, e k_1 (min^{-1}) e k_2 (min^{-1}) são as constantes de taxa de acordo com os modelos cinéticos de primeira e segunda ordens, respectivamente.

Extração com diferentes solventes

Foram realizadas extrações a partir das sementes de urucum utilizando clorofórmio puro, etanol (95%) puro, mistura de etanol (95%) e água na proporção de 50:50 (v:v) e água destilada pura como solventes. Para as extrações com água e etanol, as extrações foram realizadas por 60 min. Para o clorofórmio, foi utilizado um tempo de extração de 240 min para garantir a completa exaustão dos pigmentos das sementes e, conseqüentemente, a quantificação do teor total de bixina.

As extrações foram realizadas sob agitação magnética a 150 rpm com controle de temperatura (Ika MAG HS 7) a 50°C. A fim de evitar a perda por evaporação dos solventes orgânicos, utilizou-se um soxhlet acoplado a um banho de refrigeração para as extrações utilizando clorofórmio e etanol como solventes.

As extrações foram realizadas com razão semente de urucum para solvente de 1:30 (massa:volume).

Caracterização do extrato

Os extratos foram caracterizados com relação ao teor de bixina que foram determinados pelo método espectrofotométrico conforme procedimento recomendado pela FAO (JECFA/FAO, 2006). Após extração, os extratos foram evaporados em evaporador

rotativo a vácuo (IKA HB100) e posteriormente secos em estufa a 40°C por 12 h. Após secagem, as amostras em pó foram armazenadas sob refrigeração a -5°C e protegidos da luz para posterior análises.

Uma determinada massa do extrato seco (m_{EXT}) foi diluída em acetona até um volume (V_1) para a leitura inicial de absorvância variando entre 0,2 e 1,0. Caso necessário, uma segunda diluição deve ser realizada de forma a considerar um volume de alíquota (V_a) retirada da primeira diluição que será então diluída novamente em acetona (V_2) para condução de testes de diluição até atingirmos concentrações adequadas para leitura de absorvância da amostra variando entre 0,2 e 1,0. A absorvância da amostra foi medida em uma cubeta de quartzo de 1 cm de largura a 487 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu- UV 1280. A concentração de bixina foi calculada de acordo com a lei de Lambert-Beer utilizando $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 3090$ ($1\text{ g}/100\text{ ml})^{-1}\text{ cm}^{-1}$, conforme determinado por FAO (2006) e reportado por Quiroz et al. (2019). A Equação 3 foi então utilizada para determinar a concentração de bixina.

$$\text{Teor de bixina (\%)} = \frac{A V_1 V_2}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times m_{EXT(g)} \times V_a} \times 100 \quad (3)$$

Onde,

A = Absorvância da amostra diluída em clorofórmio à 487nm.

V_1 = Volume de diluição inicial da amostra em clorofórmio (mL)

V_a = Volume da alíquota da amostra inicial considerada para diluição (mL)

V_2 = Volume de diluição final da amostra (mL)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de absorvidade 3090($1\text{ g}/100\text{ mL})^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para bixina em acetona, FAO 2006).

m_{ext} = Massa do extrato, g.

RESULTADO

Caracterização das sementes

Na primeira etapa deste trabalho foi feita a caracterização das sementes e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização das sementes de urucum.

Umidade	12,9± 0,2
Cinzas	5,19± 0,1

As sementes de urucum do presente trabalho apresentaram teor de umidade e cinzas semelhantes aos reportados na literatura para sementes de urucum. Os resultados corroboram com a caracterização das sementes realizada por TAHAM *et.al.* (2015) que reportaram valores de 11,5% e 3,89% para umidade e cinzas, respectivamente. As sementes de urucum utilizadas no trabalho de Albuquerque et al (2012) apresentaram 12,3% de umidade e 6,2% de cinzas e estão de acordo com os publicados neste trabalho.

Cinética da extração aquosa de bixina

Os resultados do teor de bixina da extração aquosa na temperatura de 50°C em uma relação de concentração de 1:30 (massa de sementes em g: volume de água em mL) ao longo do tempo são mostrados na Figura 2.

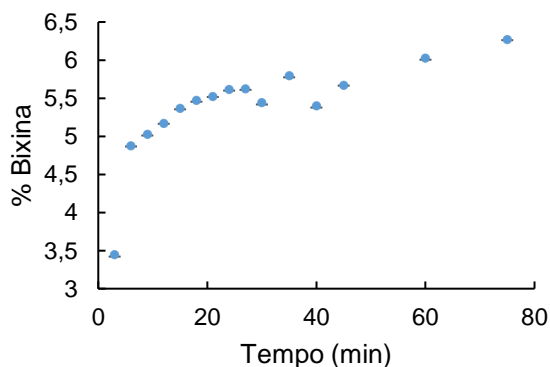


Figura 2 Cinética de extração aquosa do teor de bixina das sementes de urucum em função do tempo

Pode-se observar que o aumento no tempo de extração causou um efeito positivo na extração de bixina das sementes de urucum. Observou-se que, com água na temperatura de 50° C e razão de concentração de 1:30 (massa: volume), é necessário um tempo de aproximadamente 60 min para atingir a quantidade máxima de bixina de aproximadamente 6,2%.

Conforme descrito na metodologia, os perfis de extração das sementes de urucum foram ajustados aos modelos cinéticos de primeira e segunda ordem (Figuras 3 e 4, respectivamente).

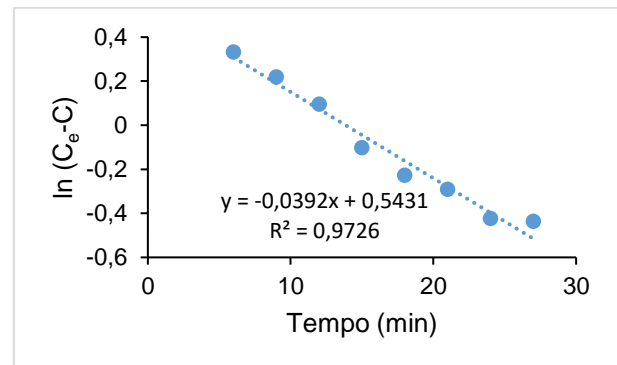


Figura 3. Perfil cinético de primeira ordem para extração aquosa de bixina com tempo.

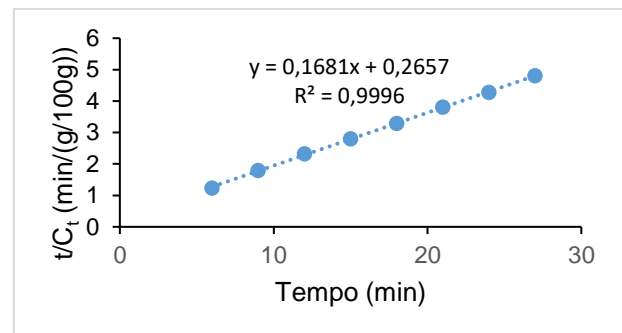


Figura 4. Perfil cinético de segunda ordem para extração aquosa de bixina com tempo.

O modelo cinético de segunda ordem apresentou melhor ajuste aos resultados experimentais do que o modelo de primeira ordem conforme. Além disso, o modelo cinético de segunda ordem conseguiu prever com maior precisão o valor experimental da concentração de bixina no equilíbrio. Assim, a extração de bixina das sementes de urucum pode ser definida em dois estágios sucessivos:

(1) dissolução do soluto no solvente fresco através das sementes em contato com o solvente de extração que induz uma dispersão das partículas e uma solubilização dos compostos seguido por (2) uma depuração sólida com transferência de partículas por difusão molecular do interior das sementes, ou seja, diluição do soluto difundido no solvente para formação do extrato. Esta segunda etapa é mais lenta devido aos problemas de transferência de outros componentes e da modificação da estrutura das sementes. O modelo de segunda ordem também foi proposto na literatura para quantificar a taxa de extração de alburno de Tília (HAROUNA-OUMAROU *et al.*, 2007), taxa de extração de compostos antioxidantes de cascas de romã (SELVAKUMAR & SIVASHANMUGAM, 2020) e compostos bioativos do fruto do araçazeiro roxo (FERREIRA *et al.* 2020).

Características dos extratos de urucum em diferentes solventes

Os resultados do teor de bixina nos extratos com os diferentes solventes propostos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Teor de Bixina nas sementes de urucum.

Solvente	Bixina %
Clorofórmio	10,24±0,05
Etanol	8,69±0,43
Etanol:água	7,45±1,03
Água	6,02± 0,02

Os resultados do teor de bixina apresentados na Tabela 2 estão associados à polaridade de cada solvente. A bixina é uma molécula com uma grande cadeia apolar e determinadas regiões polares. Porém, a bixina é mais solúvel em compostos apolares devido as interações de Van der Waals.

Pode ser observado na Tabela 2 que o teor mais alto de bixina foi encontrado utilizando clorofórmio como solvente visto que ele é o composto mais apolar de todos os solventes utilizados, embora extração com etanol, etanol: água e água também tenham sido eficientes. A água não é o melhor solvente para

extração de bixina e possui pouca abordagem em estudos propostos na literatura utilizando-a como solvente, porém torna-se uma alternativa viável pelo baixo custo, menor impacto ambiental, maior disponibilidade e segurança na operação.

Taham e colaboradores 2015 utilizaram sementes adquiridas na cidade de Rio Vermelho-MG na proporção de 1:10 (m:v), T=50°C reportaram para teor de bixina 2,47% utilizando clorofórmio e 1,18% utilizando água. Cardarelli e colaboradores 2008 adquiriram as sementes na região de Campinas-SP com extração feita em banho ultrassônico na proporção de 1:2 (m:v) em temperatura ambiente e utilizando uma mistura de etanol:água encontraram 2,6% para o teor de bixina. Kaoul 2003 utilizando sementes da região da Índia na proporção de 1:3 (m:v) em uma temperatura de aproximadamente 30°C, utilizando água como solvente reportaram 6,5% de bixina. Pode-se observar que a literatura apresenta diferentes valores para o teor de bixina. Isso se deve a vários fatores como localização geográfica, condições climáticas, variedades da planta, além das condições de extração.

CONCLUSÃO

Neste estudo foram avaliados alguns solventes para extração da bixina nas sementes de urucum. O clorofórmio mostrou-se mais eficiente dentre os solventes utilizados. A água não apresentou os melhores resultados para as extrações conforme já era previsto, porém apresentou uma alternativa viável de extração pelo seu baixo custo.

O urucum é um fruto com grande potencial para a extração aquosa de bixina e é necessário um estudo mais aprofundado para avaliar melhor a metodologia da extração aquosa. Com as curvas de cinética de extração aquosa do urucum foi possível determinar uma faixa ótima de tempo de 60 min para atingir a quantidade máxima de bixina extraída de aproximadamente 6,02% utilizando água como solvente.

REFERÊNCIAS

- BARETH, A.; STROHMAR, W.; KITZELMANN, E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. *European Food Research and Technology*, v. 215, n. 4, p. 359–364, 2002.
- BOLOGNESI, V. J.; GARCIA, C. E. R. Annatto Carotenoids as Additives Replacers in Meat Products. In: *Alternative and Replacement Foods*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 355–384.
- CARDARELLI, C. R.; BENASSI, M. de T.; MERCADANTE, A. Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, n. 9, p. 1689–1693, 2008.
- CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 13, n. 4, p. 377–399, 2014.
- CARVALHO, P. R. N.; SILVA, M. G. da; FABRI, E. G.; TAVARES, P. E. da R.; MARTINS, A. L. M.; SPATTI, L. R. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do instituto agrônômico (IAC). *Bragantia*, v. 69, n. 3, p. 519–524, 2010. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000687052010000300002&lng=pt&tlng=pt>
- DAVID, S.-L. J.; JULIÁN, G.-C. C.; LILIANA, V.-S. C.; AYALA-APONTE, A. A.; LILIANA, S.-C. Kinetics and bixine extraction time from achiote (*Bixa Orellana* L.). *Journal of Food Science and Technology*, v. 59, n. 3, p. 1239–1246, 20 mar. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s13197-021-05209-y>>.
- DOS SANTOS, E. J.; LOURENZANI, W. L.; LOURENZANI, A. E. B. S. Histórico e ascensão do Urucum na microrregião de Dracena-SP. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v. 12, n. 1, p. 29–39, 27 mar. 2018. Disponível em: <<http://seer.tupa.unesp.br/index.php/BIOENG/article/view/616>>
- FABRI, E.; TERAMOTO, J.E. (2015). Anatto: a natural source of colorant, *Hortic. Bras.* 33(1) • Mar 2015. <https://doi.org/10.1590/S0102053620150000100023>
- FERREIRA, F. B.; MAGALHÃES, F. de S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Enhanced conditions to obtain a clarified purple araçá (*Psidium myrtilloides*) fruit extract. *Journal of Food Process Engineering*, v. 44, n. 1, p. 1–10, 9 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.13607>>.
- GORDILLO, B.; SIGURDSON, G. T.; LAO, F.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J.; GIUSTI, M. M. Assessment of the color modulation and stability of naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification. *Food Research International*, v. 106, n. January, p. 791–799, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.057>>.
- HANDAYANI, I.; HARYANTI, P.; SULISTYO, S. B. Color and antibacterial activity of annatto extracts at various pH of distilled water solvent and extraction temperature. *Food Research*, v. 5, n. 6, p. 247–253, 2021.
- HAROUNA-OUMAROU, H. A.; FAUDUET, H.; PORTE, C.; HO, Y.-S. Comparison of kinetic models for the aqueous solid-liquid extraction of tilia sapwood in a continuous stirred tank reactor. *Chemical Engineering Communications*, v. 194, n. 4, p. 537–552, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00986440600992511>>.
- HUSA, N. N.; HAMZAH, F.; SAID, H. M. Characterization and Storage Stability Study of Bixin Extracted from *Bixa orellana* Using Organic Solvent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 358, n. 1, 2018.
- 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, 1 set. 2003.

- MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, v. 52, p. 1–15, 2016
- MANTOVANI, N. C.; GRANDO, M. F.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. EVALUATION OF ANNATTO (*Bixa orellana* L.) Genotypes Through the morphological characteristics of fruits, seeds productivity and bixin. *Ciência Florestal*, v. 23, n. 2, p. 344–362, 28 jun. 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/9281>>.
- QUIROZ, J. Q.; TORRES, A. C.; RAMIREZ, L. M.; GARCIA, M. S.; GOMEZ, G. C.; ROJAS, J. Optimization of the microwave-assisted extraction process of bioactive compounds from annatto seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, v. 8, n. 2, 2019.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, v. 124, n. 2017, p. 200–205, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>>.
- SELVAKUMAR, P., & SIVASHANMUGAM, P. (2019). Studies on the Extraction of Polyphenolic Compounds from Pre-consumer Organic Solid Waste. *Journal of industrial and Engineering Chemistry*. doi:10.1016/j.jiec.2019.10.0
- SOUSA, L. DOS S., CABRAL, B. V., MADRONA, G. S., CARDOSO, V. L., & REIS, M. H. M. (2016). Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. *Separation and Purification Technology*, 168, 188198. doi:10.1016/j.seppur.2016.05.029
- TAHAM, T.; SILVA, D. O.; BARROZO, M. A. S. Improvement of bixin extraction from annatto seeds using a screen-topped spouted bed. *Separation and Purification Technology*, v. 158, p. 313–321, 2016. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.12.037>>.
- 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, DEZ. 2001. <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01012061200100030010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- WICZKOWSKI, W.; ROMASZKO, E.; SZAWARA-NOWAK, D.; PISKULA, M. K. The impact of the matrix of red beet products and interindividual variability on betacyanins bioavailability in humans. *Food Research International*, v. 108, p. 530–538, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.004>>.
- YAN, F.; YU, C.; ZHANG, B.; ZOU, T.; ZHAO, H.; LI, J. Preparation of freestanding graphene-based laminar membrane for clean-water intake via forward osmosis process. *RSC Advances*, v. 7, n. 3, p. 1326–1335, 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA2>>.
- ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Encapsulation of bixin in sodium caseinate to deliver the colorant in transparent dispersions. *Food Hydrocolloids*, v. 33, n. 1, p. 19, 2013. Disponível: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.009>>.