



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS



**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PIGMENTO DO
SABUGO DE MILHO ROXO (*Zea mays L.*) E SUA APLICAÇÃO
EM ALIMENTOS**

ROMINA SOFIA CERRO QUINTANA
Engenheira de Alimentos

PROFA. DRA. HELENA T. GODOY
Orientadora

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

Campinas – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C336e Cerro-Quintana, Romina Sofia
Extração e caracterização do pigmento do sabugo de milho roxo
(zea mays l.) e sua aplicação em alimentos / Romina Sofia Cerro-
Quintana. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Milho roxo. 2. Antocianinas. 3. Planejamento experimental.
4. Espectrometria de massa. 5. Corante natural. I. Godoy, Helena
Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Extraction and characterization of purple corncob (zea mays l.) pigment and its
application in food

Palavras-chave em inglês (Keywords): Purple corn, Anthocyanins, Experimental Design, Mass
spectrometry, Natural colorants

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Florinda Orsatti Bobbio

Regina Prado Zanes Furlani

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Orientadora

Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Membro

Dra. Regina Prado Zanes Furlani
Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL
Membro

Profa. Dra. Juliana Lima Pallone
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
Suplente

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição - ESALQ
Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Del Rosario e Samuel, e a minha irmã Claudia, pelo imenso amor, por estarem sempre do meu lado, ainda que longe fisicamente, por me incentivarem, por acreditarem em mim e em minhas faculdades, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos,
e em particular ao Departamento de Ciência de Alimentos, por possibilitar a
realização deste trabalho.

A minha orientadora, professora e amiga,
Dra. Helena Teixeira Godoy, por me dar a oportunidade de participar, aprender e
viver junto a um grupo de pesquisa tão seleta como o do Laboratório de Análise de
Alimentos, pelos conselhos, ajuda, companhia e dedicação ao longo destes anos,
minha sincera gratidão.

Ao CNPq,
pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

A banca examinadora,
pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Ao Marco, Noelia e Helmut,
pela parceria, as risadas intermináveis, os passeios, pela amizade e ajuda
desinteressada e ilimitada que sempre me deram, ainda nos momentos difíceis,
serei sempre grata.

À Elede, Merenice e Vivian,
grandes amigas, irmãs e parceiras de laboratório, baladas e mil outras aventuras.

Aos amigos e colegas do “lab”,
Marcelo, Carol, Adriana, Ciça, Claudia, Stanislau, Cristiano, Dani Bio, Dani Pane,
Raquel, Luciula, Cíntia, Fernanda, Joyce, Gislaine, Cristina e o seu Dirceu, pela
amizade, ensino constante, paciência, parceria e por fazer que a minha estância no

Brasil fosse tão agradável como se estivesse na minha própria casa, obrigada por tudo.

Ao Jonas, Juliana e Dorival,
por me auxiliarem no projeto quando mais precisei, pela disposição, amizade e força, muito obrigada.

As técnicas Alessandra e Renata,
por sempre estarem dispostas a me ajudar na realização dos diferentes experimentos.

As meninas com quem compartilhei moradia,
Liz, Marcia, Natália e Carol, assim como, Amanda, Marília, Marie, Wei, Thatiane, Aline, Mayumi, Vivian, Patricia e Veronica da “Rep”, pela companhia, conversas, festas e tantas outras atividades que fizemos juntas, obrigada por compartilharem tantos momentos comigo.

As minhas melhores amigas da infância,
Ana María e Pierina, que ainda longe uma da outra, nunca foi abalada a nossa amizade, pelas “altas” conversas de madrugada e pelo simples fato de me permitir ser parte de suas vidas.

A todos meus amigos,
porque vocês foram aquele estímulo constante que me permitiu desfrutar de cada um dos momentos que passei no Brasil.

A Deus,
porque sem ele nada teria sido possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

a*	Vermelhidão
ANOVA	Análise de Variância
AMT	Antocianinas Monoméricas Totais
b*	Amarelado
C*	Cromaticidade
Cy	Cianidina
Cy-3-glu	Cianidina-3-o-glicosídeo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
ΔE	mudança total da cor
EAG	Equivalente em Ácido Gálico
EM	Espectrometria de massas
ESI	Ionização por electrospray
FT	Fenólicos Totais
Glu	glicose
h	ângulo da tonalidade
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
L*	Luminosidade
Q	Analisador quadropolo
R	Rendimento
SR	Superfície de Resposta
TOF	Analisador por Tempo de Voo
Pg	Pelargonidina
Pn	Peonidina

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE QUADROS.....	xxi
LISTA DE ANEXOS.....	xxv
RESUMO GERAL	xxvii
ABSTRACT.....	xxix
INTRODUÇÃO GERAL	01
OBJETIVOS.....	03

CAPITULO 1

REVISÃO DE LITERATURA.....	05
1.1 O milho roxo.....	05
1.2 Produção peruana do milho roxo.....	07
1.3 Exportação peruana do milho roxo e seus derivados.....	07
1.4 Extração do pigmento.....	08
1.5 Liofilização como técnica de conservação de alimentos.....	10
1.6 Compostos fenólicos.....	11
1.7 Flavonóides.....	12
1.8 Antocianinas.....	13
1.8.1 Estrutura das antocianinas.....	16
1.8.2 Estabilidade e fatores que afetam as antocianinas.....	17
1.9 Determinação da atividade antioxidante das antocianinas.....	21
1.10 Metodologias para a identificação de antocianinas.....	22
1.11 Análise da cor.....	23

1.12 Delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) e superfícies de resposta (RS)	24
1.13 Referências bibliográficas.....	25

CAPITULO 2

Otimização do processo de extração do pigmento de milho roxo a partir do sabugo, usando a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de reposta.....	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	32
2.1 Material e métodos.....	34
2.1.1 Material.....	34
2.1.2 Solventes e reagentes.....	34
2.1.3 Caracterização da composição centesimal do sabugo de milho roxo.....	35
2.1.4 Modelo experimental para a otimização do processo de extração do pigmento do sabugo de milho roxo.....	35
2.1.4.1 Estratégias utilizadas para os processos de extração do pigmento de milho roxo.....	36
• Extração com acetona	36
• Extração com etanol	38
• Extração com água	39
2.1.5 Determinação do teor de antocianinas monoméricas totais (AMT)	39
2.1.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (FT).....	40
2.1.7 Determinação do índice de atividade antioxidante (IAA).....	41
2.1.8 Análise estatística.....	42
2.3 Resultados e discussões.....	43

2.3.1 Composição centesimal do sabugo de milho roxo.....	43
2.3.2 Otimização do método de extração do pigmento de milho roxo...	44
• Extração com acetona como solvente.....	44
• Extração com etanol como solvente.....	60
• Extração com água como solvente.....	75
2.4 Conclusões.....	92
2.5 Agradecimentos.....	93
2.5 Referências Bibliográficas.....	93
 CAPITULO 3	
Identificação das antocianinas presentes no extrato otimizado de sabugo de milho roxo por espectrometria de massas.....	97
RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	98
INTRODUÇÃO.....	98
3.1 Material e métodos.....	100
3.1.1 Material.....	100
3.1.2 Solventes e reagentes.....	100
3.1.3 Equipamentos.....	101
3.1.4 Obtenção do extrato de sabugo de milho roxo.....	101
3.1.5 Separação de antocianinas por CLAE.....	102
3.1.6 Preparação das amostras para injeção no ESI-EM/EM.....	102
3.2 Resultados e discussões.....	103
3.2.1 Separação dos compostos presentes no extrato de sabugo de milho roxo por CLAE.....	103
3.2.2 Identificação das antocianinas por espectrometria de massas.....	106

3.3 Conclusões.....	112
3.4 Agradecimentos.....	113
3.5 Referências Bibliográficas.....	113

CAPITULO 4

APLICAÇÃO DO EXTRATO DO SABUGO DE MILHO ROXO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR AO LONGO DO TEMPO EM TRÊS SISTEMAS MODELOS	115
RESUMO	115
ABSTRACT.....	116
INTRODUÇÃO.....	116
4.1 Material e métodos.....	118
4.1.1 Material	118
4.1.2 Amostras e reagentes.....	119
4.1.3 Equipamentos.....	119
4.1.4 Obtenção do pigmento.....	119
4.1.5 Preparo e condicionamento dos sistemas modelos.....	119
4.1.6 Análise da cor.....	121
4.1.7 Análise estatística.....	122
4.2 Resultados e discussões.....	122
4.2.1 Análise comparativa entre as concentrações das amostras.....	122
• Amostra “gelatina”.....	122
• Amostra “suco instantâneo”.....	123
• Amostra “bebida isotônica”.....	125
4.2.2 Análise de estabilidade e vida de prateleira.....	128
• Amostra “gelatina”.....	128

• Amostra “suco instantâneo”	130
• Amostra “bebida isotônica”	132
4.3 Conclusões.....	137
4.4 Agradecimentos.....	138
4.4 Referências Bibliográficas.....	138
CONCLUSOES GERAIS	140
Anexo 1.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ilustração do milho roxo (<i>Zea mays</i> L.).....	07
Figura 1.2	Sistema de numeração de um flavonóide.....	13
Figura 1.3	Estrutura básica das antocianidinas.....	14
Figura 1.4	Tendência de coloração apresentadas pelas antocianinas.....	15
Figura 1.5	Transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.....	18
Figura 2.1	Fluxograma do processo da extração do pigmento.....	37
Figura 2.2	Superfície de resposta variáveis massa vs. pH – AMT – acetona.....	53
Figura 2.3	Superfície de resposta variáveis extrações vs. pH – AMT – acetona.....	53
Figura 2.4	Superfície de resposta variáveis extrações vs. massa – AMT – acetona.....	54
Figura 2.5	Superfície de resposta variáveis massa vs. extrações – R – acetona	56
Figura 2.6	Superfície de resposta variáveis pH vs. Massa – AMT – etanol.....	68
Figura 2.7	Superfície de resposta variáveis pH vs. Tempo – AMT – etanol.....	68
Figura 2.8	Superfície de resposta variáveis tempo vs. massa – AMT – etanol.....	69
Figura 2.9	Superfície de resposta variável tempo vs. Massa – R – etanol.....	71
Figura 2.10	Superfície de resposta variáveis pH vs. massa – AMT – água.....	82
Figura 2.11	Superfície de resposta variáveis pH vs. massa – R – água.....	84
Figura 2.12	Superfície de resposta variáveis pH vs. massa – IAA –	86

	água.....	
Figura 3.1	Cromatograma do extrato do sabugo de milho roxo.....	105
Figura 3.2	Espectro de massa dos íons do extrato do sabugo do milho roxo.....	107
Figura 3.3	Espectro de fragmentação da cianidina-3-glicosídeo (m/z 449).....	109
Figura 3.4	Espectro de fragmentação da pelargonidina-3-glicosídeo (m/z 433).....	109
Figura 3.5	Espectro de fragmentação da peonidina-3-glicosídeo (m/z 463).....	109
Figura 3.6	Espectro de fragmentação da cianidina-3-(6' malonilglicosídeo) (m/z 535).....	109
Figura 3.7	Espectro de fragmentação da pelargonidina-3-(6' malonilglicosídeo) (m/z 519).....	110
Figura 3.8	Espectro de fragmentação da peonidina-3-(6' malonilglicosídeo) (m/z 549).....	110
Figura 3.9	Espectro de fragmentação da cianidina-3-(3'',6'' dimalonilglicosídeo) (m/z 621).....	111
Figura 3.10	Espectro de fragmentação da pelargonidina-dimalonilglicosídeo (m/z 605).....	111
Figura 3.11	Espectro de fragmentação da peonidina-3-(3'',6'' dimalonilglicosídeo) (m/z 635).....	111
Figura 4.1	Quadrante da região do amarelo – vermelho mostrando as coordenadas L* C* h das amostras e do padrão de gelatina....	123
Figura 4.2	Quadrante da região do amarelo – vermelho mostrando as coordenadas L* C* h das amostras e do padrão de suco instantâneo	125
Figura 4.3	Quadrante da região do amarelo – vermelho mostrando as coordenadas L* C* h das amostras e do padrão de bebida isotônica.....	127
Figura 4.4	Coordenadas C*, h e L* das amostras de gelatina e suco instantâneo e bebida isotônica ao longo do tempo.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Perfil antociânico de alguns alimentos.....	16
Tabela 2.1	Análise proximal do sabugo de milho roxo.....	43
Tabela 2.2	Valores selecionados para o DCCR acetona 2 ³	48
Tabela 2.3	Condições otimizadas para extração do pigmento do sabugo de milho roxo com acetona.....	59
Tabela 2.4	Validação do ponto ótimo do DCCR acetona.....	59
Tabela 2.5	Valores preditos e obtidos do DCCR acetona.....	60
Tabela 2.6	Valores selecionados para o DCCR etanol 2 ³	64
Tabela 2.7	Condições otimizadas para extração de pigmento do sabugo de milho roxo com etanol.....	74
Tabela 2.8	Validação do ponto ótimo do DCCR etanol.....	74
Tabela 2.9	Valores preditos e obtidos do DCCR etanol.....	75
Tabela 2.10	Valores para o DCCR água 2 ²	79
Tabela 2.11	Condições otimizadas para extração do pigmento do sabugo de milho roxo com água.....	88
Tabela 2.12	Validação do ponto ótimo do DCCR água.....	88
Tabela 2.13	Valores preditos e obtidos do DCCR água.....	88
Tabela 2.14	Resultados finais das validações de cada um dos DCCRs estudados.....	89
Tabela 3.1	Condições analíticas do ESI-EM/EM para identificação de antocianinas em extrato do sabugo de milho roxo.....	103
Tabela 3.2	Gradiente de eluição e tempo para separação de antocianinas.....	104
Tabela 3.3	Possíveis antocianinas presentes no extrato do sabugo de milho roxo.....	106
Tabela 4.1	Valores dos parâmetros L*,a*, b*, C* e h para a amostra	122

	“gelatina” no início do estudo.....	
Tabela 4.2	Valores dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE para a amostra “suco instantâneo” início do estudo.....	124
Tabela 4.3	Valores dos parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE para a amostra “bebida isotônica” início do estudo.....	126
Tabela 4.4	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “gelatina” com concentração 0,2 mg/mL.....	129
Tabela 4.5	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “gelatina” com concentração 0,3 mg/mL.....	129
Tabela 4.6	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “gelatina” com concentração 0,4 mg/mL.....	129
Tabela 4.7	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “suco” com concentração 0,2 mg/mL.....	130
Tabela 4.8	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “suco” com concentração 0,5 mg/mL.....	131
Tabela 4.9	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “suco” com concentração 0,8 mg/mL.....	131
Tabela 4.10	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “bebida isotônica” com concentração 0,2 mg/mL.....	132
Tabela 4.11	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “bebida isotônica” com concentração 0,5 mg/mL.....	133
Tabela 4.12	Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “bebida isotônica” com concentração 0,8 mg/mL.....	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1	Classificação botânica do milho roxo.....	05
Quadro 1.2	Composição química do milho roxo.....	06
Quadro 1.3	Grupos substituintes das antocianinas a partir da estrutura básica das antocianidinas.....	14
Quadro 2.1	Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado acetona 2^{6-2}	38
Quadro 2.2	Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado etanol 2^{6-2}	38
Quadro 2.3	Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado água 2^{5-1}	39
Quadro 2.4	Planejamento Fracionado Acetona 2^{6-2}	45
Quadro 2.5	Variáveis significativas para a resposta antocianinas monoméricas totais (AMT)-acetona.	47
Quadro 2.6	Variáveis significativas para a resposta rendimento (R)-acetona.....	47
Quadro 2.7	Variáveis significativas para a resposta índice de atividade antioxidante (IAA) -acetona.	47
Quadro 2.8	Variáveis significativas para a resposta fenólicos totais (FT) -acetona.....	48
Quadro 2.9	Planejamento Completo Acetona 2^3 com as respostas.....	49
Quadro 2.10	Coefficientes de regressão AMT- acetona.....	50
Quadro 2.11	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – AMT – acetona.....	51
Quadro 2.12	Coefficientes de regressão R – acetona.....	55
Quadro 2.13	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – R – acetona.	55
Quadro 2.14	Coefficientes de regressão IAA – acetona.....	57

Quadro 2.15	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – IAA – acetona.....	57
Quadro 2.16	Coeficientes de regressão FT- acetona.....	58
Quadro 2.17	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT – acetona.....	58
Quadro 2.18	Planejamento Fracionado Etanol 2 ⁶⁻²	62
Quadro 2.19	Variáveis significativas para a resposta antocianinas monoméricas totais (AMT)-etanol.....	63
Quadro 2.20	Variáveis significativas para a resposta rendimento (R) - etanol.....	63
Quadro 2.21	Variáveis significativas para a resposta Índice de atividade antioxidante (IAA) -etanol.....	63
Quadro 2.22	Variáveis significativas para a resposta fenólicos totais (FT) -etanol.....	64
Quadro 2.23	Planejamento Completo Etanol 2 ³ com as respostas experimentais obtidas.....	65
Quadro 2.24	Coeficientes de regressão AMT- etanol.....	66
Quadro 2.25	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – AMT – etanol.....	70
Quadro 2.26	Coeficientes de regressão R- etanol.....	70
Quadro 2.27	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – R – etanol.....	70
Quadro 2.28	Coeficientes de regressão IAA- etanol.....	72
Quadro 2.29	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – IAA – etanol.....	72
Quadro 2.30	Coeficientes de regressão FT- etanol.....	73
Quadro 2.31	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT – etanol.....	73

Quadro 2.32	Planejamento Fracionado Água 2 ⁵⁻¹	76
Quadro 2.33	Variáveis significativas para a resposta Antocianinas monoméricas totais (AMT)-água	77
Quadro 2.34	Variáveis significativas para a resposta rendimento (R) – água.....	78
Quadro 2.35	Variáveis significativas para a resposta índice de atividade antioxidante (IAA) - água.....	78
Quadro 2.36	Variáveis significativas para a resposta fenólicos totais (FT) – água.....	78
Quadro 2.37	Planejamento Completo Água 2 ² com as respostas experimentais obtidas.....	80
Quadro 2.38	Coefficientes de regressão AMT- água.....	81
Quadro 2.39	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – AMT – água.....	81
Quadro 2.40	Coefficientes de regressão R – água	83
Quadro 2.41	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – R – água	83
Quadro 2.42	Coefficientes de regressão IAA – água.....	84
Quadro 2.43	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT – água	85
Quadro 2.44	Coefficientes de regressão FT - água	87
Quadro 2.45	ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT – água.....	87
Quadro 3.1	Possíveis antocianinas presentes no extrato de sabugo de milho roxo.....	101
Quadro 4.1	Características físicas e visuais das amostras comerciais.....	120
Quadro 4.2	Concentrações do pigmento usado nos sistemas modelo.....	120

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Espectros de absorção das possíveis antocianinas presentes no sabugo de milho roxo.....	141
---------	---	-----

RESUMO GERAL

O milho roxo (*Zea mays L.*) é uma variedade diferenciada de milho que cresce naturalmente no Peru e tem sido tradicionalmente usado para o preparo de sobremesas e sucos, devido à intensa coloração presente no sabugo e no pericarpo dos grãos. Além disso, publicações científicas recentes têm avaliado e demonstrado a presença de antocianinas e outros compostos fenólicos em grande quantidade tanto nos grãos quanto no sabugo, os quais apresentam propriedades que podem melhorar algumas funções físicas do organismo, e até ajudar na prevenção e combate de doenças degenerativas. Neste trabalho, se otimizou um método de extração do pigmento do sabugo do milho roxo, por meio de planejamentos experimentais e análise de superfícies de resposta, nos quais foram estudados os efeitos de variáveis como, tipo de solvente, composição do solvente, pH, tempo e temperatura de extração, número de extrações e massa de amostra, sobre o teor de antocianinas monoméricas totais, fenólicos totais, índice de atividade antioxidante e rendimento total do extrato. As superfícies de resposta obtidas indicaram a água como melhor solvente extrator nas condições de pH 4, 60 minutos de extração a 50°C, 3 extrações subseqüentes e 1 g de amostra. Uma vez validadas as condições de extração dos pigmentos, os mesmos foram analisados por meio da técnica de espectrometria de massas, com a finalidade de identificar as antocianinas presentes neles, por serem estas os compostos de destaque na amostra. Foram identificadas 9 antocianinas: cianidina-3-o-glicosídeo, pelargonidina-3-o-glicosídeo, peonidina-3-o-glicosídeo, cianidina-3(6"malonilglicosídeo), pelargonidina-3(6"malonilglicosídeo), peonidina-3(6"malonilglicosídeo), cianidina-3(3",6"dimalonilglicosídeo), peonidina-3(3",6"dimalonilglicosídeo) e pelargonidina-dimalonilglicosídeo, sendo que a presença desta última antocianina não foi relatada anteriormente em pesquisas realizadas nesta matriz. Por último, aplicou-se o extrato liofilizado obtido nas condições otimizadas em três sistemas alimentares (gelatina, suco instantâneo e bebida isotônica) em diferentes concentrações, com a finalidade de verificar a

estabilidade e vida de prateleira do pigmento como corante natural, assim como, o poder tintorial ao ser comparado com amostras comerciais contendo corantes sintéticos. A cor foi avaliada pelo sistema CIEL*a*b* através dos parâmetros L*, h, C* e ΔE. Os resultados mostraram que o pigmento extraído foi estável por 7 dias nas amostras de gelatina e suco instantâneo, conservadas a temperaturas de refrigeração e com incidência ocasional de luz, enquanto à bebida isotônica, o extrato mostrou diferenças significativas na coloração final observada depois de 16 dias de estocagem a temperatura ambiente e sob intensa iluminação. Ao serem avaliadas as concentrações do pigmento e comparadas com os produtos comerciais com corantes sintéticos, observou-se que nenhuma das concentrações aplicadas na gelatina foram o suficiente intensas para alcançar a coloração padrão, também foi observado que as concentrações 0,5 e 0,8 mg/mL testadas na bebida isotônica se mostraram diferentes, mas, muito próximas da cor apresentada pelo padrão, enquanto que, para o suco instantâneo a concentração de 0,8 mg/mL foi suficiente para se aproximar e reproduzir a tonalidade apresentada pela amostra padrão, demonstrando que para esta matriz a substituição do corante sintético pelo natural é uma opção viável.

Palavras Chave: milho roxo, antocianinas, planejamentos experimentais, espectrometria de massas, corante natural.

ABSTRACT

Purple corn (*Zea mays L.*) is a peculiar variety of corn that normally grows in Peru and has been traditionally used for desserts and drinks, due to the intense color presented on the cob and grains' pericarp. Recent scientific publications have evaluated and demonstrated the presence of anthocyanins and other phenolic compounds in large quantities in grains and cobs of purple corn, which have properties that might improve some physical functions of the body, and help to prevent and fight degenerative diseases. On this job was optimized a extraction method of purple corncob pigment using design of experiments and surface response analysis, where were studied some variable's effects as, kind of solvent, solvent's composition, pH, extraction's time and temperature, number of extractions, sample mass, over total monomeric anthocyanin content, total phenolics content, antioxidant activity index and total extract yield. Response surfaces showed water as the best extraction solvent on the next conditions: pH 4, 60 minutes of extraction, 50 °C, 3 extractions and 1 gram of sample. Once that the best condition was validated, the pigment was analyzed with mass spectrometry technique with the aim of identify the presents anthocyanins at the sample, due they are the most important compounds in this matrix. Were identified 9 anthocyanins, cyanidin-3-o-glucoside, pelargonidin-3-o-glucoside, peonidin-3-o-glucoside, cyanidin-3(6"malonylglucoside), pelargonidin-3(6"malonylglucoside), peonidin-3(6"malonylglucoside), cyanidin-3(3"6"dimalonylglucoside), peonidin-3(3"6"dimalonylglucoside) and pelargonidin-dimalonylglucoside, since this last anthocyanin has not been mentioned in previous papers about this matrix. Finally, the pigment obtained with the optimized conditions of extraction was applied in three food systems (gelatin, instant juice and an isotonic soft drink) in different concentrations, with the objective of verify the pigment stability and shelf-life time once that is applied as a natural pigment, as well as, the evaluation of the tintorial strength when compared with synthetics samples. Visual color was evaluated with CIEL*a*b* system through L*, h, C* and ΔE parameters. The results showed the

purple corncob pigment is stable for 7 days of evaluation on gelatin and instant juice samples, when conserved at refrigerated temperatures and occasional illumination. When pigment concentrations were evaluated and compared with synthetics products, was observed that no one of the concentrations applied on gelatin were enough intense to reach the standard color. Was observed as well that, concentrations of 0,5 and 0,8 mg/mL tested on isotonic soft drink showed significant difference on color parameters, but pretty close to the standard's ones, in addition, 0,8 mg/mL concentration of instant juice color parameters matched with the standard ones, demonstrating that, for this matrix, purple corncob pigment is a great and stable substituent for artificial color additives in dairy products.

Keywords: purple corn, anthocyanins, experimental design, mass spectrometry, natural colorant.

INTRODUÇÃO GERAL

O milho roxo (*Zea mays L.*) é uma variedade de milho que tem a particularidade de apresentar uma cor roxa muito intensa, esta coloração é devido à grande quantidade de antocianinas presentes na sua composição (Fernandez, 1995). A origem desta variedade de milho data desde a época pré-inca, predomina nos Andes e, em particular, no Peru, que detém a maior parte da produção mundial. Em 2008 a produção total atingiu um valor de 13 467,24 toneladas (INEI, 2009), concentrando-se na região central do país, por serem as cidades da serra as maiores produtoras. Tradicionalmente, o milho roxo é consumido em três tipos de produtos caseiros: o suco de milho roxo, obtido por fervura dos sabugos e grãos com adição de açúcar e frutas, também chamada de *chicha morada*; a *mazamorra morada*, sobremesa feita com o suco preparado anteriormente com adição de amido de milho e o *api*, sobremesa também obtida por cozimento da farinha dos grãos.

Estudos têm demonstrado a presença de teores significantes de compostos fenólicos como taninos, ácidos fenólicos, entre outros compostos bioativos no milho roxo, os quais têm ações benéficas no organismo se consumidos freqüentemente na dieta, evitando a degeneração ou mutação celular e, portanto, o aparecimento de doenças como insuficiência cardíaca, hipertensão, obesidade, câncer de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele, doenças vasculares cerebrais, ruptura de aneurismas e lesões renais (Pedreschi e Cisneros-Zevallos, 2006; Jing, 2006; Kuskoski, 2004; Kuskoski 2005; Agronoticias, 2003; Hagiwara et al., 2001; Pimentel et al., 2005; Ness e Powless, 1997; Yokohira et al., 2008; Fukamachi et al., 2008).

As antocianinas, formadas por antocianidinas glicosiladas, são os constituintes do milho roxo que se destacam sobre os outros compostos, por apresentarem propriedades funcionais além das propriedades tintórias. O teor de antocianinas monoméricas encontradas na literatura nesta matriz vão desde 1,4

até 13,23 mg equivalentes a cianidina-3-o-glicosídeo (cy-3-glu)/g de milho roxo (Jing, 2006).

Com todas essas vantagens, o mercado interessado em vender produtos que acrescentem o bem estar e melhorem a saúde do consumidor, está à procura de um processo que extraia o maior teor possível de antocianinas desta matriz (Pedreschi e Cisneros-Zevallos, 2006).

De acordo com a literatura, o teor presente de compostos fenólicos totais nesta matriz também é considerável. Jing (2006) encontrou valores de até 35,16 mg equivalentes a ácido gálico (EAG)/g de milho roxo. A atividade antioxidante deste alimento também tem sido apontada na literatura e testada por metodologias como FRAP, DPPH, ABTS e ORAC, mostrando-se como uma fonte apreciável para uso como aditivo alimentar que apresenta múltiplas qualidades (Yokohira et al., 2008; Pedreschi e Cisneros-Zevallos, 2006).

Em função de todas essas qualidades, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de extração que otimize a obtenção de antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais, com uma elevada atividade antioxidante e alto rendimento do extrato. Com esse propósito, quatro respostas foram avaliadas ao longo do processo: teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), rendimento do extrato (R), índice de atividade antioxidante (IAA) e teor de fenólicos totais (FT). Uma vez otimizadas as condições de extração do pigmento do sabugo de milho roxo, foram identificadas as antocianinas presentes nele por meio da técnica de espectrometria de massas (EM). Por último, foi avaliada a estabilidade e concentração do pigmento em três matrizes alimentares ao longo do tempo, com influência de temperatura e luz, empregando o método CIEL*a*b* avaliando os níveis de luminosidade (L*), vermelhidão (a*), amarelado (b*), cromaticidade (C*), ângulo de tonalidade (h) e mudança total da cor (ΔE) das amostras.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Difundir as características do sabugo de milho roxo, com intenção de acrescentar estudos, que levem a um possível uso como aditivo alimentar natural.

Objetivos específicos:

Obter extratos a partir do sabugo de milho roxo utilizando água e solventes orgânicos, como etanol e acetona.

Otimizar um método de extração do pigmento do sabugo de milho roxo avaliando rendimento (R), teor de compostos fenólicos totais (FT – método de Folin e Ciocalteu), teor de antocianinas monoméricas totais (AMT – método de pH diferencial) e índice de atividade antioxidante (IAA – método de DPPH)

Identificar as antocianinas presentes no extrato liofilizado obtido em condições otimizadas do sabugo de milho roxo, usando espectrometria de massas (EM).

Aplicar o extrato liofilizado otimizado do sabugo de milho roxo em três sistemas modelos, para testar a estabilidade e capacidade tintorial do pigmento.

CAPITULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O MILHO ROXO

O milho roxo é uma variedade diferenciada de milho que apresenta uma forte pigmentação roxa tanto no sabugo como no pericarpo dos grãos, devido à grande quantidade de antocianinas presentes. O tradicionalmente chamado *maiz morado* é cultivado há séculos no Peru, e tem sido usado normalmente para a preparação de *chicha morada*, suco bebido no dia a dia, assim como da *mazamorra morada*, sobremesa tradicional na gastronomia peruana. Assim, seu uso tem sido restrito ao preparo do suco e sobremesa, perdendo possíveis subprodutos dele como a produção de amido a partir dos grãos ou a extração das antocianinas, componentes altamente desejáveis na atualidade por suas propriedades funcionais, além da capacidade tintorial.

Tem como nome científico *Zea mays L.*, pertence à família *Gramineae*, de variedade roxa (Lock, 1997). Uma classificação botânica mais detalhada, segundo Manrique (2001) é apresentada no Quadro 1.1:

Quadro 1.1 Classificação botânica do milho roxo

Ordem	Gramineae
Família	Gramineae
Sub-família	Panicoideae
Tribu	Tripsaceae (Maydeae)
Gênero	Zea
Espécie	mays L.
Grupo:	amilaceae st.

Fonte: Manrique, 2001

A composição química do milho roxo, segundo Collazos (1996), está apresentada no Quadro 1.2, onde se destaca a predominância dos carboidratos e o teor de fósforo, e na Figura 1.1 se apresenta uma ilustração do milho roxo.

Quadro 1.2 Composição química do milho roxo

COMPONENTES (por 100g)	
Calorias	357 kcal
Água	11,40 g
Proteína	7,30 g
Gordura	3,40 g
Carboidratos	76,20 g
Fibra	1,80 g
Cinza	1,70 g
Cálcio	12,0 mg
Fósforo	328,00 mg
Ferro	0,2 mg
Retinol	8 mcg
Tiamina	0,38 mg
Riboflavina	0,22 mg
Niacina	2,80 mg
Ac. Ascórbico Reduzido	2,1 mg

Fonte: Collazos, 1996



Figura 1.1 Ilustração do milho roxo (*Zea mays L.*)

Fonte: Amazon Botanicals, 2009

1.2 PRODUÇÃO PERUANA DO MILHO ROXO

A partir de 2003, a produção peruana de milho roxo começou a crescer a um ritmo de 19,3% ao ano, atingindo em 2006, 10,6 mil toneladas, e para o ano 2007, manteve-se nesse mesmo patamar (CENTRUM-PUCP, 2007; AYUDAPROJECTO, 2008). Em 2008, a produção nacional atingiu um valor de 13467,24 toneladas (INEI, 2009).

1.3 EXPORTAÇÃO PERUANA DE MILHO ROXO E SEUS DERIVADOS

As exportações do milho roxo em 2006 cresceram 14,7% em comparação aos anos 2001 – 2005 (CENTRUM AL DIA, 2007). Enquanto para 2007 as exportações somaram US\$ 492 000, em 2008 as exportações chegaram a US\$ 429 000 apenas no período de janeiro a outubro, registrando um crescimento de 48,5 % (Andina Del Perú, 2009).

As exportações de milho roxo peruano para o Brasil são pouco freqüentes. Estados Unidos e Japão são os principais compradores, representando 54,6 e 31,2% das exportações, respectivamente (CENTRUM AL DIA, 2007).

Em relação aos subprodutos do milho roxo, o principal item exportado tem sido o sabugo do milho (73,1%), seguido do concentrado (10%), extrato (6,2%) e suco (4,5%). O principal destino do sabugo do milho roxo em 2006 foi o Japão (CENTRUM AL DIA, 2007).

1.4 EXTRAÇÃO DO PIGMENTO

O método de extração do pigmento depende principalmente da finalidade para o qual está sendo extraído o material, da natureza dos compostos e da fonte ou matriz utilizada (Rodriguez-Saona e Wrolstad, 2001).

A extração sólido-líquido é uma das técnicas mais usadas e envolve a remoção de um ou mais compostos de um alimento, empregando-se um líquido que é capaz de dissolver o soluto. O processo pode ser realizado em um ou múltiplos estágios, por um tempo predeterminado, para então, separar o solvente (Fellows, 2006). Para a remoção das antocianinas, em diferentes matrizes, este método de extração é o mais empregado.

Sempre se deve maximizar o conteúdo dos compostos desejados com a mínima quantidade de outros compostos adjuntos e com a mínima degradação ou alteração do estado inicial *in vivo* da amostra. A extração não deve ser complexa, demorada, trabalhosa, nem de alto custo e deve consumir a menor quantidade de solvente possível (Rodriguez-Saona e Wrolstad, 2001).

A extração das antocianinas normalmente deve incluir o uso de ácidos, pois estes são capazes de desnaturar as membranas do tecido celular, facilitando a extração do pigmento e ajudando na sua estabilização. Contudo, sua utilização

deve ser realizada com cautela, pois em excesso, pode interagir com as antocianinas quebrando ligações com metais, copigmentos e outros (Rodriguez-Saona e Wrolstad, 2001). Extrações sem o uso de ácidos também foram sugeridas por Jackman et al. (1987) e Strack e Wray (1994).

O uso de ácidos mais fracos é recomendado para extração de antocianinas (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003), por isso, ácidos como o cítrico ou acético são aconselhados para evitar problemas de degradação ou quebra de ligações aciladas na estrutura antociânica. Apesar desta recomendação o ácido clorídrico, que é um ácido forte, ainda é o mais usado, sempre em concentrações baixas, para não causar hidrólise no momento da extração e posterior concentração do pigmento.

Dentre os solventes empregados na extração, o metanol é bastante eficaz na extração de antocianinas, especialmente as aciladas. Contudo, devido a sua toxicidade e potencial poluente, torna-se não apropriado para extrações que possam ser usadas posteriormente para consumo humano (Yong Ju e Howar, 2003; Finkelstein e Vardi, 2002). Além disso, o extrato resultante tem muitos co-extrativos de baixa polaridade, motivo pelo qual seria necessário realizar um processo de purificação complexo (Rodriguez-Saona e Wrolstad, 2001).

Assim como o metanol, outros solventes são comumente empregados para extração de antocianinas, como acetona e etanol. A escolha do solvente deve ser feita considerando características como viscosidade (que deve ser suficientemente baixa para permitir que o solvente penetre facilmente no leito de partículas sólidas), custo, segurança na manipulação, entre outras (Fellows, 2006).

Durante a extração líquido-sólido, o tempo de contato deve ser suficiente para que ocorra a transferência de massa do soluto para o solvente e para que as mudanças na composição deste último alcancem um equilíbrio (Fellows, 2006). Da mesma forma é aconselhado realizar várias extrações em períodos curtos de tempo (Ribereau-Gayon, 1982). A temperatura é um dos fatores determinantes em

diferentes tipos de extração, pois altas temperaturas aumentam tanto a taxa na qual o soluto se dissolve no solvente como a taxa de difusão no volume do mesmo. A maior parte das extrações deste tipo são realizadas a menos de 100°C por razões econômicas, pela extração de componentes indesejáveis em temperaturas muito altas ou por danos aos componentes do alimento (Fellows, 2006; Ribereau-Gayon, 1982). Wang (2007) menciona que em temperaturas superiores a 60°C ocorreu degradação de primeira ordem das antocianinas presentes em sucos de *blackberry*.

Outro fator de relevância na extração líquido-sólido é a área superficial dos sólidos expostos ao solvente. A taxa de transferência de massa é diretamente proporcional à área superficial. Assim, reduções no tamanho da partícula (provocando um aumento na área superficial) aumentam a taxa de extração (Fellows, 2006).

Fernandez (1995) estudou a extração de antocianinas a partir do grão moído de milho roxo e obteve um rendimento relativamente alto, embora, observou-se que obtinha um extrato com alto conteúdo de sólidos, devido ao alto teor de amido presente no grão.

1.5 LIOFILIZAÇÃO COMO TÉCNICA DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

O processo de liofilização gera um efeito conservante nos alimentos por meio da redução da atividade de água. Além disso, há uma maior manutenção da qualidade nutricional e de suas características sensoriais. Contudo, o custo para a realização do processo é bastante alto. Além do gasto com a compra de equipamentos, ainda existe o gasto energético para a geração de frio e a produção de vácuo. Entretanto, pesquisas como as realizadas por Nijhuis (1998) demonstraram que os consumidores estariam dispostos a pagar preços mais altos por uma qualidade superior de um alimento.

A liofilização de um alimento é realizada por meio dos estágios de *congelamento*, necessário para produzir pequenos cristais de gelo e reduzir os danos a estrutura celular do alimento. Quando o congelamento acontece em líquidos se formam redes de cristais de gelo que originam canais para o movimento de vapor de água. A *exposição do alimento a um sistema de vácuo*, e o conseqüente *aquecimento* (mínimo) para que o gelo sólido sublime diretamente para vapor sem se fundir. O vapor de água é continuamente removido do alimento mantendo-se a pressão de vapor na superfície do gelo pela remoção do vapor e condensação numa serpentina de refrigeração.

Dentre as vantagens que um alimento liofilizado apresenta, destacam-se: mudanças estruturais ou encolhimento mínimo, partículas secas e porosas com uma densidade mais baixa do que o alimento original, odor e sabor comumente normais, cor comumente normal, nutrientes retidos em grande proporção, reidratação rápida e completa.

Devido à propriedade de hidrosolubilidade das antocianinas, a liofilização torna-se um bom método de conservação e estabilização para prevenir a descoloração e a perda da atividade antioxidante (Socaciu, 2008; Delgado–Vargas e Paredes–López, 2003). Wrolstad et al. (2005) também mencionam que processos de extração e armazenamento a baixas temperaturas podem melhorar a estabilidade das antocianinas.

1.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Além disso, são produzidos em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, entre outros (Naczk e Shahidi, 2004). Nas plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e

cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Sousa et al., 2007).

Caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. A maior parte dos compostos fenólicos não são encontrados na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (Carpes, 2008). Os polifenóis são efetivos doadores de hidrogênios, particularmente os flavonóis. Sua potencialidade antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação, assim como a presença de elétrons doadores no anel estrutural (Miller e Rices-Evans, 1997).

São facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas quanto pela influência de metais, luz, calor ou meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados (Simões, 1999).

Dentre os polifenóis existem dois grandes subgrupos, os flavonóides e os não flavonóides. Entre os flavonóides estão as antocianidinas, unidade estrutural das antocianinas.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos principais: benzóicos, cinâmicos e cumáricos. Os ácidos derivados do benzóico sofrem substituições nas posições meta, dando origem, por exemplo, ao ácido gálico (Mamede e Pastore, 2004).

1.7 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são o grupo mais importante de compostos fenólicos em alimentos. Sua estrutura comum é o difenil propano ($C_6-C_3-C_6$), que consiste de dois anéis aromáticos interligados por três carbonos que geralmente formam uma estrutura heterocíclica oxigenada (Bravo, 1998). O sistema de numeração usado

para diferenciar as posições dos carbonos ao redor da molécula dos flavonóides utiliza por conveniência numeral ordinário para os anéis A e C, e numeral ordinário seguido de apóstrofe para o anel B, como mostrado na Figura 1.2 (Carpes, 2008).

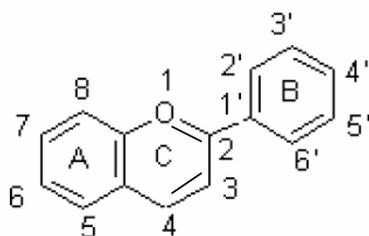


Figura 1.2 Sistema de numeração de um flavonóide.

1.8 ANTOCIANINAS

As antocianinas (do grego *anthos*, flor; e *kyanos*, azul escuro) são flavonóides comumente encontrados na natureza. Sua estrutura é básica e formada por um esqueleto de 15 carbonos, que consiste em um anel cromo, carregando um segundo anel B na posição 2. As estruturas cíclicas estão arranjadas no padrão C₆-C₃-C₆ (2-fenilbenzopirilium), também chamado de flavilium (Bobbio e Bobbio 2003). As estruturas das antocianidinas (agliconas) estão complementadas por uma ou mais moléculas de açúcares formando as antocianinas, as quais estão ligadas em diferentes posições da estrutura básica, como é mostrado na Figura 1.3 e no Quadro 1.3 (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003).

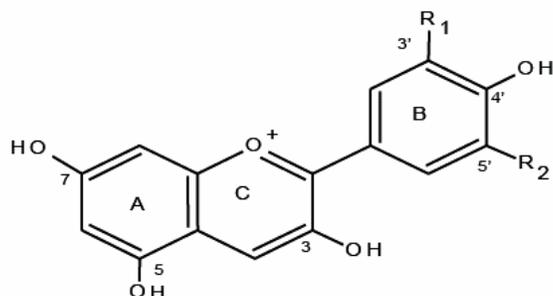


Figura 1.3 Estrutura básica das antocianidinas.

Quadro 1.3 Grupos substituintes das antocianinas a partir da estrutura básica das antocianidinas.

Antocianidina	Abrev.	Grupos substituintes		C ₃	C ₅	C ₇	λ (nm) Máx	Peso molecular	Cor	Fontes
		R1	R2							
Pelargonidina	Pg	H	H	OH	OH	OH	520	271	Vermelho Laranja	Acerola Pitanga
Cianidina	Cy	OH	H	OH	OH	OH	535	287	Vermelho	Cereja Uva
Delfinidina	Dp	OH	OH	OH	OH	OH	546	303	Violeta	Beringela Romã
Peonidina	Pn	OCH ₃	H	OH	OH	OH	523	301	Púrpura	Jabuticaba Uva
Petunidina	Pt	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	543	317	Violeta	Uva Petunia
Malvidina	Mv	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	542	331	violeta	Uva Acerola

São responsáveis por uma faixa de cores em plantas que incluem o azul, roxo, violeta, púrpura, vermelho e laranja (Fennema, 1996; Carbajal, 2006). Além de contribuir com a cor das flores, frutas e cereais, atuam como filtros das radiações ultravioletas nas folhas e em certas espécies de plantas, estão associados com a resistência aos patógenos e atuam melhorando e regulando a fotossíntese. Segundo Tsuda (1996) a principal antocianina responsável por esta proteção seria a cianidina-3-o- β -glicosídeo, que demonstrou ter uma força de prevenção em células gordurosas, contra o dano causado pela exposição a raios UVB, de até 40 vezes maior que a vitamina E.

Das 16 diferentes antocianidinas de ocorrência natural, apenas 6 antocianidinas são importantes nos alimentos: cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Francis, 1978), as quais estão representadas na Figura 1.4, segundo a coloração que podem apresentar.

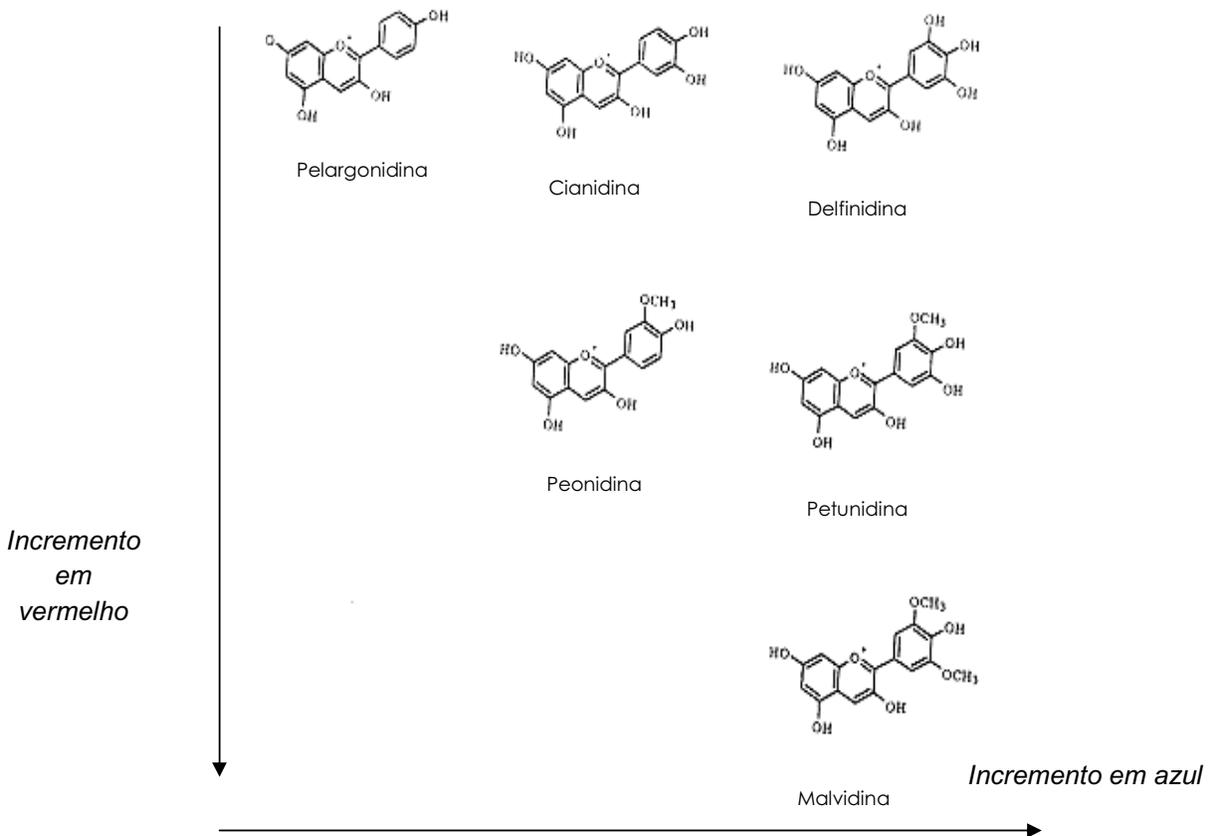


Figura 1.4: Tendência da coloração apresentadas pelas antocianinas (Fonte: Fennema, 1996)

Os pigmentos antociânicos têm sido tradicionalmente usados para dar cor a alimentos ácidos, geralmente com pH abaixo de 3, como sucos de frutas ou geléias, embora, as antocianinas tenham sido relatadas como estáveis quando foram utilizadas para adicionar cor a produtos com pH neutro ou ligeiramente

alcalino (Jing, 2006). Na Tabela 1.1 é apresentado o perfil antociânico de diferentes matrizes.

Tabela 1.1 Perfil antociânico de alguns alimentos

Matriz	Antocianinas presentes
Rabanete	Pg-3-soph-5-gli acilados com: ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, e ácido malônico
Batata vermelha	Pg-3-rutina, Pg-3-ácido <i>p</i> -cumárico, Pg-3-3rutina-5-gli, acilado com ácido <i>p</i> -cumárico ou ácido ferúlico
Cenoura negra	Cy-3-gal-xyl, Cy-3-gal-xyl-gli, Cy-3-gal-xyl acilado com ácido <i>p</i> -cumárico,

Fonte: Giusti e Wrolstad (2003)

As antocianinas comumente relatadas no milho roxo são a cianidina-3-*o*-glicosídeo, pelargonidina-3-*o*-glicosídeo, peonidina-3-*o*-glicosídeo, cianidina-3-galactosídeo livres e acilados (Lock, 1997; Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003; Carbajal, 2006; Jing, 2006).

Também foram encontrados outros derivados por Pascual-Teresa (2002), como cianidina-3-(6''-etilmalonilglucosídeo), pelargonidina-3-(6''-etilmalonilglucosídeo) e peonidina 3-(6''-etilmalonilglucosídeo), enquanto Aoki et al (2002) encontrou uma acilação dimalonil na cianidina.

1.8.1 Estrutura das antocianinas

A maioria das antocianinas em alimentos contém um ou duas unidades monossacarídicas comumente na posição 3 da estrutura, algumas vezes nas

posições 3,5 e mais raramente na posição 3,7. Os açúcares estão ligados às antocianidinas através de uniões hemiacetálicas. A glicose é o açúcar mais comum unido às antocianinas dentro da composição de muitos alimentos, sendo que a maioria das vezes esta ligada na posição 3 ou às vezes na posição 3,5 (Mercadante e Bobbio, 2008).

As antocianinas se encontram conjugadas normalmente com ácidos hidroxicinâmicos, como *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sináptico e 3,5-dihidroxicinâmicos, ou com ácidos alifáticos como malônico, acético, oxálico, succínico e tartárico. A acilação pode conceder às antocianinas maior estabilidade na coloração por protegerem a aglicona fortemente (Mercadante e Bobbio, 2008).

1.8.2 Estabilidade e fatores que afetam as antocianinas

Os fatores mais importantes relacionados com a cor e estabilidade das antocianinas são temperatura, luz, pH, estrutura química da antocianina, matriz e concentração do pigmento. Existem também outros fatores importantes como a presença de copigmentos, íons metálicos, enzimas e ácido ascórbico ou açúcares (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003; Jing, 2006).

pH. A forma de *cátion flavilium*, é a forma mais estável em que pode se encontrar uma antocianina. Tem quatro espécies presentes a 25 °C segundo a variação do pH (Mercadante e Bobbio, 2008), como mostrado na Figura 1.5. O valor da constante de equilíbrio determina a maior quantidade de espécie de antocianina presente, e portanto a coloração da solução. Se a desprotonação da constante de equilíbrio (K_a) é maior do que a da constante de hidratação (K_h), o equilíbrio é deslocado a base quinonoidal coloreada (A), e se K_h é maior que K_a o equilíbrio é deslocado em direção às formas de hemiacetal ou pseudobase (B), que está em equilíbrio com a espécie chalcona (C) e ambos são incolores. Por

conseqüência, a estrutura da antocianina e por tanto a coloração da solução, é fortemente dependente do pH (Mercadante e Bobbio, 2008).

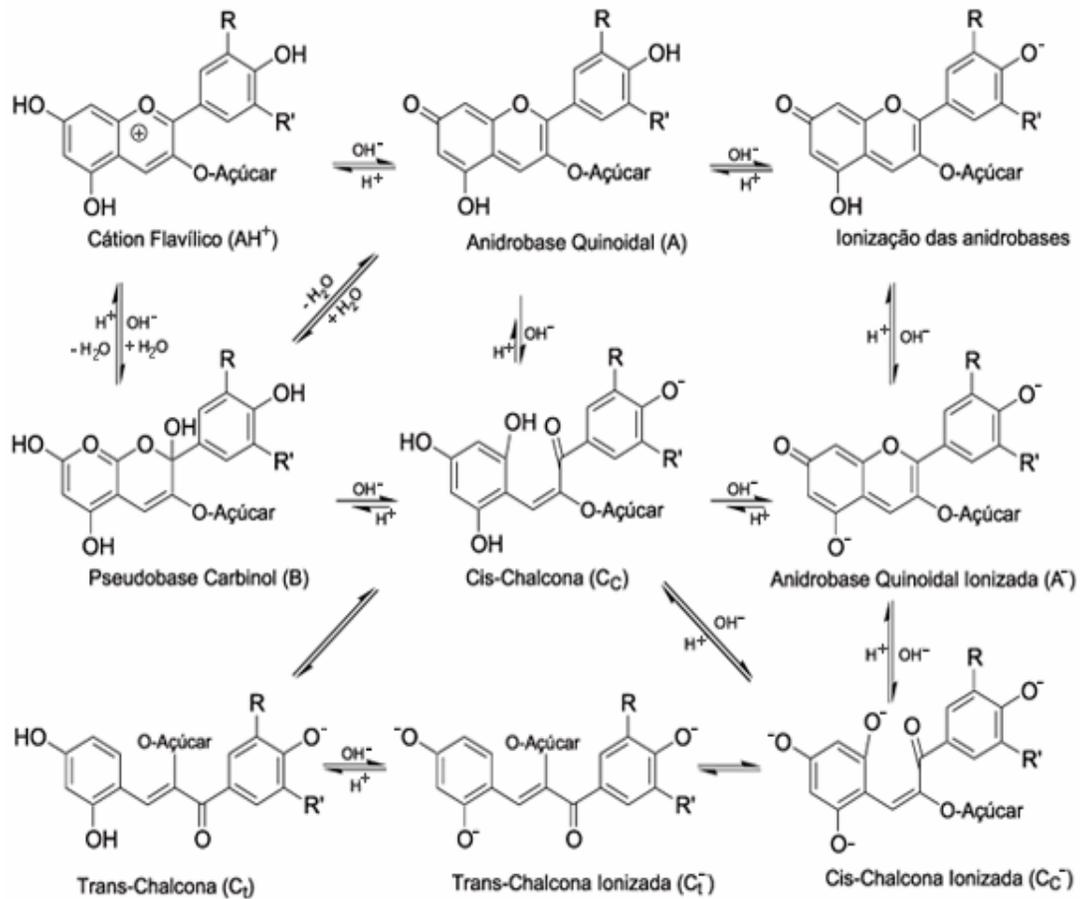


Figura 1.5: Transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.

Fonte: Mercadante e Bobbio (2008)

Matriz. A possível degradação de uma antocianina varia fortemente dependendo da sua estrutura. Geralmente ao incrementar a hidroximetilação

diminui a estabilidade, e ao incrementar a metilação incrementa a estabilidade (Fennema, 1996).

Copigmentação. A pigmentação de uma planta que contém antocianinas é influenciada por outras substâncias como as flavonas, que atuam como copigmentos afetando assim suas propriedades (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003). Existem dois tipos de copigmentação, a intermolecular e a intramolecular. A copigmentação intermolecular é um fenômeno observado com antocianinas que reagem com vários tipos de grupos químicos. Ocorre uma indução para um deslocamento a um comprimento de onda maior, tendo como resultado intensidades maiores de vermelho, acoplados com um aumento grande na absorvidade, fornecendo propriedades tintoriais melhoradas (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003). Flavonas, auronas e flavonóis mostram as mais significantes mudanças de cor e potencialidades de pigmentação ao se complexar com antocianinas. Em altas concentrações do pigmento, um efeito azulado geralmente é observado, a tonalidade das soluções muda de vermelho magenta para magenta roxo a pH 5,5, já em baixas concentrações um efeito amarelo é observado. Na copigmentação intramolecular ocorre à complexão da antocianina com ácidos ou *acilação*. Desta maneira, a hidrólise de antocianinas fica dificultada enquanto a formação de bases quinonoidais é favorecida, mostrando melhor estabilidade a pH elevados do que aqueles que não apresentam acilação. Um bom exemplo de acilação é a que ocorre nas “cerejas ao marrasquino” que têm pelo menos 6 meses de vida de prateleira a 25°C, cuja estabilidade é associada à presença de pelargonidina aciladas (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003). A acilação com ácido cinâmico produz um efeito batocrômico na absorbância do pigmento, com um leve efeito azul, enquanto que a substituição do açúcar tem um efeito hipsocrômico (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003). A função básica da copigmentação é proteger o cátion flavílium (que apresenta cor) do ataque nucleofílico da molécula da água. Adicionalmente, outro fenômeno que contribui

para a manutenção da cor é a auto-associação destas moléculas, e algumas vezes complexos metálicos estão envolvidos.

Luz. As agliconas são rapidamente afetadas pela luz. A cianidina exposta à luz difusa em meio ácido diminui em 10% sua concentração em 6 horas, e a exposição da luz direta do sol, a perda pode chegar a 95%. As antocianinas aciladas são menos afetadas pela luz, segundo uma pesquisa realizada por Palamidis e Markakis (1975) numa bebida gaseificada com antocianinas de uva.

Enzimas. As antocianinas podem ser degradadas por sistemas enzimáticos nos tecidos de plantas como as glicosidases, polifenoloxidasas e peroxidases (Mercadante e Bobbio, 2008).

Temperatura. A temperatura é uns dos principais fatores na degradação das antocianinas. Com algumas exceções as antocianinas submetidas ao tratamento térmico em condições aeróbicas ou anaeróbicas, seguem uma cinética de primeira ordem (Mercadante e Bobbio, 2008).

Oxigênio e Peróxido de Hidrogênio. São os agentes catalisadores da degradação de pigmentos, em diversas frutas e vegetais. A concentração de antocianinas se mantém notavelmente em atmosfera inerte ou no vácuo. Além disso, também há destruição das antocianinas induzidas pelo ácido ascórbico em interação com oxigênio, resultando na formação de H_2O_2 durante a oxidação deste ácido (Horbowicz et al., 2008)

Congelamento. O dano causado por temperaturas de congelamento é atribuído principalmente à destruição da membrana celular das plantas pelo oxigênio ativo e outros radicais livres. Contudo, os fenóis presentes nas plantas previnem a formação de radicais livres, diminuindo os danos causados pelo congelamento.

1.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS ANTOCIANINAS

A atividade antioxidante (AA) das antocianinas tem sido avaliada com uma variedade de metodologias, como o FRAP (ferric reducing ability of plasma), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), ESR (Eletron spin resonance), β -caroteno/ácido linoléico, ABTS (2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate)) e DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Alguns autores concordam em que o potencial antioxidante está associado a presença de grupos hidroxilas no anel B das antocianinas (Horbowicz et al.,2008), e se vê incrementado pela maior presença de grupos metoxilas no mesmo anel.

Mas a discussão de qual metodologia é a melhor para determinar a AA foi avaliada por Aquaviva (2003), que chegou a conclusão que os ensaios com o radical DPPH são mais representativos e exatos frente a outras existentes. Também foi discutida por Kuskoski (2004) e Kuskoski (2005) ao avaliar a AA de polpas de frutas por três métodos citados anteriormente, concluindo que o método com o radical ABTS foi o melhor por ser rápido, com resultados reproduzíveis e coerentes, enquanto que os dados obtidos por DPPH apresentaram a desvantagem do tempo necessário para a reação. Por último, o método com DMPD (N,N-dimetil-p-fenilenediamina) foi definido como não confiável, por ter apresentado resultados pouco reprodutíveis e incoerentes.

O DPPH é um radical amplamente usado para monitorar e avaliar a habilidade seqüestrante ou de captura de alguns antioxidantes. Tem sido testado com diferentes concentrações do radical, sendo justamente uns dos temas de discussão no momento da escolha do método. Kano et al. (2005) estudou a atividade antioxidante das antocianinas de batata roxa em ratos e humanos, relatando o ensaio com DPPH como muito útil, exato e confiável.

1.10 METODOLOGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS

Muitos sistemas têm sido desenvolvidos para a separação, detecção e quantificação de compostos fenólicos. A cromatografia líquida é uma das principais metodologias empregadas com este propósito por ser muito eficiente (Peres, 2007).

No caso das antocianinas, são comumente usadas colunas de fase reversa (FR), com sistemas de eluição geralmente binários, usando soluções aquosas acidificadas e um solvente orgânico como modificador (Merken e Beecher, 2000).

A detecção é feita na região do UV-VIS. As antocianinas mostram duas faixas máximas de absorção, as quais podem ser de 265 a 280 nm ou de 465 a 560 nm, normalmente a intensidade é maior na segunda faixa de absorção. Os típicos comprimentos de onda para análise e quantificação de antocianinas são 502, 510, 520 e 525 nm, em virtude da menor interferência da matriz (Merken e Beecher, 2000).

Normalmente, em fase reversa os ácidos fenólicos mais polares eluem primeiro, seguido das antocianinas diglicosiladas, as monoglicosiladas, seguido das agliconas e finalmente pelas antocianinas aciladas. A ordem de eluição das antocianinas nessa condição segundo o tempo de retenção é delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina (Horbowicz, 2008).

Outro método eficiente e moderno para identificação das antocianinas é a espectrometria de massas (EM) (Giusti et al., 1999). A EM tem se tornado uma ferramenta indispensável em laboratórios analíticos modernos, tanto como instrumento utilizado isoladamente, quanto acoplados a uma técnica de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência. A ionização por *electrospray* (ESI) é uma técnica de ionização que utiliza baixas voltagens e pressão atmosférica. Nessas condições, as antocianinas são facilmente ionizadas e assim detectadas, enquanto que outros compostos da matriz não são protonados.

1.11 ANÁLISE DA COR

A cor é uma percepção visual de um objeto, provocada pela ação de um feixe de fótons sobre células especializadas da retina, que transmitem através de informação pré-processada no nervo óptico, impressões para o sistema nervoso. Está relacionada aos diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético e são percebidas pelas pessoas em uma pequena faixa específica ou zona do visível, podendo então assumir diversas cores, desde o violeta até o vermelho, em função do comprimento de onda.

A cor pode ser avaliada visualmente ou pode ser avaliada objetivamente, seja com um colorímetro ou um espectrofotômetro. Com a intenção de quantificar objetivamente a cor apresentada por um objeto, existem três parâmetros visuais que devem ser tomados em conta. A *luz* incidente, que fornece a energia espectral necessária para apreciar a cor, o *objeto*, que modifica a energia espectral que vem da fonte de energia e o *observador*, cuja mente e olho percebem a cor e aparência. (Hunterlab, 2008)

A *Comission Internationale de l'Éclairage* (CIE), propôs um método para a representação numérica de cores utilizando a escala x, y, Z , a qual foi modificada e aumentada com os descobrimentos de Hunter, cientista reconhecido por seus estudos com cor e aparência, que avaliou a cor na escala, a, b e L , baseada na teoria das cores opostas, onde " a^* " representa a dimensão do vermelho – verde (valores positivos são classificados como vermelhos e negativos como verde), " b^* " representa a dimensão do azul – amarelo (valores positivos são classificados como azuis e negativos como amarelo) e " L^* " representa a luminosidade (valor 100 é branco e 0 é negro). Atualmente a escala mais usada para medir cor é CIEL^{*} a^*b^* .

1.12 DELINEAMENTOS COMPOSTOS CENTRAIS ROTACIONAIS (DCCRs) E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA (RS)

O planejamento experimental é uma metodologia que permite a avaliação de várias variáveis sobre uma ou mais respostas com a finalidade de encontrar a melhor condição que satisfaça o processo que está sendo avaliado. Os resultados são atingidos através de combinações realizadas entre os diferentes níveis de cada uma das variáveis que afetam o processo, dando lugar a ensaios multivariados, os quais permitem visualizar os efeitos de cada variável independente da outra, assim como, da interação entre elas. Dessa forma, evita-se realizar longos e extensos ensaios univariados, os quais muitas vezes se aproximam, mas não chegam na melhor condição para o processo estudado (Rodrigues e Lemma, 2005).

As superfícies de resposta são a representação gráfica tridimensional das respostas obtidas através dos planejamentos. Permitem visualizar de forma rápida e específica as condições apropriadas para a maximização dos resultados desejados.

Os processos de extração de antocianinas de diferentes alimentos não são simples, já que, para atingir o máximo de extrato e manter as condições que ajudem na estabilidade dos analitos têm que ser encontradas as melhores condições para cada um dos fatores que influem nelas. Por isso, esses delineamentos estão sendo cada vez mais empregados. Por exemplo, Yang et al. (2008) utilizaram um planejamento experimental fatorial ($2^2 \times 3^2$) para atingir a extração de antocianinas em milho roxo usando como variáveis independentes os parâmetros de cor do sistema CIEL*a*b*.

1.13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAZON BOTANICALS LLC, Fornecedores de herbas e remédios orgânicos, disponível em:

http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.amazon-botanicals.com/v/vspfiles/assets/images/purple%2520corn.jpg&imgrefurl=http://www.amazon-botanicals.com/&usq=__oCBkBgq3BsJEFzrU2pl6fWR61ys=&h=375&w=375&sz=60&hl=pt-BR&start=19&sig2=0iEi70iKKsp_fmKoeipiQ&tbnid=jMb98x2eaZkEMM:&tbnh=122&tbnw=122&prev=/images%3Fq%3Dpurple%2Bcorn%26ndsp%3D20%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DN&ei=GGGkSrSEE9extwfa3p3qDw, Acesso em: 22 julho 2009

AGRONOTICIAS, **Revista para el desarrollo**, Año XXV. Edición 279, Lima, Peru, 2003.

AQUAVIVA R.; RUSSO A.; GALVANO F.; GALVANO G.; BARCELLONA M. L.; LI VOLTI G.; Vanella A., Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants, **J. Cell Biol Toxicol**, 19 (4): 243-252, 2003.

ANDINA DEL PERÚ, agencia de noticias, disponível em:

<http://exportacionesdelperu.blogspot.com/2008/12/exportaciones-de-maz-morado-crecen-en.html>. Acesso em: 22 março 2009.

AOKI H.; KUZE N.; KATO Y., Anthocyanins Isolated from Purple Corn (*Zea mays* L.), **Foods & Food Ingrid J Jpn**, 199: 41-45, 2002.

AYUDA PROYECTO, **Boletín económico** n49, do dia 17/04/2008, disponível em: <http://www.ayudaproyecto.com/boletin/49.htm>. Acesso em 28 agosto 2008

BOBBIO F.; BOBBIO P., Introdução a química de alimentos, terceira edição, Brasil, 2003.

BRAVO L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, 56 (11): 317-333, 1998.

CARBAJAL F. M., **Extração de corantes naturais e óleos essenciais**. Tese de doutorado, Universidade Estadual De Campinas, Brasil, 2006.

CARPES, S. T., **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de apis mellifera L. da região sul do Brasil**, Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2008.

- CENTRUM AL DIA: **Boletín electrónico de negocios**. Pontificia Universidad Peruana del Perú, 2007. Disponible no link:
http://www.centrum.pucp.edu.pe/CentrumAIDia/19032007/Centrumaldia_19032007.htm
http://www.centrum.pucp.edu.pe/CentrumAIDia/20032007/Centrumaldia_20032007.htm
- COLLAZOS, C., Tablas Peruanas de Composición de los Alimentos. Ministerio de salud. Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición Lima, Perú, 1996.
- DELGADO-VARGAS F.; PAREDES-LOPEZ O., Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC press, 2003.
- FELLOWS P.J., Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e prática, 2da edição, Brasil, 2006.
- FENNEMA, O., Food Chemistry, Third edition, Marcel Dekker, Inc. New York, EUA, 1996.
- FERNÁNDEZ F. N., **Estudios de la extracción y pre-purificación de antocianinas de maíz morado (Zea mayz L.)** Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima Perú, 1995.
- FINKELSTEIN Y., VARDI J., Progressive Parkinsonism in a young experimental physicist following long-term exposure to methanol, **Neurotoxicol J**, 23 pgs. 521-525, 2002.
- FRANCIS F. J., Anthocyanins in current: Aspects of food colorants, Furia, T editorial CRC press, USA, pp 19-27, 1978.
- FUKAMACHI K.; IMADA T.; OHSHIMA Y.; XU J.; TSUDA H., Purple corn color suppresses rās protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat, **J. Cancer Sci**, 99 (9): 1841-1846, 2008.
- GIUSTI M.; RODRIGUEZ-SAONA L. E.; GRIFFIN D.; WROLSTAD R. E., Eletrospray and tandem spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **J. Agric Food Chem**, 47: 4657-4664, 1999.
- HAGIWARA A.; MIYASHITA K.; NAKANISHI T.; SANO M.; TAMANO S.; KADOTA T.; KODA T.; NAKAMURA M.; IMAIDA K.; ITO N.; SHIRAI T., Pronounced

- inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PHIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine., **J. Cancer Letters**, 28 (1): 17-25, 2001.
- HORBOWICKZ M.; KOSSON R.; GRZESIUK A.; DEBSKI H., Anthocyanins of fruits and vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. Vegetable, **Crops Research Bulletin** 68: 5-22, 2008.
- HUNTERLAB, aplicaciones note: *Insight on color* Vol 12 (5),2008. disponível em: http://www.hunterlab.com/appnotes/an05_00.pdf. Acceso em: 25 julho 2009
- INEI, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA, **Información económica**, sector real de producción, sector agropecuario, sector agrícola, 2009. Disponível em: <http://www1.inei.gob.pe/web/aplicaciones/siemweb/index.asp?id=003>, Acceso em: 14 junho 2009
- JACKMAN R. L.; YADA R. Y.; TUNG M. A., A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **J. Food Biochem.** 11: 279-308, 1987.
- JING P., **Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships**. Tese de doutorado, The Ohio State University, EUA, 2006.
- KANO M.; TAKAYANAGI T.; HARADA K.; MAKINO K.; ISHIKAWA F., Antioxidant activity of anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoera batatas* cultivar Ayamurasaki. **Biosci. Biothechnol Biochem.** 69(5): 979-988, 2005.
- KUSKOSKI E. M.; ASUERO A. G.; GARCÍA-PARILLA C.; TRONCOSO ANA M.; FETT R., Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciên. Tecnol Alim.**, 24(4): out/dez, 2004.
- KUSKOSKI E.M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO A. M.; MANCINI-FILHO J.; FETT R., Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciên. Tecnol Alim.**, 25(4)out/diz, 2005.

- KUSKOSKI E.M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO A. M.; MORALES M. T.; FETT R., Frutos Tropicales silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, 36(4)1283-1287, 2006.
- LOCK, O., Colorantes Naturales. Fondo Editorial de la PUCP, Lima Perú, 1997.
- MAMEDE, M.; PASTORE G., Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da Serra Gaúcha (RS). *Ciênc Tecnol Alim*, UNICAMP, 24(3), p. 453-458, 2004.
- MERKEN H. M, BEECHER G. R., Measurement of food flavonoids by High – Performance Liquid Chromatography: A Review, **J Agricul Food Chem**; 48(3):577-599, 2000.
- NACZK M.; SHAHIDI F., Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A.**, 1054(2): 95-111, 2004.
- NESS A. R.; POWLESS J. W., Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a Review. *Int. J. Epidemiol.*, 26: 1-13, 1997.
- NIJHUIS H. H., Approaches to improving the quality of dried fruit and vegetables. *Trends in Food Sci Technol* 9, 13-20, 1998.
- MANRIQUE A., Maiz Morado Peruano (*Zea mays L. amilaceae st*), Agroenfoque, Lima, Perú, Año XVI, n 126M, 2001.
- MERCADANTE A.; BOBBIO F., Anthocyanins in Food: Ocurrance and physiochemical Properties. In: Food colorant: chemical and functional, 01/2008, ed. 1, CRC, Vol. 1, pp. 36, pp.241-276, 2008.
- MILLER, N.J.; RICES-EVAN, C.A., The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chem.** 60(3), pp. 331-337, 1997.
- PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P., Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. **J Food Sci**, 40: 1047-1049, 1975.
- PASCUAL-TERESA S.; SANTOS-BUELGA C.; RIVAS-GONZALO J., LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. **Journal Sci food agric.** 82:1003-1006, 2002.

- PIMENTEL C. V. M. B.; FRANCK V. M.; GOLLUCKE A.P.B., Introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. In livro: Alimentos funcionais, Editorial Varela, Brasil, 2005.
- PEDRESCHI R.; CISNEROS-ZEVALLOS L., Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from andean purple corn (*Zea mays* L.) **J Agric Chem.**54:4557-4567, 2006.
- PERES, R., **Aplicações de CE-DAD e HPLC-DAD-ESI/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas.** Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
- RIBÉREAU-GAYÓN P., The anthocyanins of grapes and wines. In: Markakis P. (Ed) Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, p. 209-242, 1982.
- RODRIGUES M. I., IEMMA A. F., Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. Primeira edição, Editora Casa do Pão, Brasil, 2005.
- RODRIGUEZ-SAONA L. E.; WROLSTAD, R. E., Unit F1.1: Anthocyanins. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Willey: New York; pp F1.1.1 – F1.1.11, 2001.
- SIMÕES C.; SCHENKEL E.; GOSM ANN G.; PALAZZO J.; MENTZ L.; PETROVICK P., Farmacognosia: da planta ao medicamento, Editora da UFSC, 821p, Brasil, 1999.
- SOCACIU C., Updated technologies for extracting and formulating food colorants. In Socaciu C. (ed.), Food Colorants: Chemical and Functional Properties, pp. 303-329. CRC Press, Taylor & Francis, 2008.
- SOUSA, C.; SILVA H.; VIEIRA-JR G.; AYRES M.; COSTA L.; ARAÚJO D.; CAVALCANTE L.; BARROS E.; ARAÚJO P.; BRANDÃO M.; CHAVES M., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2) 351-355, 2007.
- STRACK D., WRAY V., The anthocyanins: In *The Flavonoids*. Harborne J. B., Ed.; Chapman and Hall: London, U.K., 1994.

- TSUDA T.; SHIGA K.; OHSHIMA K.; KAWAKISHI S.; OSAWA T., Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L., **Biochem Pharmacol.**; 52(7):1033-1039, 1996.
- WANG W.; XU S., Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **J. Food Engineering.** 82:271-275, 2007.
- WROLSTAD R. E.; DURST R. W.; LEE J., Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends Food Sci Technol.** 16, 423-428, 2005.
- YANG Z.; FAN G.; GU Z.; HAN Y.; CHEN Z., Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry, **Eur Food Technol**, 227: 409-415, 2008.
- YOKOHIRA M.; YMAKAWA K.; SAOO K.; HOSOKAWA K.; HASHIMOTO N.; KUNO T.; IMADA K., Antioxidant effects of flavonoids used as food additives (purple corn color, enzymatically modified isoquercitrin and isoquercitrin) on liver carcinogenesis in rat medium-term bioassay. **J. Food Science**, 73(7):c561-8, 2008.
- YONG JU Z.; HOWAR L R., Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. **J Agric Food Chem** (51):5207-5213, 2003.

CAPITULO 2

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO PIGMENTO DE MILHO ROXO A PARTIR DO SABUGO, USANDO A METODOLOGIA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Cerro-Quintana, Romina Sofia; Godoy, Helena Teixeira

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

RESUMO

O milho roxo tem demonstrado ser uma boa fonte de compostos fenólicos, especialmente de antocianinas, as quais são responsáveis por cores como laranja, vermelho, roxo, violeta e azul, presentes em frutos, flores e folhas. O uso das antocianinas é restrito por algumas limitações, como o alto custo de produção, complexas operações no processo de obtenção, baixo rendimento, baixa qualidade dos extratos, instabilidade e dificuldade no armazenamento. Este trabalho teve como objetivo a otimização da extração desses pigmentos presentes no sabugo do milho roxo empregando a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta. Foi estudado o efeito das variáveis: solvente empregado, composição do solvente, tempo e temperatura de extração, número de extrações e pH do meio, sobre as respostas: rendimento (R), teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), compostos fenólicos totais (FT) e o índice de atividade antioxidante (IAA). O melhor método de extração foi o realizado com água como solvente, realizado nas condições de pH 4, 50°C, 1 g de amostra, 3 extrações e 60 minutos de extração, obtendo-se um rendimento de 22,4 g/100g, teor de 1293,81 mg de AMT expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo/100g, com IAA de 1,1, equivalente a 4,2% comparado ao IAA do ác. gálico, e um teor de FT de até 1823,90 mg EAG/100g.

Palavras chave: milho roxo, antocianinas, compostos fenólicos, atividade antioxidante, planejamento experimental, superfície de resposta.

OPTIMIZATION OF PURPLE CORNCOB (*Zea mays L.*) PIGMENT EXTRACTION PROCESS USING DESIGNS OF EXPERIMENTS (DOEs)

ABSTRACT

Purple corn has been demonstrated as a great source of phenolic compounds, specially anthocyanins, since they are the responsible for orange, red, purple, violet and blue colors present on fruits, flowers and leaves. The use of anthocyanin pigments has been restricted because of some limitations like high cost of production, hard and difficult operations for obtaining the pigment, low yield, low stability of extracts, regular quality of final product and problems during storage. The aim of this project was to optimize the extraction method of these pigments present on purple corncob using the methodology of design of experiments and analysis of surface response. It was studied the effect of variables: solvent, composition of the solvent, time and temperature extraction, number of extractions, sample mass and pH, over the following responses: content of total monomeric anthocyanins (AMT), total phenolic compounds (FT) and antioxidant activity index (IAA). The best extraction method was gotten using water as solvent, with pH 4, 50°C, 1 g of sample, 3 extractions and 60 minutes, obtaining a total extract yield of 22,4 g/100g, 1293,81 mg of total monomeric anthocyanins, expressed as mg of cyanidin-3-glicoside/100g, an antioxidant activity index of 1,1, and a total phenolic compounds yield of 1823,90 mg EAG/100g.

Key words: anthocyanins, phenolic compounds, antioxidant activity, purple corn, DOEs, RS, optimization.

INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm relatado a importância e os benefícios que os compostos fenólicos, e em especial as antocianinas, tem sobre o organismo humano. Ações antioxidantes, antimutagênicas, antimicrobianas, contra obesidade, hipertensão, doenças coronárias, inflamações, prevenção à perda da visão, diminuição do risco de câncer, entre outras, foram encontradas por autores como Pedreschi e Cisneros-Zevallos (2006), Jing (2006), Kuskoski (2004), Kuskoski (2005), Agronoticias (2003), Hagiwara et al. (2001), Pimentel et al. (2005), Ness e Powless (1997), Yokohira et al. (2008) e Fukamachi et al. (2008).

Tais ações devem-se ao fato dos compostos fenólicos, em geral, serem capazes de doar elétrons ou hidrogênios para o composto radical com que esta interagindo, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs), etc. conseguindo estabilizá-los e reduzi-los, evitando mudanças na estrutura do composto (Angelo e Jorge, 2007).

Os compostos fenólicos estão presentes em grandes quantidades em matrizes como erva-mate, guaraná, frutas cítricas, grãos, folhas e raízes (Padda e Picha, 2008; Kuskoski, 2006; Hodzic et al., 2009) e têm sido corroborados como compostos bioativos, capazes de retardar o estresse oxidativo sofrido pelas células do organismo humano, portanto, necessários na dieta para manter um balanço químico (Sousa et al., 2007; Garzón, 2008).

As antocianinas, por terem grande potencial para substituir os corantes sintéticos em alimentos, são motivo de muitas pesquisas. Assim, o milho roxo é uma fonte importante (e pouco explorada) a ser estudada considerando o seu possível uso como corante alternativo nos alimentos.

Para a extração do pigmento geralmente é empregado metanol. Contudo, este solvente é tóxico para consumo e tem sido declarado, inclusive, como prejudicial por meio de sua exposição a longo prazo, podendo causar doenças como o mau de Parkinson (Finkelstein e Vardi, 2002). Diferentes pesquisas têm testado vários tipos de extração para atingir o máximo de rendimento, tanto de fenóis totais quanto de antocianinas. A acetona, o etanol e a água são os solventes mais freqüentemente usados para a extração, devido a o seu caráter polar, que resulta em afinidade com compostos fenólicos em geral. Para as antocianinas é recomendado realizar a extração em meio acidificado para manter as condições de cátion flavílio (Finkelstein e Vardi, 2002; Garzón, 2008; Pedreschi e Cisneros-Zevallos, 2006).

Os planejamentos experimentais e análise de superfícies de resposta são ferramentas muito úteis que, juntamente a fundamentos estatísticos permitem

estudar e chegar a condições otimizadas de um processo. Para isso, podem-se utilizar estratégias como a realização de planejamentos fatoriais fracionados que permitem uma avaliação previa das variáveis significativas, até chegar ao delineamento completo central rotacional (DCCRs) final.

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi a obtenção de um extrato que contivesse o maior teor de antocianinas totais e fenólicos totais, visando o máximo rendimento do extrato e seu potencial antioxidante. Para isso, reuniu-se a funcionalidade dos DCCRs e os planejamentos fatoriais fracionados para chegar a maximização do extrato e das propriedades do pigmento de milho roxo.

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1.1 Material

Foram usados aproximadamente 100 sabugos de milho roxo (*Zea mays L.*), da variedade *arequipeño*, adquiridos no mercado local da cidade de Tacna, Perú. Os sabugos foram selecionados, cortados em fatias e posteriormente moídos, homogeneizados e armazenados em sacolas de polietileno de baixa densidade (PEBD) com zíper hermético, a -12°C até o início dos ensaios preliminares.

2.1.2 Solventes e reagentes

Os reagentes de Folin e Ciocalteu foram fornecidos pela Dinâmica (Brasil); o padrão ácido gálico e o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila, D-9132) foram fornecidos pela Sigma (St Louis, MO, USA); o carbonato de sódio, acetato de sódio e ácido clorídrico foram fornecidos pela Synth (Brasil); o cloreto de potássio foi fornecido pela Qhemis (Brasil), enquanto os solventes como etanol, metanol e acetona, todos grau analítico, foram fornecidos pela Ecibra (Brasil). A água ultra-pura foi obtida por um sistema Milli Q (Millipore).

2.1.3 Caracterização da composição centesimal do sabugo de milho roxo

Do lote de sabugos de milho roxo estocados, retirou-se uma quantidade suficiente de amostra para a determinação da composição centesimal.

As determinações de umidade, cinzas, proteína e lipídeos foram realizadas segundo a AOAC (1975). A determinação de carboidratos foi feita por diferença. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.1.4 Modelo experimental para a otimização do processo de extração do pigmento do sabugo de milho roxo

Foram realizados três planejamentos completos (DCCRs) com os solventes: acetona, etanol. e água. Para a seleção de variáveis foram realizados previamente três planejamentos fracionados (*screening*), dois deles com 6 variáveis (2^{6-2}) para o caso das extrações com etanol e acetona e o outro de 5 variáveis (2^{5-1}) para o caso da extração com água. Foram avaliadas quatro respostas: rendimento (R), teor de antocianinas monoméricas totais (AMT), Índice de atividade antioxidante (IAA) e teor de fenólicos totais (FT).

As melhores pré-condições de extração foram obtidas a partir da análise dos resultados dos planejamentos fatoriais, onde foram re-avaliadas as variáveis que resultaram significativas ao serem tratadas com o Statistica Vs. 7.0.

Um fluxograma do processo de extração do pigmento de milho roxo está apresentado na Figura 2.1

2.1.4.1 Estratégias utilizadas para os processos de extração do pigmento de milho roxo

- *Extração com acetona*

Primeiramente foi realizado um fatorial 2^{6-2} com 16 ensaios, e 3 repetições no ponto central, totalizando 19 ensaios, para a seleção das variáveis significativas no processo, sendo elas: temperatura (°C), pH, tempo de extração (min), composição do solvente (%), massa de amostra (g) e número de extrações (n). Após análise dos efeitos das variáveis (90% de confiança) nas quatro respostas: teor de antocianinas monoméricas–AMT (mg Cy-3-glu/100g), rendimento–R (g/100 g), Índice de atividade antioxidante–IAA e teor de fenólicos totais–FT (mg EAG/100 g), foi realizado um fatorial completo (DCCR) para as 3 variáveis selecionadas, sendo analisados novamente um total de 18 ensaios sendo 4 repetições no ponto central. Após análise das superfícies de resposta, para validação dos resultados obtidos, foram realizados mais 3 ensaios, totalizando 40. Este número representa a metade do número de ensaios que seriam necessários caso fosse escolhida a estratégia de realizar desde o início um planejamento completo. No Quadro 2.1 se apresenta os valores usados em cada nível das variáveis.

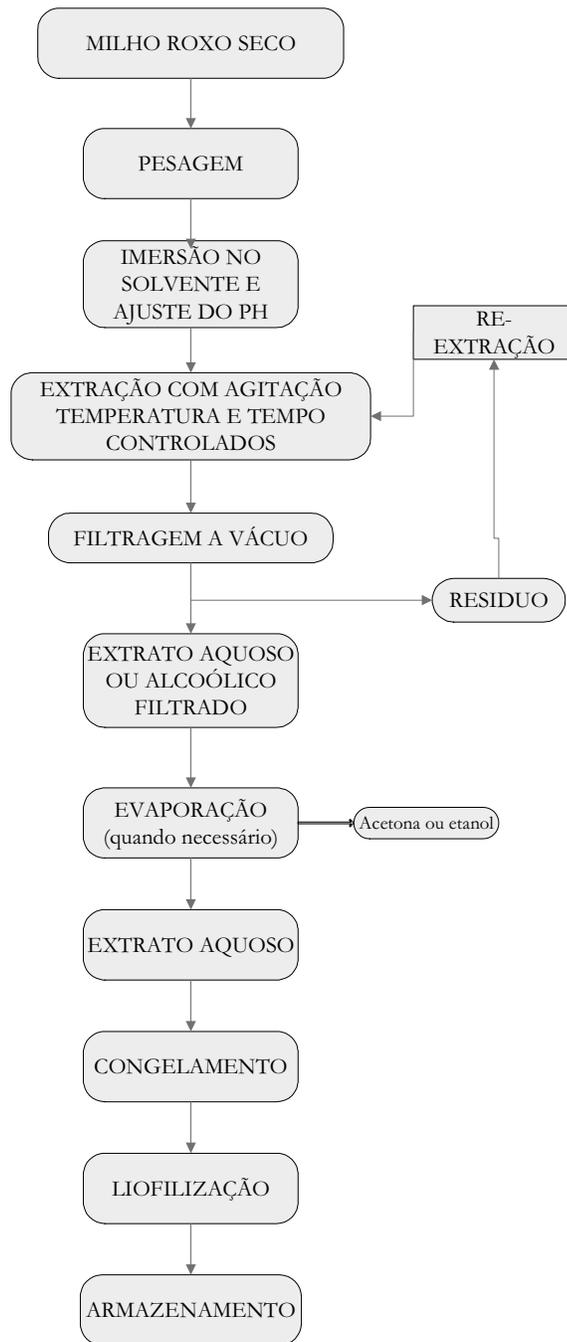


Figura 2.1 Fluxograma do processo de extração do pigmento

Quadro 2.1 Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado acetona 2⁶⁻²

	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	40	50
pH	2	4	6
Tempo (min)	60	90	120
Extrações (n)	1	2	3
Solvente (%)	20	40	60
Amostra (g)	1	3	5

- *Extração com etanol*

A estratégia seqüencial de planejamentos adotada foi a mesma utilizada para o planejamento de acetona, com as mesmas variáveis e respostas a avaliar, sendo 19 ensaios no planejamento fracionado, 18 para o DCCR e 3 ensaios para a validação dos pontos finais, somando 40 ensaios em total. A única diferença foi a faixa de temperatura no planejamento fracionado, que foi de 30 a 70°C, já que o ponto de ebulição do etanol é mais elevado. O Quadro 2.2 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis.

Quadro 2.2 Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado etanol 2⁶⁻²

	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	50	70
pH	2	4	6
Tempo (min)	60	90	120
Extrações (n)	1	2	3
Solvente (%)	20	40	60
Amostra (g)	1	3	5

- *Extração com água*

A estratégia seqüencial de planejamentos adotada foi a mesma utilizada para os planejamentos com etanol e acetona como solventes extratores. Contudo, foram estudadas apenas 5 variáveis, pois, neste caso não existe a variável composição do solvente.

Foram 19 ensaios no planejamento fracionado, 12 para o DCCR e 3 ensaios para a validação dos pontos finais, somando 34 ensaios. As faixas estudadas e as respostas avaliadas foram as mesmas dos planejamentos anteriores. O Quadro 2.3 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis.

Quadro 2.3 Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado água 2⁵⁻¹

	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	50	70
pH	2	4	6
Tempo (min)	60	90	120
Extrações (n)	1	2	3
Amostra (g)	1	3	5

2.1.5 Determinação do teor de antocianinas monoméricas totais (AMT)

O teor de antocianinas monoméricas totais foi determinado pelo método de pH diferencial (Giusti e Wrolstad, 2000), onde duas alíquotas das amostras previamente diluídas foram transferidas a tubos de ensaio, os quais foram diluídos em tampões de cloreto de potássio (pH 1,0) e acetato de sódio (pH 4,5). Foram deixados em repouso por 15 a 20 minutos, ao abrigo da luz. As leituras foram feitas nos comprimentos de onda de 510 e 700 nm em espectrofotômetro UV-VIS

com cubetas de quartzo de 1 cm de largura. A absorbância real mostrada pelas antocianinas na amostra foi calculada usando a fórmula 1:

$$A = (A_{\text{máx}} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{máx}} - A_{700})_{\text{pH}4,5} \quad (1)$$

Onde:

$A_{\text{máx}}$ é a absorbância no comprimento de onda máximo

A_{700} é o valor subtraído devido presença de outros fenólicos

A concentração de pigmentos monoméricos no extrato estão expressos em cianidina-3-glicosídeo (Cy-3-glu), por meio da fórmula 2.

$$\text{AMT} = [A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 100] / (\epsilon \times 1) \quad (2)$$

Onde:

A é a absorbância real

PM é o peso molecular da Cy-3-glu

FD é o fator de diluição

ϵ é a absorvidade molar da Cy-3-glu

2.1.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (FT)

Os compostos fenólicos totais foram avaliados segundo o método de Folin e Ciocalteu (FeC), descrito por Singleton et al. (1999) com algumas modificações. Foi utilizado o ácido gálico como referência para a quantificação dos compostos, para tanto, tomou-se 0,5 mL de extrato, numa concentração de 1,5 mg/mL

previamente diluído em metanol, o qual foi transferido para um tubo de ensaio onde foram adicionados 2,5 mL do reagente FeC 10% diluído em água destilada. A mistura permaneceu em repouso por 5 min, e em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% diluído em água destilada. Os tubos foram deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições, substituindo o extrato pela mesma quantidade de solvente.

2.1.7 Determinação do índice de Atividade antioxidante (IAA)

Para a medida da atividade antioxidante seguiu-se a metodologia descrita por Scherer e Godoy (2009), que desenvolveram um método padrão que permite avaliar, por meio de um índice, a capacidade seqüestrante de diferentes amostras frente a compostos radicais, obtendo dessa forma uma comparação direta.

As amostras foram diluídas em metanol em 5 concentrações diferentes para observar a reação do antioxidante com o radical. Tomaram-se alíquotas de 0,1 mL de cada uma das concentrações preparadas as quais foram transferidas a tubos de ensaio para adição de 3,9 mL de solução de DPPH 0,2 mmol em cada um deles. O mesmo procedimento foi realizado com o ácido gálico que foi escolhido como referência. As amostras ficaram em repouso e no escuro, e a absorvância foi medida a 517 nm, após 90 minutos de reação.

O IAA foi calculado a partir da absorção da amostra seguindo a equação (3):

$$\text{I\% DPPH} = [(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_A)/\text{Abs}_0] \times 100 \quad (3)$$

Onde:

Abs₀: abs da solução sem amostra ou controle

Abs_A: abs da solução com amostra

$$IC50 = (50-b)/a \quad (4)$$

Onde:

a e b são os coeficientes da equação da reta $Y = ax + b$

$$IAA = [] DPPH / IC50 \quad (5)$$

Onde:

[] DPPH é a concentração final de DPPH no tubo de ensaio

2.1.8 Análise estatística

Os resultados dos planejamentos experimentais fracionados e dos DCCRs foram avaliados com o emprego do programa Statistica versão 7.0. Foram utilizados os métodos de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (95%) para análise e comparação dos extratos finais.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Composição centesimal do sabugo de milho roxo:

A Tabela 2.1 apresenta os valores da composição centesimal do sabugo de milho roxo.

Tabela 2.1 Análise proximal do sabugo de milho roxo

Teor	Valores
<i>Umidade (%)</i>	<i>9,23 ± 0,34</i>
<i>Cinzas (%)</i>	<i>2,85 ± 0,13</i>
<i>Proteínas (%)</i>	<i>2,02 ± 0,04</i>
<i>Gordura (%)</i>	<i>0,04 ± 0,00</i>
<i>Carboidratos Totais (%)*</i>	<i>85,86</i>

*Calculado por diferença

Não há na literatura dados sobre a composição centesimal do sabugo de milho roxo, apenas do grão, o que dificulta a comparação com os dados obtidos neste trabalho. De forma geral, foi encontrado um baixo teor de umidade (<10%), o que contribui à conservação do material de forma natural.

Observa-se que o teor de proteínas é bastante baixo, portanto, a quantidade de proteínas que se pode complexar com as antocianinas (composto majoritário), podendo causar precipitação do complexo no momento da extração, é mínima. Da mesma forma, se observa que o teor de gordura é extremamente baixo, sendo menor que 0,05%, indicando a não necessidade do desengorduramento da amostra.

Por último, pode se observar que o conteúdo de carboidratos é muito alto, devido à alta concentração de fibras, celulose, ligninas, lignanas entre outros compostos.

2.3.2 Otimização do método de extração do pigmento do sabugo de milho roxo

Foram realizadas extrações empregando-se três solventes, e em cada um desses estudos variou-se temperatura, tempo, massa da amostra, número de extrações, pH e composição do solvente.

- *EXTRAÇÃO COM ACETONA COMO SOLVENTE*

No Quadro 2.4 se apresenta a matriz do planejamento fracionado e os valores das respostas estudadas.

As respostas foram analisadas com ajuda do programa Statistica 7.0 observando-se que das 6 variáveis estudadas a 90% de confiança, 4 delas foram significativas.

Para o caso das AMT, apenas o pH foi significativo (0,004854), mostrando uma tendência de aumento do teor de antocianinas com o incremento do pH.

Quadro 2.4 Planejamento Fracionado Acetona 2⁶⁻²

ENSAIO	T (°C)	pH	TEMPO (min)	EXTRAÇÕES (n)	ACETONA (%)	MASSA (g)	R (g ext/100g)	AMT (mg eq a cy-3-glu/100g)	IAA	FT (mg EAG/100g)
1	30	2	60	1	20	1	23,50	1200,05	1,89	2089,84
2	50	2	60	1	60	1	26,06	1639,74	1,10	2441,10
3	30	6	60	1	60	5	16,78	1586,08	2,23	1722,25
4	50	6	60	1	20	5	20,65	1693,40	2,13	2305,11
5	30	2	120	1	60	5	19,87	1297,51	2,08	2026,56
6	50	2	120	1	20	5	22,43	1109,24	2,17	2192,03
7	30	6	120	1	20	1	20,63	1855,40	2,39	317,77
8	50	6	120	1	60	1	23,70	1972,34	2,44	156,06
9	30	2	60	3	20	5	22,25	1478,14	2,11	2161,76
10	50	2	60	3	60	5	25,97	946,50	1,92	2379,85
11	30	6	60	3	60	1	25,16	1986,35	1,97	2199,33
12	50	6	60	3	20	1	23,21	1964,54	2,10	2126,02
13	30	2	120	3	60	1	29,18	1080,27	1,81	2619,01
14	50	2	120	3	20	1	32,61	1196,16	1,92	2917,72
15	30	6	120	3	20	5	20,91	1718,38	1,82	1720,62
16	50	6	120	3	60	5	22,50	1874,18	1,72	2172,26
17	40	4	90	2	40	3	29,65	1988,38	1,07	1366,58
18	40	4	90	2	40	3	30,26	1168,16	0,97	1429,93
19	40	4	90	2	40	3	22,58	1088,61	1,02	2286,95

T- temperatura, R- rendimento, AMT- antocianinas monoméricas totais, IAA- índice de atividade antioxidante, FT – fenólicos totais

O rendimento (R) teve 4 variáveis significativas: temperatura (0,064902), pH (0,010453), número de extrações (0,010926) e massa (0,004614), além da sua curvatura. Apesar da variável temperatura ter sido significativa, mostrando efeito positivo quando é aumentada de 30 para 50°C, sugerindo que a faixa poderia se estendida a mais de 50°C no DCCR para melhorar o rendimento do extrato, mas, esta variável foi fixada no ponto +1 (50°C) para não causar a ebulição e conseqüente evaporação do solvente (acetona). O pH mostrou uma tendência positiva no rendimento ao ser reduzido, entretanto, esse comportamento é inverso ao exibido pela resposta AMT, a qual foi priorizada neste projeto. Sendo assim, foi mantido em seu nível +1. O número de extrações foi significativo para o rendimento e, portanto, entraram para o DCCR, alterando a faixa de 1 a 5 extrações. No caso da variável massa da amostra, notou-se um incremento no rendimento quando se usou o menor nível desta. Entretanto, como não foi possível diminuir ainda mais esse nível decidiu-se colocar uma nova faixa de 1 a 10 g no DCCR para observar um possível ponto de saturação do solvente.

No caso da resposta IAA, o número de extrações foi significativo, junto com a curvatura, mostrando a mesma tendência que no rendimento. O teor de FT só foi afetado pelas variáveis pH (0,023185) e número de extrações (0,052144), sendo que o menor nível de pH aumentou o teor, assim como um aumento do número de extrações.

Como o processo de extração do pigmento foi de difícil padronização por estar sujeito a vários erros experimentais, desde a extração até a liofilização e análise das amostras, desconsiderou-se o baixo valor apresentado em alguns coeficientes de correlação (R^2).

Os Quadros 2.5 a 2.8 mostram os efeitos encontrados no programa Estatística para cada uma das respostas estudadas.

Quadro 2.5 Variáveis significativas para a resposta antocianinas monoméricas totais (AMT)-acetona.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	1539,64	71,22	0,000000
Curvatura	-249,19	358,46	0,501380
Temperatura	19,74	142,44	0,892280
pH	583,38	142,44	0,001772
Tempo	-53,42	142,44	0,714789
Extrações	-18,16	142,44	0,900878
Solvente	16,46	142,44	0,910103
Massa	-153,43	142,44	0,304470

R²: 62,84 MS residual:81154,73

Quadro 2.6 Variáveis significativas para a resposta rendimento (R) -acetona.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	0,23	0,01	0,000000
Curvatura	0,08	0,03	0,018017
Temperatura	0,02	0,01	0,064902
pH	-0,04	0,01	0,010453
Tempo	0,01	0,01	0,386040
Extrações	0,04	0,01	0,010926
Solvente	0,01	0,01	0,751859
Massa	-0,04	0,01	-0,061448

R²: 80,07 MS residual: 0,0053

Quadro 2.7 Variáveis significativas para a resposta índice de atividade antioxidante (IAA) -acetona.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	2,04	0,10	0,000000
Curvatura	-1,11	0,51	0,050609
Temperatura	0,02	0,20	0,914125
pH	0,12	0,20	0,566123
Tempo	0,01	0,20	0,951296
Extrações	-0,24	0,20	0,257979
Solvente	-0,05	0,20	0,824659
Massa	-0,03	0,20	0,887223

R²: 37,76 MS residual: 0,1615053.

Quadro 2.8 Variáveis significativas para a resposta fenólicos totais (FT)-acetona.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
<i>Media</i>	1971,70	144,87	0,000000
Curvatura	-554,43	729,15	0,463016
Temperatura	229,13	289,74	0,445772
<i>pH</i>	-763,56	289,74	0,023185
Tempo	-412,90	289,74	0,181878
Extrações	630,73	289,74	0,052144
Solvente	-14,31	289,74	0,961506
Massa	226,70	289,74	0,450472

R²: 58,54 MS residual: 335788.

Decidiu-se realizar um DCCR com 3 das 4 variáveis significativas do planejamento fracionado, sendo elas o pH, a massa e re-extrações. Para fixar as variáveis não significativas foram avaliados seus efeitos. A proporção de acetona foi fixada em 20%, tendo em vista o custo e diminuição de resíduos do processo, já o tempo de extração, que poderia ter sido fixado no menor nível (60 minutos), foi mantido no ponto central, correspondente a 90 minutos, com base na curvatura e na literatura estudada que indica que sucessivas extrações em tempos relativamente curtos poderiam ser as melhores condições para extração de antocianinas e outros compostos fenólicos. A Tabela 2.2 e o Quadro 2.9 apresentam os valores selecionados para o DCCR e a matriz DCCR acetona 2³, respectivamente. No caso da variável número de extrações, não havia como extrair 1,8 ou 4,2 extrações, foram feitas 2 e 4 extrações para os níveis de -1 e 1 respectivamente.

Tabela 2.2. Valores selecionados para o DCCR acetona 2³.

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	4	4,4	5	5,6	6
Amostra (g)	1	2,8	5,5	8,2	10
Extrações (n)	1	2	3	4	5

Quadro 2.9 Planejamento Completo Acetona 2³ com as respectivas respostas

ENSAIO	pH	Massa (g)	Extrações (n)	R (g ext/100g)	AMT (mg eq cy-3-glu/100g)	IAA	FT (mg EAG/100g)
1	4,4	2,8	2	22,25	1433,99	1,86	57101,21
2	5,6	2,8	2	22,65	1618,61	1,94	59141,43
3	4,4	8,2	2	19,71	1323,65	2,03	68678,60
4	5,6	8,2	2	20,33	1511,56	1,91	68968,28
5	4,4	2,8	4	21,61	1632,31	2,12	68763,59
6	5,6	2,8	4	22,66	1712,68	1,64	55147,66
7	4,4	8,2	4	21,49	1351,90	2,15	74566,81
8	5,6	8,2	4	20,73	1583,47	2,08	71162,99
9	4	5,5	3	22,12	1507,38	2,17	71476,08
10	6	5,5	3	21,38	1681,20	1,99	69629,55
11	5	1	3	24,48	1807,95	1,55	47573,73
12	5	10	3	19,30	1466,10	1,92	75325,71
13	5	5,5	1	19,41	1232,14	2,02	92860,90
14	5	5,5	5	22,39	1672,37	1,59	54172,67
15	5	5,5	3	21,69	1845,10	2,08	68740,74
16	5	5,5	3	20,84	1469,55	1,79	64446,52
17	5	5,5	3	21,23	1442,78	1,79	70058,59
18	5	5,5	3	20,42	1567,64	1,68	62760,23

R- rendimento, AMT- antocianinas monoméricas totais, IAA – índice de atividade antioxidante, FT- fenóis totais.

ANÁLISE DO DCCR ACETONA 2³:

Os resultados foram avaliados com a análise a 90% de confiança e α : 0,10. Vendo os resultados obtidos na matriz, notou-se que o ponto central (ensaio 15) teve valores bastante distantes dos outros pontos centrais, motivo pelo qual foi retirado do planejamento, restando apenas três pontos centrais para cálculo do erro puro.

Variável Antocianinas Monoméricas Totais (AMT):

Os coeficientes de regressão (Quadro 2.10) demonstraram que apenas três variáveis lineares foram significativas para esta variável.

Quadro 2.10 Coeficientes de regressão AMT- acetona

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Media	1496,19	46,41	0,000000
pH (L)	71,53	21,79	0,013453
pH (Q)	25,83	23,99	0,317262
Massa (L)	-87,90	21,79	0,004976
Massa (Q)	41,10	23,99	0,130379
Extrações (L)	82,96	21,80	0,004976
Extrações (Q)	-24,39	23,99	0,343175
pH vs Massa	19,32	28,48	0,519376
pH vs Extrações	-7,58	28,48	0,797900
Massa vs Extrações	-24,03	28,48	0,426600

R²:87,54 MS RESIDUAL: 6486,8

Equação do modelo codificado para a variável AMT:

$$\text{AMT} = 1530,36 + 71,53\text{pH(L)} - 87,90\text{massa(L)} + 82,96\text{extracões(L)} \quad (1)$$

A análise de variância (Quadro 2.11) mostra que a equação 1 é adequada para descrever o modelo obtido, já que o F calculado da regressão mostrou-se quase 5 vezes maior que o F Tabelado. Já o erro puro apresentado pelo modelo, o F calculado foi cinco vezes menor que o F Tabelado, mostrando que não há falta de ajuste, podendo-se tirar as superfícies de resposta correspondentes.

Quadro 2.11 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – AMT – acetona

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	269360,7	3	89786,9	12,25	2,56
Resíduo	95310,6	13	7331,58		
Falta de ajuste	86667,2	11	7878,84	1,82	9,40
Erro puro	8643,4	2	4321,7		
Total	364671,3	16	R ² : 73,86		

Superfícies de Resposta Identificadas:

As superfícies mostraram uma tendência para a otimização do teor de antocianinas monoméricas totais. No entanto, o planejamento não pode ser deslocado para os possíveis pontos ótimos de extração pelos motivos explicados a seguir.

A Figura 2.2 mostra o efeito existente entre a variável massa e pH. Segundo a superfície, na menor quantidade de amostra usada (1g) e com o pH no nível máximo (6) obtém-se um teor estimado de 1700mg eq a cy-3-glu/100g de amostra, entretanto, os níveis da variável pH não podem ser estendidos acima de

6, pois isso levaria as antocianinas a um estado estrutural altamente instável. Esse estado quinonoidal apresenta uma intensa coloração púrpura que se desfaz rapidamente, devido à formação de chalconas (incolores), como já foi mencionado nas pesquisas e revisões literárias de Jing (2006), Cevallos-Casals e Cisneros-Zevallos (2004); Malacrida (2003) as quais foram realizadas em diferentes matrizes contendo altas concentrações de antocianinas. No caso da variável massa, a superfície sugere um acréscimo no teor de AMT com o uso de 1g de amostra (menor nível estudado). Laboratorialmente, não foi possível utilizar uma menor quantidade de amostra nos experimentos, visto que não haveria extrato suficiente para análise das quatro respostas. Além disso, temeu-se que uma quantidade menor que 1 g não fosse representativa estatisticamente e incrementasse o erro experimental do planejamento.

A Figura 2.3 mostra a superfície extrações em função do pH, com o mesmo efeito em relação ao pH da solução extratora, e também sugerindo que quanto mais extrações são realizadas, maior será a quantidade de antocianinas extraídas.

Na Figura 2.4, extrações em função da massa pode se conferir as mesmas informações já extraídas nas figuras anteriores.

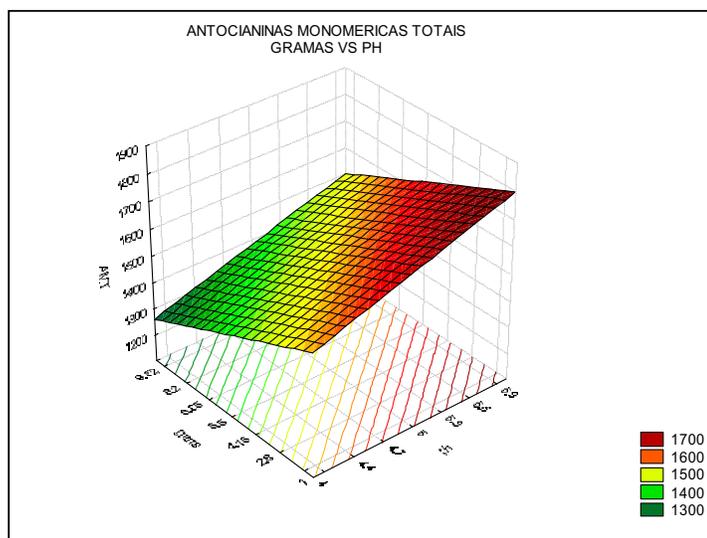


Figura 2.2 Superfície de resposta variáveis massa vs. pH – AMT-acetona

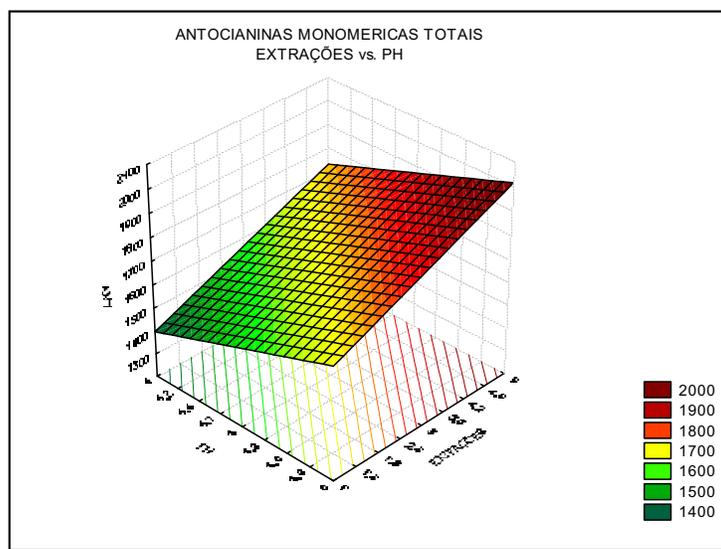


Figura 2.3 Superfície de resposta variáveis extrações vs. pH – AMT-acetona

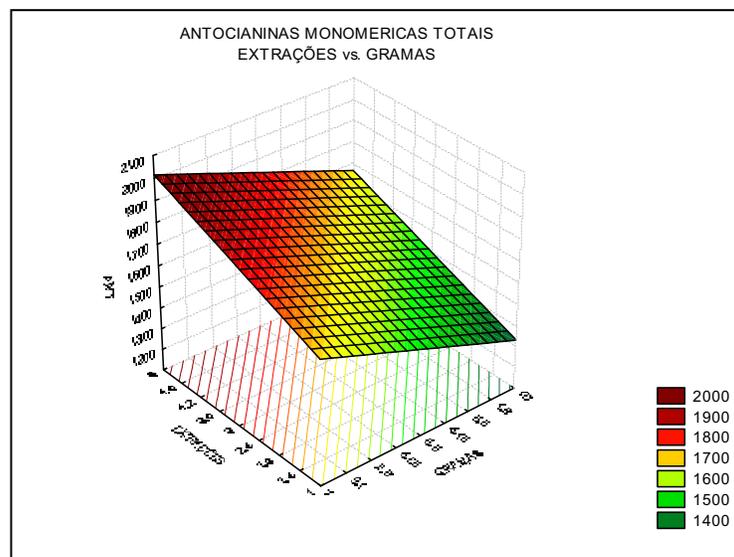


Figura 2.4 Superfície de resposta variáveis extrações vs. massa – AMT-acetona

Variável Rendimento (R):

Como mostrado no Quadro 2.12, a variável massa foi altamente significativa para aumentar a quantidade de extrato, quando é usado o menor nível na faixa estudada (-2). Além disso, o aumento nas extrações ou o nível superior dessa variável (+2) foi encontrado como o melhor. O pH não se mostrou significativo na faixa estudada e não se encontrou relevância nas interações das três variáveis.

Na análise de variância (Quadro 2.13), o F calculado da regressão mostrou-se quase sete vezes maior que o F Tabelado, por tanto, a equação 2 é válida para representar o modelo. Em relação ao erro puro apresentado pelo modelo, o F calculado foi duas vezes menor que o F Tabelado, podendo-se tirar as superfícies de resposta correspondentes. A Figura 2.5 mostra a superfície extrações vs. massa para a variável rendimento.

Quadro 2.12 Coeficientes de regressão R - acetona

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Medida	20,84	0,46	0,000000
pH (L)	0,00	0,27	0,982562
pH (Q)	0,30	0,24	1,254154
Massa (L)	-1,14	0,22	0,001158
Massa (Q)	0,35	0,24	0,189281
Extrações (L)	0,48	0,27	0,062355
Extrações (Q)	-0,00	0,24	0,988056
pH vs Massa	-0,20	0,24	0,504047
pH vs extrações	-0,09	0,24	0,753409
Massa vs Extrações	0,35	0,24	0,253557

R²: 84,49 MS RESIDUAL: 0,6428

Equação do modelo codificado para a variável R:

$$R = 20,84 - 1,14\text{massa(L)} + 0,48\text{extrações(L)} \quad (2)$$

Quadro 2.13 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – R – acetona.

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	21,023	2	10,511	18,39	2,73
Resíduo	8,001	14	0,571		
Falta de ajuste	7,669	12	0,639	3,85	9,41
Erro puro	0,332	2	0,166		
Total	29,025	16		R ² : 72.43	

A superfície linear corrobora a informação obtida para a resposta AMT, a qual assinala que quanto menor a quantidade de amostra e maior o número de extrações maior será o rendimento. Já o pH pode ser escolhido em qualquer ponto da faixa entre 4 e 6 porque mostra a mesma significância.

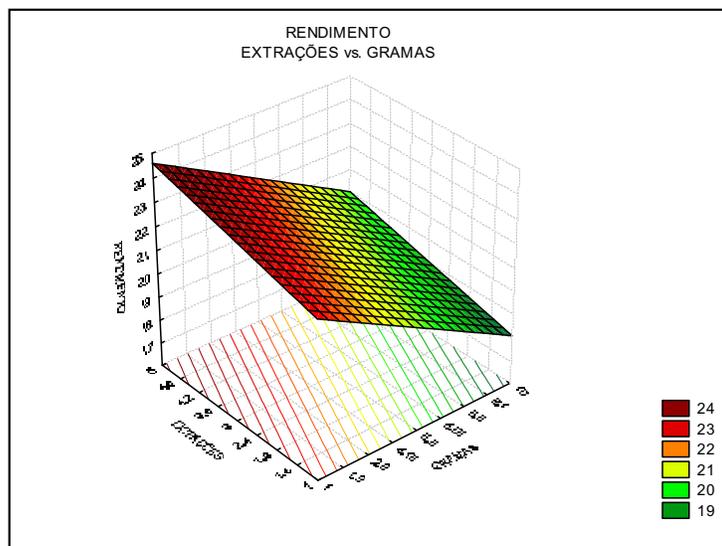


Figura 2.5 Superfície de resposta variáveis massa vs. extrações – R-acetona

Variável índice de atividade antioxidante (IAA)

Apenas duas variáveis foram significativas para o IAA (pH e massa), como mostrado nos coeficientes de regressão do Quadro 2.14.

Na ANOVA (Quadro 2.15) foi observado que a pesar do F calculado ter sido 2,5 vezes maior que o F Tabelado da regressão, o R^2 mostrou-se muito baixo. Sendo assim, a equação 3 (modelo IAA) não é representativa.

Quadro 2.14 Coeficientes de regressão IAA - acetona

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
MEDIA	1,75	0,090	0,000000
pH (L)	-0,07	0,04	0,162803
pH (Q)	0,13	0,05	0,023849
Massa (L)	0,09	0,04	0,069387
Massa (Q)	0,01	0,05	0,786926
Extrações (L)	-0,03	0,04	0,443375
Extrações (Q)	0,04	0,05	0,451499
pH vs Massa	0,03	0,05	0,634625
pH vs Extrações	-0,06	0,05	0,281598
Massa vs Extrações	0,04	0,05	0,481807

R²: 72,50 MS RESIDUAL: 0,24079

Equação do modelo codificado para a variável IAA:

$$IAA = 1,75 + 0,13pH(Q) - 0,090massa(L) \quad (3)$$

Quadro 2.15 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – IAA – acetona

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	0,302	2	0,151	6,82	2,73
Resíduo	0,310	14	0,022		
Falta de ajuste	0,301	12	0,025	5,50	9,41
Erro puro	0,009	2	0,004		
Total	0,613	16		R ² : 49,38	

Variável Fenólicos Totais (FT)

No caso do teor de FT, ainda que a variável massa tenha se mostrado como significativa, como mostrado no Quadro 2.16, o modelo obtido a través da equação 4, e avaliado pela ANOVA (Quadro 2.17) não se mostrou representativo,

pois o R^2 foi extremamente baixo e o F calculado foi muito próximo ao F Tabelado, portanto, descartou-se o modelo, e não foi obtida a superfície de resposta.

Quadro 2.16 Coeficientes de regressão FT- acetona

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Media	3277,43	152,10	0,000000
pH (L)	-94,29	71,43	0,228351
pH (Q)	18,21	78,62	0,823474
Massa (L)	158,35	71,43	0,062162
Massa (Q)	-117,09	78,62	0,180011
Extrações (L)	3,58	71,43	0,961435
Extrações (Q)	-92,87	78,62	0,276068
pH vs Massa	23,84	93,32	0,805742
pH vs Extrações	-133,31	93,32	0,196221
Massa vs Extrações	54,15	93,32	0,579960

R^2 : 64,53 MS RESIDUAL: 69675

Equação do modelo codificado para a variável FT:

$$FT = 3277,429 + 158,346 \text{massa(L)} \quad (4)$$

Quadro 2.17 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT- acetona

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	342425	1	342425	4,97	3,07
Resíduo	1032879	15	68858,6		
Falta de ajuste	875600	13	67353,846	0,86	9,35
Erro puro	157279	2	78639,5		
Total	1375304	16		R^2 : 24,89	

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Após analisar as respostas obtidas pelo programa Statistica, conseguiu-se chegar aos seguintes parâmetros para a otimização da extração do pigmento do sabugo de milho roxo com acetona como solvente. As variáveis e os valores da condição ótima estão apresentados na Tabela 2.3

Tabela 2.3 Condições otimizadas para extração do pigmento do sabugo de milho roxo com acetona.

Temperatura (°C)	pH	Tempo de extração (min)	Extrações (n)	Proporção de solvente (%)	Massa da amostra (g)
50	6	90	2	20	1

Apesar dos resultados indicarem que para a otimização das respostas se deveria realizar o maior número de extrações possíveis, as mesmas foram fixadas em apenas duas que, na prática, mostraram-se suficientes para a remoção da maior parte do pigmento, reduzindo assim, drasticamente o tempo de processo.

A validação da condição escolhida foi feita em triplicata apresentando os resultados indicados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Validação do ponto ótimo do DCCR acetona

AMT (mg eq a cy-3-glu/100g) *	R (g/100g)*	IAA*	FT (mg de EAG/100g)*
1398,21 ± 37,1	20,48 ± 0,41	1,58 ± 0,11	1762,34 ± 46,96

*Médias de três repetições com desvio padrão.

Finalmente foram feitas as comparações entre os valores preditos de cada um dos modelos encontrados com os valores observados na validação dos pontos ótimos. Na Tabela 2.5 são mostrados os resultados.

Tabela 2.5 Valores preditos e obtidos do DCCR acetona

Respostas	Preditos	Obtidos	Recuperação (%)
AMT (mg eq cy-3-glu/100g)	1715,24	1398,21	81,52
R (g/100g)	23,72	20,45	86,21
IAA	2,12	1,58	74,65
FT (mg de EAG/100g)	3011,41	1762,34	58,51

Nota-se que os valores obtidos na recuperação não conseguiram chegar aos valores preditos pelos modelos encontrados anteriormente, sendo que para as AMT, conseguiu-se apenas o 81,5% do teor esperado pelo modelo otimizado, no caso do R conseguiu-se 86,2%. Para as outras duas respostas (IAA e FT), os valores resultaram muito menos representativos, já que, as condições finais utilizadas para a validação dos resultados não foram as recomendadas para essas respostas, porque foram priorizados os modelos para obtenção de AMT e R.

- *EXTRAÇÃO COM ETANOL COMO SOLVENTE*

A matriz do planejamento fracionado e os valores das respostas estudadas se mostra no Quadro 2.18.

Os Quadros 2.19 a 2.22 mostram os efeitos principais encontrados no programa Statistica. Das variáveis estudadas a 90% de confiança, o pH resultou altamente significativo (0,000043) para as AMT, assim como a curvatura

(0,064734), demonstrando que ao incrementar o pH de 2 para 6 há uma tendência positiva no teor de AMT e a curvatura assinala que o possível teor ótimo se encontra perto do ponto central. No caso do rendimento, apenas a variável massa foi significativa com um p valor de 0,016606, indicando que um decréscimo na quantidade de amostra empregada leva ao máximo da remoção de pigmento. Conforme explicado anteriormente é inviável diminuir ainda mais a quantidade de amostra utilizada.

Decidiu-se então, que no DCCR a faixa seria ampliada até 10g com a finalidade de encontrar e demonstrar o ponto de saturação do solvente.

Para o IAA somente as variáveis massa (0,082115) e tempo de extração (0,000007) foram significativas. Essas variáveis assinalaram que um incremento na quantidade de amostra e a diminuição do tempo de extração aumentam o IAA. Já a curvatura, também significativa indica que os pontos ótimos devem estar perto dos pontos centrais.

Por último para a resposta FT, as variáveis número de extrações, tempo e pH foram significativas com p valores 0,006680, 0,054786 e 0,001483, respectivamente. Seus efeitos mostram que o aumento do número de extrações, a diminuição do tempo e a redução do pH resultam em um maior teor de FT. Apesar da indicação sobre o número de extrações o mesmo foi mantido em três, devido à confirmação visual de que o solvente extrator já não extraia mais pigmentos da matriz. Além disso, esta escolha reduz o tempo de processo de extração.

No caso das variáveis não significativas (temperatura e proporção de solvente), as faixas de estudo foram fixadas conforme a literatura para melhores resultados das duas principais respostas desse experimento (AMT e R).

Quadro 2.18 Planejamento Fracionado Etanol 2⁶⁻²

ENSAIO	T (C°)	pH	TEMPO (min)	EXTRAÇÕES (n)	ETANOL (%)	MASSA (g)	R (g/100g)	AMT (mg eq a cy-3-glu/100g)	IAA	FT (mg EAG/100g)
1	30	2	60	1	20	1	21,756	1033,034	1,956	2676,425
2	70	2	60	1	60	1	23,467	961,082	1,979	2977,103
3	30	6	60	1	60	5	19,790	1752,531	2,233	2430,273
4	70	6	60	1	20	5	19,468	1457,334	2,456	929,806
5	30	2	120	1	60	5	20,682	1160,027	1,027	2485,336
6	70	2	120	1	20	5	22,759	1086,132	1,085	2556,729
7	30	6	120	1	20	1	21,636	1847,911	0,809	2082,391
8	70	6	120	1	60	1	25,509	1876,712	0,293	994,929
9	30	2	60	3	20	5	21,924	1017,825	2,340	3307,484
10	70	2	60	3	60	5	25,866	888,200	2,008	3580,010
11	30	6	60	3	60	1	25,231	1770,853	2,103	3251,186
12	70	6	60	3	20	1	25,894	1703,268	1,925	2905,777
13	30	2	120	3	60	1	25,664	925,233	0,944	3096,812
14	70	2	120	3	20	1	28,078	1035,951	0,807	3222,256
15	30	6	120	3	20	5	21,183	1550,109	0,516	2028,287
16	70	6	120	3	60	5	13,317	977,623	1,564	1730,210
17	50	4	90	2	40	3	21,304	1504,553	2,243	2695,176
18	50	4	90	2	40	3	20,586	1562,997	1,720	2258,377
19	50	4	90	2	40	3	21,322	1595,253	2,231	2975,269

T- temperatura, R- rendimento, AMT- antocianinas monoméricas totais, IAA- índice de atividade antioxidante, FT- fenólicos totais.

Quadro 2.19 Variáveis significativas para a resposta antocianinas monoméricas totais (AMT)-etanol.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	1315,24	46,28	0,000000
Curvatura	478,06	232,95	0,064734
Temperatura	-133,90	92,57	0,175906
pH	603,61	92,57	0,000043
Tempo	-15,55	92,57	0,869609
Extrações	-163,21	92,57	0,105587
Solvente	-52,41	92,57	0,582609
Massa	-158,03	92,57	0,115810

R²: 83,38 MS residual: 34273,83

Quadro 2.20 Variáveis significativas para a resposta rendimento (R)-etanol.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	22,64	0,71	0,000000
Curvatura	-3,14	3,59	0,401656
Temperatura	0,81	1,43	0,581269
pH	-2,27	1,43	0,140069
Tempo	-0,57	1,43	0,696902
Extrações	1,51	1,43	0,312572
Solvente	-0,40	1,43	0,786131
Massa	-4,03	1,43	0,016606

R²:54,04 MS residual: 8,1595

Quadro 2.21 Variáveis significativas para a resposta Índice de atividade antioxidante (IAA)-etanol

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	1,50	0,08	0,000000
Curvatura	1,12	0,40	0,016117
Temperatura	0,02	0,16	0,882446
pH	-0,03	0,16	0,847778
Tempo	-1,24	0,16	0,000007
Extrações	0,05	0,16	0,774876
Solvente	0,03	0,16	0,843386
Massa	0,30	0,16	0,081825

R²: 87,12 MS residual: 0,09907

Quadro 2.22 Variáveis significativas para a resposta fenólicos totais (FT)-etanol.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	2515,94	112,32	0,000000
Curvatura	254,01	565,32	0,661932
Temperatura	-307,67	224,64	0,198109
pH	-943,66	224,64	0,001483
Tempo	-482,64	224,64	1,054786
Extrações	748,630	224,64	0,006680
Solvente	104,59	224,64	0,650592
Massa	-269,84	224,64	0,254884

R²: 77,13 MS residual:201846,1

A Tabela 2.6 apresenta os valores das variáveis selecionadas para o planejamento completo ou DCCR etanol.

Tabela 2.6 Valores selecionados para o DCCR etanol 2³.

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	4	4,4	5	5,6	6
Massa (g)	1	2,8	5,5	8,2	10
Tempo (min)	15	30,1	52,5	74,8	90

Quadro 2.23 Planejamento Completo Etanol 2³ com as respostas experimentais obtidas

ENSAIO	pH	MASSA (g)	TEMPO (min)	R (g ext/100g)	AMT (mg eq cy-3-glu/100g)	IAA	FT (mg EAG/100g)
1	4,4	2,8	30	19,15	1421,93	1,68	57250,92
2	5,6	2,8	30	19,43	1359,45	1,27	44793,19
3	4,4	8,2	30	18,32	1209,30	1,84	59540,45
4	5,6	8,2	30	18,89	1387,04	1,56	51001,84
5	4,4	2,8	75	20,87	1436,40	0,85	22634,67
6	5,6	2,8	75	20,75	1408,44	1,27	49310,72
7	4,4	8,2	75	17,95	1160,59	1,54	72661,01
8	5,6	8,2	75	17,82	1219,23	1,48	55542,40
9	4	5,5	53	19,02	1297,09	1,42	58860,48
10	6	5,5	53	19,12	1440,78	1,10	44706,42
11	5	1	53	23,48	1630,86	1,36	35774,35
12	5	10	53	18,17	1253,81	0,97	39504,63
13	5	5,5	15	18,57	1368,33	1,90	66644,66
14	5	5,5	90	18,64	1242,68	1,42	61825,65
15	5	5,5	53	19,26	1373,70	1,68	64718,03
16	5	5,5	53	19,30	1383,79	1,58	64103,74
17	5	5,5	53	18,98	1401,02	1,60	62782,91
18	5	5,5	53	17,89	1325,15	2,70	87349,49

R- rendimento, AMT- antocianinas monoméricas totais, IAA- índice de atividade antioxidante, FT- fenólicos totais

ANÁLISE DO DCCR ETANOL 2³:

A análise foi realizada com 90% de confiança e α : 0,10. Avaliando os resultados obtidos na matriz, notou-se que o ponto central número 18 teve valores bastante distantes dos outros pontos centrais, motivo pelo qual foi retirado do planejamento, restando só três pontos centrais para o cálculo do erro puro.

Variável Antocianinas Monoméricas Totais (AMT):

Os coeficientes de regressão observados no Quadro 2.24 mostraram a influencia das três variáveis estudadas. Apesar de inicialmente os coeficientes mostraram que o pH nos níveis mais elevados aumentaria o teor de AMT, deve-se observar os coeficientes de regressão da interação com a quantidade de amostra e as superfícies geradas a partir desse modelo. Observou-se que o pH no nível +2 aumenta o teor das AMT apenas se a quantidade de amostra também estiver no nível +2, mas se ambos estiverem no nível -2 obtêm-se melhores resultados.

Quadro 2.24 Coeficientes de regressão AMT- etanol

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Media	1389,14	27,85	0,000000
pH (L)	28,38	13,08	0,066602
pH (Q)	-16,33	14,40	0,293869
Massa (L)	-94,03	13,08	0,000179
Massa (Q)	9,62	14,40	0,525382
Tempo (L)	-26,69	13,08	0,800673
Tempo (Q)	-38,76	14,39	0,030963
pH vs Massa	40,85	17,09	0,048103
pH VS Tempo	-10,57	17,09	0,555686
Massa vs Tempo	-35,0	17,09	0,079734

R²: 92,04 MS RESIDUAL: 2335,576

Equação do modelo codificado para a variável AMT:

$$\text{AMT} = 1389,14 + 28,38\text{pH(L)} - 94,03\text{massa(L)} - 26,68\text{tempo(L)} - 38,76\text{tempo(Q)} + 40,85\text{pH}_x\text{massa} - 35,0\text{massa}_x\text{tempo} \quad (5)$$

A ANOVA (Quadro 2.25) mostrou que a equação 5 é adequada para descrever o modelo obtido, já que o F calculado da regressão foi 4 vezes maior que o F Tabelado correspondente, e em relação ao erro puro do modelo, o F calculado foi menor que o F Tabelado, dando credibilidade as superfícies geradas.

Quadro 2.25 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – AMT – etanol

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	182684,9	6	30447,483	13,34	3,22
Resíduo	22826,6	10	2282,66		
Falta de ajuste	22445,1	8	2805,637	14,71	19,37
Erro puro	381,5	2	190,75		
Total	205511,5	16		R ² : 88,89	

Na interação da massa da amostra com o tempo de extração, notou-se que em quanto menos amostra usada (1g) e maiores tempos de extração (entre 45 a 85 min), melhor é o teor de AMT. As superfícies obtidas para o teor de AMT são mostradas nas Figuras 2.6 a 2.8.

Superfícies de Resposta Identificadas

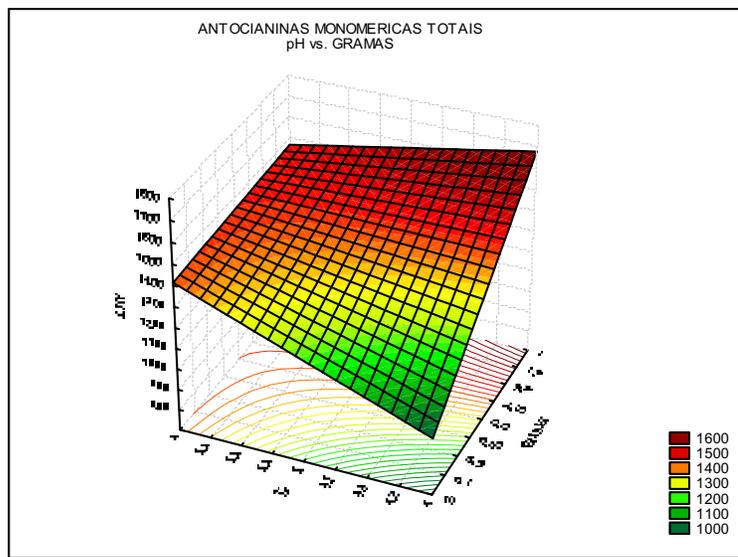


Figura 2.6 Superfície de resposta variáveis pH vs. Massa – AMT-etanol.

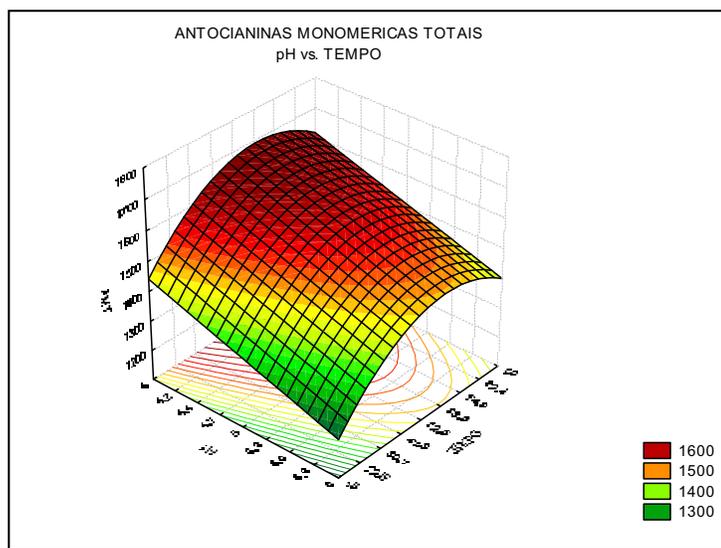


Figura 2.7 Superfície de resposta variáveis pH vs. Tempo – AMT- etanol.

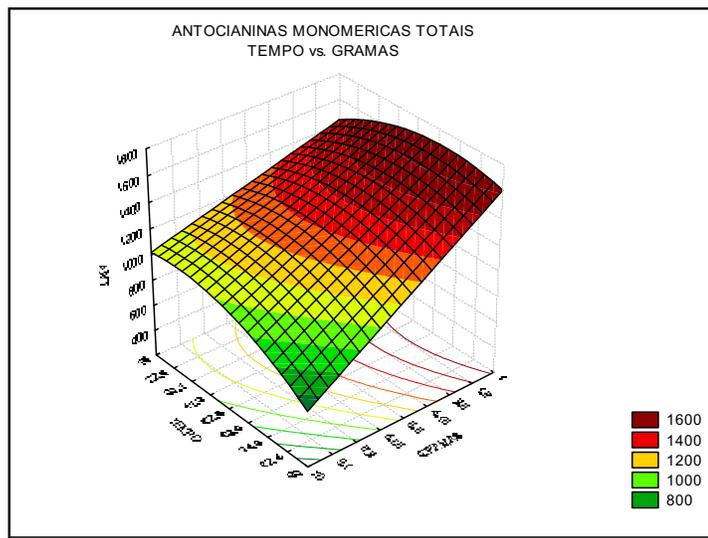


Figura 2.8 Superfície de resposta variáveis tempo vs. massa – AMT- etanol.

Variável Rendimento (R):

Como mostrado no Quadro 2.26, o efeito do pH não foi significativo se usado no nível -2 ou +2 (pH 4 ou 6 respectivamente). A variável massa resultou significativa demonstrando uma tendência que ao usar menos amostra melhora o rendimento do extrato. Enquanto a ANOVA (Quadro 2.27) mostra que a equação 6 é adequada para representar o modelo, já que o F calculado da regressão teve um valor de 32,32 em quanto que o F Tabelado teve um valor de 2,56. Embora o modelo tenha mostrado uma ligeira falta de ajuste sendo o F calculado apenas um pouco mais elevado que o F Tabelado foi gerada a superfície de resposta.

Quadro 2.26 Coeficientes de regressão R- etanol

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Media	19,21	0,32	0,000000
pH (L)	0,05	0,15	0,725910
pH (Q)	-0,12	0,17	0,483172
Massa (L)	-1,18	0,15	0,000101
Massa (Q)	0,50	0,17	0,019605
Tempo (L)	0,13	0,15	0,431177
Tempo (Q)	-0,29	0,17	0,127486
pH vs Massa	0,03	0,20	0,872139
pH VS Tempo	-0,14	0,20	0,506000
Massa vs Tempo	-0,56	0,20	0,024307

R²: 92,73 MS RESIDUAL: 0,3078

Equação do modelo codificado variável R:

$$R = 19,205 - 1,18\text{massa(L)} + 0,50\text{massa(Q)} - 0,56\text{massa}_x\text{tempo (6)}$$

Quadro 2.27 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos - R-etanol

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	26,172	3	8,724	32,32	2,56
Resíduo	3,508	13	0,269		
Falta de ajuste	3,446	11	0,313	10,01	9,4
Erro puro	0,062	2	0,031		
Total	29,681	16		R ² : 88,17	

A Figura 2.9 mostra, com o pH fixo no nível -2, mostra que usando a menor quantidade de amostra com um tempo de extração entre 65 e 90 min. poderia se obter um alto rendimento.

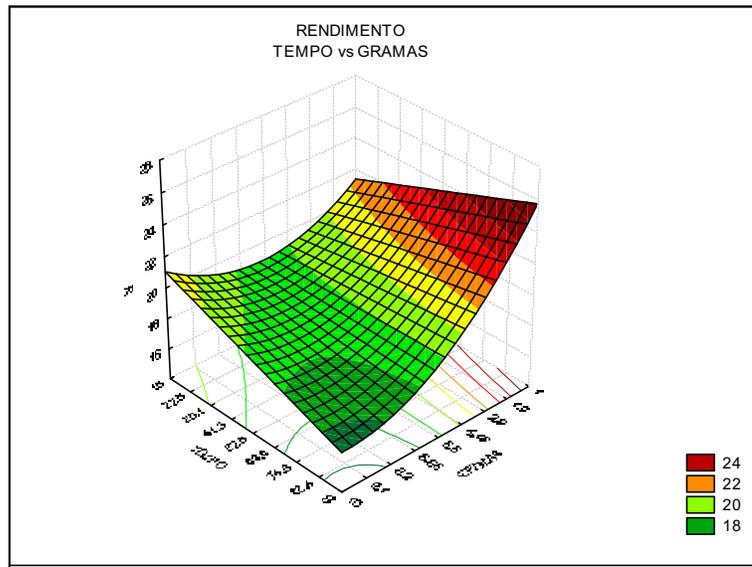


Figura 2.9: Superfície de resposta variáveis tempo vs. Massa – R-etanol

Variável Índice de atividade antioxidante (IAA):

Para o IAA, apesar das variáveis massa (Q) e o tempo (L) terem sido significativas, como mostrado no Quadro 2.28, e na ANOVA (Quadro 2.29) o F calculado tem sido maior que o F Tabelado da regressão do modelo expresso na equação 7, o R^2 que indica a porcentagem explicada pelo modelo foi muito baixo (38,58%), portanto, descartou-se os resultados obtidos e não foi gerada a superfície de resposta.

Quadro 2.28 Coeficientes de regressão IAA- etanol

	COEF DE R.	ERRO P.	T	Valor p
<i>Media</i>	1,61	0,61	12,47	0,000005
pH (L)	-0,06	-0,06	-1,06	0,324707
pH (Q)	-0,11	-0,11	-1,59	0,155590
Massa (L)	0,05	0,05	0,82	0,439270
Massa (Q)	-0,14	-0,14	-2,11	0,073147
Tempo (L)	-0,15	-0,150	-2,45	0,043942
Massa (Q)	0,04	0,040	0,53	0,615021
pH vs Massa	-0,44	-0,04	-0,57	0,589534
pH VS Tempo	0,13	0,13	1,66	0,140631
Massa vs Tempo	0,05	0,05	0,69	0,513541

R²: 73,07 MS RESIDUAL: 0,0504167

Equação do modelo codificado para a variável IAA:

$$IAA = 1,61 - 0,14\text{massa}(Q) - 0,150\text{tempo}(L) \quad (7)$$

Quadro 2.29 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – IAA – etanol

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	0,505	2	0,252	4,39	2,73
Resíduo	0,804	14	0,057		
Falta de ajuste	0,798	12	0,066	21,12	9,41
Erro puro	0,006	2	0,003		
Total	1,310	16		R ² :38,58	

Variável Fenólicos Totais (FT)

Para o teor de FT, a única variável significativa foi a massa da amostra, como mostrado no Quadro 2.30, mas, observou-se o mesmo problema que com a variável IAA. Apesar da regressão do modelo representado pela equação 8 ser apropriada, a falta de ajuste (Quadro 2.31) representada pelo R² foi extremadamente elevada, não sendo possível confiar nos resultados.

Quadro 2.30 Coeficientes de regressão FT- etanol

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Media	2345,71	188,14	0,000005
pH (L)	-79,01	88,35	0,400866
pH (Q)	-159,60	97,24	0,144745
Massa (L)	95,42	88,35	0,315922
Massa (Q)	-300,63	97,24	0,017528
Tempo (L)	-52,56	88,35	0,570618
Massa (Q)	-18,75	97,24	0,852600
pH vs Massa	-183,74	115,44	0,155473
pH VS Tempo	141,11	115,44	1,22241
Massa vs Tempo	170,03	115,44	1,47294

R²: 73,69 MS RESIDUAL: 106602,4

Equação do modelo codificado para a variável FT:

$$FT = 2345,71 - 300,63\text{massa(Q)} \quad (8)$$

Quadro 2.31 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT – etanol

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	880487	1	880487	6,76	3,07
Resíduo	1951346	15	130089,733		
Falta de ajuste	1944947	13	149611,308	46,76	9,35
Erro puro	6399	2	3199,5		
Total	2831833	16		R ² : 31,09	

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Depois de analisar as respostas obtidas pelo programa Statistica 7.0, conseguiu-se chegar aos parâmetros para a otimização da extração do pigmento do milho roxo com álcool etílico como solvente. As variáveis e os valores da condição ótima estão apresentados na Tabela 2.7

Tabela 2.7 Condições otimizadas para extração do pigmento do sabugo de milho roxo com etanol

Temperatura (°C)	pH	Tempo de extração (min)	Extrações (n)	Composição do solvente (%)	Massa da amostra (g)
30	4	75	3	20	1

A validação da condição escolhida foi feita em triplicata apresentando os resultados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 Validação do ponto ótimo do DCCR etanol

AMT (mg eq a cy-3-glu/100g)*	R (g/100g)*	IAA*	FT (mg de EAG/100g) *
1366,7± 6,32	20,70 ± 0,19	1,6 ± 0,10	2250,77 ± 53,18

*Médias de três repetições com o desvio padrão.

Finalmente foram feitas as comparações entre os valores preditos de cada um dos modelos encontrados com os valores observados na validação dos pontos ótimos. Na Tabela 2.9 são mostrados os resultados.

Nota-se que os valores obtidos na recuperação não conseguiram chegar aos valores preditos pelos modelos encontrados anteriormente, sendo que para as AMT, conseguiu-se apenas o 84,9% do teor esperado pelo modelo otimizado, no caso do R conseguiu-se quase a totalidade (97,2%). Para as outras duas respostas (IAA e FT), os valores resultaram muito menos representativos, já que, as condições finais utilizadas para a validação dos resultados não foram as recomendadas para essas respostas, porque foram priorizados os modelos para

obtenção de AMT e R. Vale ressaltar, que os modelos encontrados para IAA e FT foram descartados por não reunir os requisitos necessários para ser válidos.

Tabela 2.9 Valores preditos e obtidos do DCCR etanol

Respostas	Preditos	Obtidos	Recuperação (%)
AMT (mg eq cy-3-glu/100g)	1608,10	1366,7	84,98
R (g/100g)	21,30	20,70	97,19
IAA*	1,70	1,60	94,10*
FT (mg de EAG/100g)*	2850,77	2250,77	78,95*

*modelo não válido, descartado

- *EXTRAÇÃO COM ÁGUA COMO SOLVENTE*

O Quadro 2.32 apresenta a matriz do planejamento fracionado e os valores das respostas estudadas.

Ao avaliar os resultados, notou-se que o ensaio 17 está totalmente fora dos resultados obtidos no planejamento, por tanto, foi excluído.

Para a resposta AMT as variáveis temperatura e pH resultaram significativas com p valores de 0,025 e 0,049 respectivamente. A curvatura também foi significativa, a qual indica que possivelmente os níveis 0 do planejamento (pH 4 e 50°C) são os mais indicados para a obtenção dos valores máximos de AMT.

Quadro 2.32 Planejamento Fracionado Água 2⁵⁻¹

ENSAIO	T (C°)	pH	TEMPO (min)	EXTRAÇÕES (n)	MASSA (g)	R (g ext/100g)	AMT (mg eq cy-3-glu/100g)	IAA	FT (mg EAG/100g)
1	30	2	60	1	5	16,766	733,260	1,622	3337,022
2	70	2	60	1	1	22,781	1041,293	1,926	3112,718
3	30	6	60	1	1	19,419	1518,178	1,535	1954,249
4	70	6	60	1	5	19,692	1431,333	1,372	2779,566
5	30	2	120	1	1	17,541	666,790	1,750	2540,954
6	70	2	120	1	5	21,386	1122,363	1,836	1470,839
7	30	6	120	1	5	16,915	1125,242	1,496	4577,446
8	70	6	120	1	1	20,924	1600,299	2,090	3229,066
9	30	2	60	3	1	25,050	858,668	1,544	2535,285
10	70	2	60	3	5	20,310	1269,045	1,720	2553,367
11	30	6	60	3	5	19,018	1199,612	1,818	2321,439
12	70	6	60	3	1	22,600	1663,282	1,389	2042,588
13	30	2	120	3	5	18,591	1133,964	1,670	1921,416
14	70	2	120	3	1	30,398	1781,288	1,358	3448,352
15	30	6	120	3	1	24,756	1185,715	1,450	2449,085
16	70	6	120	3	5	22,420	1080,791	1,721	2017,437
17	50	4	90	2	3	3,260	239,988	1,021	502,539
18	50	4	90	2	3	25,437	1626,495	1,771	2899,484
19	50	4	90	2	3	23,735	1571,318	1,485	2427,078

T- temperatura, R- rendimento, AMT- antocianinas monoméricas totais, IAA- índice de atividade antioxidante, FT- fenólicos totais

Nos Quadros 2.33 a 2.36 podem ser observados os efeitos sobre as respostas avaliadas, para as AMT o pH (0,049) a temperatura (0,025) e a curvatura (0,063) foram significativas, sugerindo que o aumento nos valores de cada uma das variáveis incrementaria o teor. No caso do rendimento a temperatura (0,026) mostrou-se significativa para o planejamento, assim como as variáveis extrações e massa, com p valor de 0,008 e 0,007, respectivamente.

No caso da temperatura e das extrações a passagem de -1 a 1 foi positiva enquanto que para a variável massa foi negativa, indicando para esta última variável usar os menores valores da faixa estudada. A curvatura também foi significativa mostrando novamente que os níveis 0 devem ser adequados para o planejamento.

Para o IAA e os FT, nenhuma das variáveis mostraram-se significativas. Os efeitos das respostas nas variáveis estão mostrados nos Quadros 2.33-2.36

Quadro 2.33 Variáveis significativas para a resposta antocianinas monoméricas totais (AMT)-água.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	1213,20	62,32	0,000000
Curvatura	771,42	373,95	0,063541
Temperatura	321,03	124,65	0,025795
pH	274,72	124,65	0,049737
Tempo	-2,28	124,65	0,985749
Extrações	116,70	124,65	0,369244
Massa	-152,49	124,65	0,246755

R²: 62,22 MS residual:62147,39

Quadro 2.34 Variáveis significativas para a resposta rendimento (R)-água.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	21,16	0,54	0,000000
Curvatura	6,85	3,28	0,060523
Temperatura	2,81	1,09	0,026034
pH	-0,88	1,09	0,435007
Tempo	0,91	1,09	0,421356
Extrações	3,64	1,09	0,008873
Massa	-3,55	1,09	0,007771

R²: 74,96 MS residual: 4,77

Quadro 2.35 Variáveis significativas para a resposta índice de atividade antioxidante (IAA) -água.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	1,64	0,06	0,000000
Curvatura	-0,03	0,35	0,931982
Temperatura	0,07	0,12	0,586794
pH	-0,07	0,12	0,564281
Tempo	0,06	0,12	0,644352
Extrações	-0,12	0,12	0,328777
Massa	0,03	0,12	0,823468

R²: 15,35 MS residual: 0,54

Quadro 2.36 Variáveis significativas para a resposta fenólicos totais (FT) –água.

	EFEITOS	ERRO PAD.	VALOR p
Media	2643,18	211,22	0,000000
Curvatura	40,21	1267,33	0,975258
Temperatura	-122,87	422,44	0,776571
pH	56,37	422,44	0,896265
Tempo	127,30	422,44	0,768782
Extrações	-464,11	422,44	0,295390
Massa	-41,72	422,44	0,923105

R²: 11,36 MS residual: 713828,4

Uma vez analisados os efeitos das respostas sobre as variáveis, estabeleceu-se a faixa de estudo para o DCCR água. Apenas a variável pH e

massa foram reavaliadas, por tanto, foi realizado um planejamento completo 2². Apesar da temperatura ter sido significativa, ela foi fixada em 50°C (nível 0) tendo como base a curvatura significativa do planejamento fracionado para as respostas AMT e R. Além disso, essa escolha concorda com as pesquisas realizadas por Jing (2006) que assinalou 50°C como a temperatura ó tima para conseguir extrair a maior quantidade de antocianinas com uma menor quantidade de taninos e proteínas, e as pesquisas de Sampaio (2008) realizadas com jabuticaba, amora e jambolão, a qual indica que a extração de antocianinas deve ser realizada entre a faixa de 25 a 55°C, suficiente para facilitar a liberação de antocianinas dos vacúolos celulares da matriz, aumentar a permeabilidade do solvente nas estruturas celulares e ao mesmo tempo não acentuar a degradação posterior dos extratos obtidos.

No caso das variáveis não significativas, fixaram-se os valores em 60 minutos (menor nível estudado) e em três extrações. Decidiu-se realizar três extrações porque nos planejamentos anteriores notou-se que uma quarta extração não representava um grande incremento no teor das respostas estudadas, já que os extratos obtidos eram quase incolores.

Os valores escolhidos para realizar o DCCR água e os resultados do planejamento estão na Tabela 2.10 e no Quadro 2.37, respectivamente.

Tabela 2.10 Valores para o DCCR água 2².

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	4	4,4	5	5,6	6
Massa (g)	1	2,8	5,5	8,2	10

Quadro 2.37 Planejamento completo água 2² com as respostas experimentais obtidas

ENSAIO	pH	MASSA (g)	R (g ext/100g)	AMT (mg eq cy-3-glu/100g)	IAA	FT (mg EAG/100g)
1	4,4	2,8	19,15	1421,93	1,68	57250,92
2	5,6	2,8	19,43	1359,45	1,27	44793,19
3	4,4	8,2	18,32	1209,30	1,84	59540,45
4	5,6	8,2	18,89	1387,040	1,56	51001,84
5	4,4	2,8	20,87	1436,40	0,85	22634,67
6	5,6	2,8	20,75	1408,44	1,27	49310,72
7	4,4	8,2	17,95	1160,59	1,54	72661,01
8	5,6	8,2	17,82	1219,23	1,48	55542,41
9	4	5,5	19,02	1297,09	1,42	58860,48
10	6	5,5	19,12	1440,78	1,10	44706,42
11	5	1	23,48	1630,86	1,36	35774,35
12	5	10	18,17	1253,81	0,97	39504,63

R- rendimento, AMT- antocianinas monoméricas totais, IAA- índice de atividade antioxidante, FT- fenólicos totais.

ANÁLISE DO DCCR ÁGUA 2²:

Os resultados foram avaliados com a análise a 90% de confiança e α : 0,10.

Variável Antocianinas Monoméricas Totais (AMT):

Os coeficientes de regressão mostrados no Quadro 2.38 assinalam que não existe diferença significativa entre os níveis usados para o pH. Já a variável massa mostrou-se significativa tanto o coeficiente linear como o quadrático. A interação das duas variáveis não foi significativa. Ainda que o pH possa ser escolhido entre a faixa de 4 a 6, as pesquisas de Jing (2006), mostraram que extrações a pH de 5,5 eram melhores em termos de AMT do que aquelas realizadas a pH 4, contudo, pHs ácidos ajudam a manter a estabilidade das antocianinas.

Quadro 2.38 Coeficientes de regressão AMT- água.

	COEF DE R.	ERRO P.	Valor p
Media	1189,10	49,20	0,000000
pH (L)	3,40	34,79	0,925401
pH (Q)	-18,19	38,90	0,656636
Massa (L)	-159,05	34,79	0,003805
Massa (Q)	93,14	38,90	0,053711
pH vs Massa	32,59	49,20	0,532344

R²: 82,35 MS RESIDUAL: 9684,02

A ANOVA mostrou que a equação 9 é boa para representar o modelo obtido. O F calculado da regressão teve um valor de 18,5 enquanto que o F Tabelado teve um valor de 3,01, mas ao mesmo tempo mostrou uma ligeira falta de ajuste, pois o F calculado foi apenas um pouco superior ao Tabelado, como mostrado no Quadro 2.39. A superfície gerada do modelo AMT é mostrada na Figura 2.10.

Equação do modelo codificado para a variável AMT:

$$\text{AMT} = 1189,10 - 159,05\text{massa(L)} + 93,14\text{massa(Q)} \quad (9)$$

Quadro 2.39 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – AMT – água

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	264802,3	2	132401,15	18,45	3,01
Resíduo	64561,6	9	7173,51		
Falta de ajuste	59568,3	6	9928,05	5,96	5,28
Erro puro	4993,3	3	1664,43		
Total	329363,9	11		R ² : 80,39	

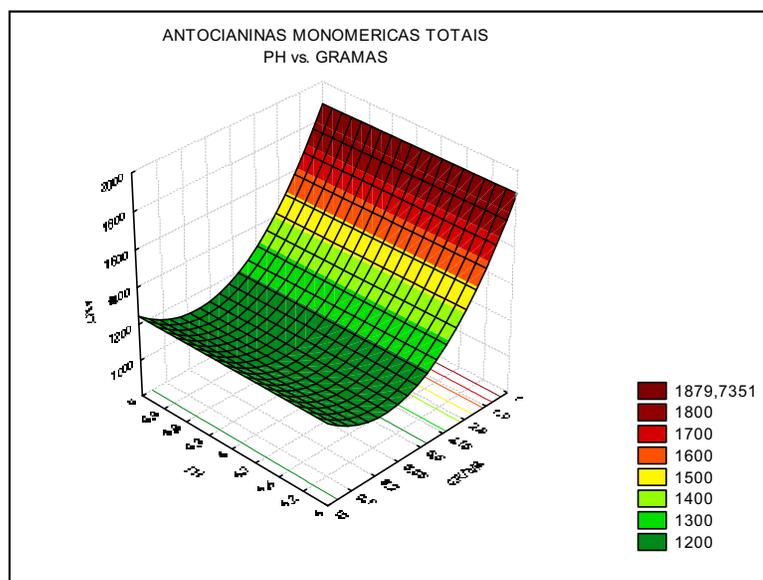


Figura 2.10 Superfície de resposta variáveis pH vs. massa – AMT – água

Variável Rendimento (R)

Para o R, as duas variáveis estudadas se comportaram da mesma forma que para as AMT. Sendo que o pH não se mostrou significativamente diferente nos níveis estudados. A variável massa mostrou-se significativa, tanto na sua forma linear como quadrática, com a mesma tendência que para as AMT, usando quantidades menores de amostra com uma faixa de pH entre 4 e 6 obtêm-se maior quantidade de extrato. Os coeficientes da regressão são mostrados no Quadro 2.40

Quadro 2.40 Coeficientes de regressão R – água.

	COEF DE R.	ERRO P.	P valor
Media	19,47	0,53	0,000000
pH (L)	0,10	0,38	0,795853
pH (Q)	-0,44	0,42	0,336110
Massa (L)	-1,90	0,38	0,002318
Massa (Q)	1,030	0,42	0,049575
pH vs Massa	0,29	0,53	0,609872

R²: 85,15 MS RESIDUAL: 1,126

Enquanto a ANOVA, mostrada no Quadro 2.41, indica que a equação 10 descreve corretamente o modelo da regressão visto que o F calculado foi maior do que o F Tabelado e o R² foi elevado, o modelo também mostrou falta de ajuste ao encontrar valores maiores no F calculado frente ao F tabelado. Contudo, as respostas foram consideradas e se gerou a superfície de resposta, mostrada na Figura 2.11.

Equação do modelo codificado:

$$R = 19,47 - 1,90\text{massa(L)} + 1,03\text{massa(Q)} \quad (10)$$

Quadro 2.41 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – R – água.

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	37,107	2	18,553	19,89	3,01
Resíduo	8,395	9	0,932		
Falta de ajuste	8,109	6	1,351	14,20	5,28
Erro puro	0,285	3	0,095		
Total	45,502	11		R ² :81,55	

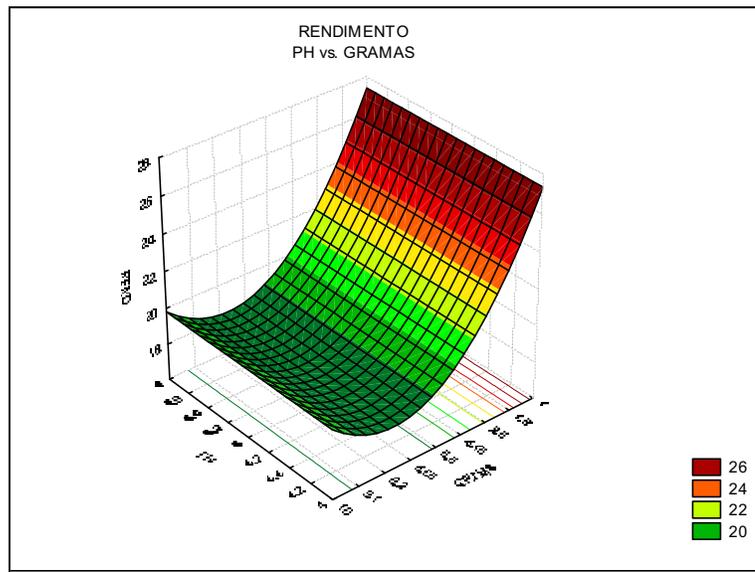


Figura 2.11 Superfície de resposta variáveis pH vs. massa – R – água.

Variável Índice de atividade antioxidante (IAA)

No caso do IAA, apenas a variável massa (Q) e sua interação com a variável pH mostraram-se significativas, como mostrado no Quadro 2.42.

Quadro 2.42 Coeficientes de regressão IAA- água

	COEF DE R.	ERRO P.	P valor
Media	1,51	0,08	0,000001
pH (L)	-0,01	0,05	0,913712
pH (Q)	-0,05	0,06	0,471555
Massa (L)	-0,08	0,05	0,762735
Massa (Q)	-0,13	0,06	0,080470
pH vs Massa	-0,20	0,08	0,044927

R²: 64,76 MS RESIDUAL: 0,023

A ANOVA (no Quadro 2.43) mostrou que a equação 11 é apropriada para descrever o modelo e que não há falta de ajuste. Mas a superfície mostrada na Figura 2.12, mostra que seria necessário usar os maiores níveis na faixa de massa da amostra, contradizendo o indicado para melhorar o teor de AMT e o de R, além disso, o pH deve ser estabelecido num valor de 6, o qual não é aconselhável para a estabilidade das AMT.

Equação do modelo codificado para a variável IAA:

$$IAA = 1,51 - 0,13\text{massa}(Q) - 0,20\text{pH}_x\text{massa} \quad (11)$$

Quadro 2.43 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – IAA – água.

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	0,247	2	0,123	6,93	3,01
Resíduo	0,160	9	0,017		
Falta de ajuste	0,130	6	0,021	2,21	5,28
Erro puro	0,029	3	0,009		
Total	0,408	11		R ² : 60,64	

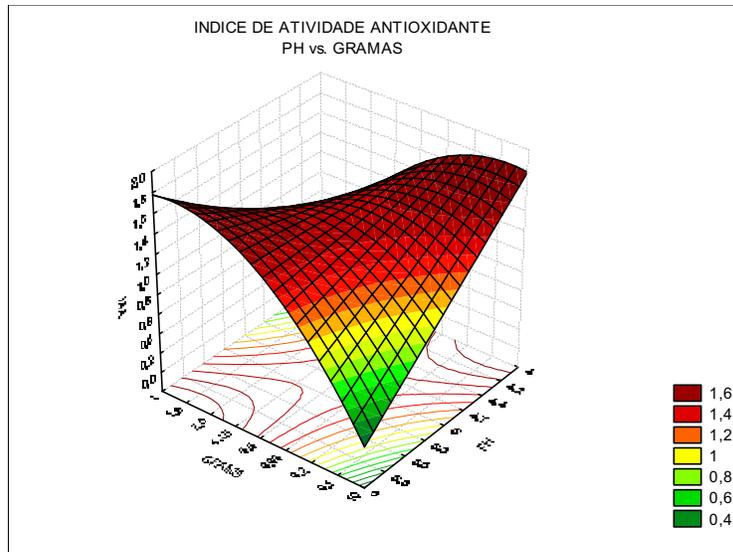


Figura 2.12 Superfície de resposta variáveis pH vs. massa – IAA – água.

Variável Fenólicos Totais (FT)

Para o teor de FT os coeficientes mostrados no Quadro 2.44 assinalam que só a interação entre as duas variáveis foi significativa para o incremento da resposta com um p valor de 0,066. Entretanto, a ANOVA mostra que a equação 12 não é boa para descrever o modelo, visto que o R^2 obtido foi de apenas 36,17%. como mostrado no Quadro 2.45, descartando-se os resultados obtidos.

Quadro 2.44 Coeficientes de regressão FT- água

	COEF DE R.	ERRO P.	P valor
Media	1997,52	118,63	0,000003
pH (L)	-10,24	83,88	0,906811
pH (Q)	-50,48	93,78	0,609779
Massa (L)	-75,08	83,88	0,405238
Massa (Q)	-129,71	93,78	0,215901
pH vs Massa	-264,940	118,63	0,066951

R²: 56,48 MS RESIDUAL: 56287,56

Equação do modelo codificado para a variável FT:

$$FT = 2345,71 - 300,63 \text{massa(Q)} \quad (12)$$

Quadro 2.45 ANOVA com os coeficientes não significativos excluídos – FT – água.

	SQ	GL	QM	F_{CAL}	F_{TAB}
Regressão	28770,7	1	280770,7	5,66	3,29
Resíduo	495346,2	10	49534,6		
Falta de ajuste	371206,3	7	53029,4	1,28	2,66
Erro puro	124139,9	3	41379,9		
Total	776116,9	11		R ² : 36,17	

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Depois de analisar as respostas obtidas pelo programa Statistica 7.0, conseguiu-se chegar aos parâmetros para a otimização da extração do pigmento do sabugo de milho roxo utilizando água como solvente. As variáveis e os valores da condição ótima estão apresentados na Tabela 2.11.

Tabela 2.11 Condições otimizadas para extração do pigmento do sabugo de milho roxo com água.

Temperatura (°C)	pH	Tempo de extração (min)	Extrações (n)	Massa da amostra (g)
50	4	60	3	1

A validação da condição escolhida foi feita em triplicata apresentando os resultados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12 Validação do ponto ótimo do DCCR água.

AMT (mg eq cy-3-glu/100g) *	R (g/100g)*	IAA*	FT (mg de EAG/100g) *
1293,81 ± 52,7	22,41 ± 0,34	1,13 ± 0,08	1823,90 ± 198,65

*Médias de três repetições com desvio padrão.

Finalmente foram feitas as comparações entre os valores preditos de cada um dos modelos encontrados com os valores observados na validação dos pontos ótimos. Na Tabela 2.13 são mostrados os resultados.

Tabela 2.13 Valores preditos e obtidos do DCCR água.

	V. Preditos	V. Obtidos	Recuperação (%)
AMT (mg eq a cy-3-glu/100g)	1282,04	1293,81	100,92
R (g/100g)	20,69	22,41	108,28
IAA	0,943	1,13	119,96
FT (mg de EAG/100g) *	2769,60	1823,90	65,85

*modelo não válido, descartado

Nota-se que os valores obtidos na recuperação conseguiram chegar aos valores preditos pelos modelos encontrados anteriormente, inclusive conseguiram exceder as expectativas dadas pelos modelos, já que, para as AMT, conseguiu-se uma recuperação de 101% do teor esperado pelo modelo otimizado, no caso do R conseguiu-se (108,2%). Para o IAA superou o valor estimado chegando até em 120% de recuperação. Vale ressaltar que o modelo de IAA teve um coeficiente de correlação (R^2) um pouco baixo (60%), por tanto o modelo pode estar subestimando as condições utilizadas nas validações. No caso do FT os valores resultaram muito menos representativos, já que, as condições finais utilizadas para a validação dos resultados não foram as recomendadas para essa resposta, além, este modelo foi descartado por não reunir os requisitos necessários para ser válidos.

Resultados e considerações finais dos DCCRs

Os resultados das validações dos três delineamentos centrais rotacionais são mostrados na Tabela 2.14, assim como cada uma das respostas estudadas neles.

Tabela 2.14 Resultados finais das validações de cada um dos DCCRs estudados.

DCCRs	AMT (mg cy-3-glu/100g)*	R (g/100g)*	IAA*	FT (mg EAG/100g) *
Acetona	1398,21 ± 7,16 _(a)	20,45 ± 0,41 _(a)	1,58 ± 0,11 _(a)	1762,34 ± 34,0 _(a)
Etanol	1366,70 ± 6,32 _(a,b)	20,70 ± 0,19 _(a)	1,60 ± 0,10 _(a)	2250,77 ± 53,18 _(b)
Água	1293,81 ± 52,7 _(b)	22,41 ± 0,34 _(b)	1,13 ± 0,08 _(b)	1823,90 ± 98,65 _(a)

* Médias de três repetições com o desvio padrão; ** letras iguais na mesma coluna indicam que não existe diferença significativa (95%), segundo Teste de Tukey.

A decisão sobre qual dos três solventes foi o melhor para otimizar a extração do pigmento de sabugo de milho roxo é complexa. Se for priorizada a extração de antocianinas monoméricas totais se terá como melhor extrator a solução de acetona a 20%, que logrou um teor de até 1400 mg/100 g de amostra, seguido da solução etanólica (20%) com um teor de aproximadamente 1370 mg/100 g de amostra, e por último a extração com água com um teor de 1300 mg/AMT 100 g de amostra. Contudo, deve-se notar que a solução com acetona teve um pH 6 como ótimo para a extração, enquanto as soluções etanólica e aquosa tiveram um pH 4, o qual é melhor em termos de estabilidade dos extratos, já que, como relatado em inúmeros trabalhos, as antocianinas encontram-se muito mais instáveis em pHs perto da neutralidade ou alcalinidade, por estarem na forma de estrutura quinonoidal, podendo sofrer degradação e conseqüente descoloração dos extratos em curtos períodos de tempo ao passar para os estados pseudobase carbinol ou chalcona (as quais encontram-se em equilíbrio). Se a questão a avaliar é o rendimento, nota-se que a água obteve maior proporção de extrato (22,4%) frente a os outros solventes (20,4 a 20,7% para a solução de acetona e etanol, respectivamente), portanto, em rentabilidade, a água pode ser o melhor extrato do ponto de vista econômico, ainda mais, se o objetivo for utilizar esses resultados para uma possível aplicação industrial. Em relação ao índice de atividade antioxidante, pode-se dizer que os extratos obtidos com soluções de acetona e álcool tiveram o mesmo valor (1,5), o qual pode ser catalogado como um extrato de alto potencial antioxidante, e o extrato aquoso como de potencial antioxidante bom, tendo uma escala na qual 1-1,4 corresponde a um composto antioxidante bom, a escala 1,5-1,9 a um composto muito bom, e maior que 2 um composto de altíssimo poder antioxidante. A atividade antioxidante apresenta resultados diretamente proporcionais ao teor dos compostos fenólicos totais, os quais mostraram uma tendência parecida. Dos 2250 mg EAG/100g de amostra encontrados no extrato etanólico, 60,7% correspondem às AMT que contêm o extrato, sendo que o restante (39,3%) correspondem a outros flavonóides, taninos, ácidos fenólicos possivelmente presentes. Seguem os FT extraídos com água que

somaram um teor de 1820 mg EAG/100g de amostra, das quais as AMT encontradas correspondem a 70,9%, e por último o teor de FT do extrato com solução cetônica (1760 mg EAG/100g de amostra), com 79,3% correspondentes às AMT. Nesse caso, observou-se que a solução de acetona por ter uma polaridade maior do que as outras duas, conseguiu o objetivo de atrair e extrair maior quantidade de FT como relatado em outras pesquisas sobre compostos fenólicos.

Em termos de salubridade, pode-se chegar a conclusão que, o melhor extrator é a solução aquosa, já que não apresenta riscos na posterior aplicação do extrato, por possíveis resíduos tóxicos. Não contribui no impacto ambiental e seria a forma mais pura e seletiva de extrair pigmentos.

Das condições de extração usadas nas validações, podemos conferir que 2 a 3 extrações são suficientes para qualquer um dos planejamentos finais.

A temperatura, outro fator importante na extração, foi fixada em 50°C, suficiente para facilitar a liberação de antocianinas e outros compostos fenólicos. Inicialmente a faixa de estudo da temperatura foi estabelecida de 30 a 70°C, com a finalidade de ver uma notória perda de antocianinas monoméricas nos extratos. Contudo, não se conseguiu observar com clareza esse decréscimo nos teores obtidos.

Quanto ao tempo de extração, o extrato obtido com água requereu de 60 min. de extração, enquanto a extração com etanol e acetona requereram tempos de 75 e 90 min., respectivamente. Portanto, os extratos obtidos com água mostraram-se como uma opção econômica, rápida, limpa, e com possibilidades de aplicação e estabilidade maiores do que os extratos obtidos com etanol ou acetona.

2.4 CONCLUSÕES

Os planejamentos experimentais foram uma boa ferramenta para melhorar e otimizar o processo de extração do pigmento de sabugo de milho roxo.

Dos três solventes utilizados, nenhum deles mostrou-se superior ao mesmo tempo para as quatro respostas estudadas. A água não foi o melhor solvente em relação à quantidade de AMT extraídas, já que foi menos eficiente do que a extração com 20% de acetona e a extração com 20% etanol. A diferença encontrada com a extração com acetona não foi considerável (100mg AMT/100g de amostra), comparando-se os riscos e perigos que significa o uso de acetona em extrações a maior escala.

No caso do R, a água demonstrou ser o melhor solvente, com um valor de 22,4%, seguido da solução etanólica que foi o segundo melhor extrator com 20,4%, e por último a solução cetônica.

Se tratando do IAA, as soluções de etanol e acetona resultaram em valores maiores, o que provavelmente deve-se a capacidade de extrair compostos com maior capacidade antioxidante em relação a água.

Os FT extraídos com etanol tiveram um teor maior do que aquele extraído com água, entretanto, a diferença não foi significativa.

Os planejamentos mostraram que varias extrações e períodos curtos de tempo com temperaturas baixas ou mornas, renderam maior quantidade de extrato.

O pH 4 mostrou-se importante, sobretudo para a extração e estabilidade das AMT extraídas.

2.5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO P.; JORGE N., Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 66(1): 232-240, 2007.

AGRONOTICIAS, **Revista para el desarrollo**, Año XXV. Edición 279, Lima, Peru, 2003.

A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. 13th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1975. p. 1.094.

CEVALLOS-CASALS B.; CISNEROS-ZEVALLOS L., Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants, **J Food Chem**, 86, 69-77, 2004.

FINKELSTEIN Y., VARDI J., Progressive Parkinsonism in a young experimental physicist following long-term exposure to methanol, **Neurotoxicol Journal**, 23 pags. 521-525, 2002.

FUKAMACHI K.; IMADA T.; OHSHIMA Y.; XU J.; TSUDA H., Purple corn color suppresses ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat, **J. Cancer Sci**, 99(9): 1841-1846, 2008.

GARZÓN G., Las antocianinas como colorants naturais y compuestos bioativos: Revisión, **Acta Biol. Colomb.**, Vol 13(3): 27-36, 2008.

- GIUSTI M.; WROLSTAD R., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy, *Current protocol in Food analytical chemistry*. Unidade F1.2, 2000.
- HAGIWARA A.; MIYASHITA K.; NAKANISHI T.; SANO M.; TAMANO S.; KADOTA T.; KODA T.; NAKAMURA M.; IMAIDA K.; ITO N.; SHIRAI T., Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PHIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine., **J. Cancer Letters**, 28;171(1):17-25, 2001.
- HODZIC Z.; PASALIC H.; MEMISEVIC A.; SRABOVIC M.; SALETOVIC M.; POLJAKOVIC M., The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extract, **Europ J Sci Res**, vol 28 (3): 471-477, 2009.
- JING P., **Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships**. Tese de doutorado, The Ohio State University, EUA, 2006.
- KUSKOSKI E. M.; ASUERO A. G.; GARCÍA-PARILLA C.; TRONCOSO ANA M.; FETT R., Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **J. Ciê Tec Alim**, 24(4) out/diz, 2004.
- KUSKOSKI E.M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO A. M.; MANCINI-FILHO J.; FETT R., Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **J Ciê Tec Alim**, 25(4)out/diz, 2005.
- KUSKOSKI E.M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO A. M.; MORALES M. T.; FETT R., Frutos Tropicales silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, 36(4)1283-1287, 2006.

- MALACRIDA, C. R., **Compostos fenólicos e alguns parâmetros físico-químicos em suco de uva**. Belo Horizonte. 120 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.
- NESS A. R.; POWLESS J. W., Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a Review. **Int. J. Epidemiol.**, 26: 1-13, 1997
- PADDA M.; PICHA H., Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes, **Scient Hortic**, 119(1): 17-20, 2008.
- PEDRESCHI R.; CISNEROS-ZEVALLOS L., Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from andean purple corn (Zea mays L.) **J Agric Chem**.54:4557-4567, 2006.
- PIMENTEL C. V. M. B.; FRANCK V. M.; GOLLUCKE A.P.B., Introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. In livro: Alimentos funcionais, Editorial Varela, Brasil, 2005.
- SAMPAIO P., **Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas**, dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 2008.
- SINGLETON V.L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTÓS R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **J Meth Enzymol** 299: 152–178, 1999.
- SCHERER, R.; GODOY H., Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, **J Food Chem** 112, 654–658, 2009.
- SOUSA, C.; SILVA H.; VIEIRA-JR G.; AYRES M.; COSTA L.; ARAÚJO D.; CAVALCANTE L.; BARROS E.; ARAÚJO P.; BRANDÃO M.; CHAVES M., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, 30(2) 351-355, 2007.

YOKOHIRA M.; YMAKAWA K.; SAOO K.; HOSOKAWA K.; HASHIMOTO N.; KUNO T.; IMADA K., Antioxidant effects of flavonoids used as food additives (purple corn color, enzymatically modified isoquercitrin and isoquercitrin) on liver carcinogenesis in rat medium-term bioassay. **J. Food Science** 73(7):c561-8, 2008.

CAPITULO 3

IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS PRESENTES NO EXTRATO OTIMIZADO DE SABUGO DE MILHO ROXO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Cerro-Quintana, Romina Sofia; Godoy, Helena Teixeira

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

RESUMO

O milho roxo é uma boa fonte de antocianinas, substâncias que tem sido apontadas como importantes na prevenção e no combate de doenças degenerativas, como câncer de cólon, pulmão, arteriosclerose, artrites, cataratas, entre outras. Assim, alguns pesquisadores têm se dedicado a caracterização das antocianinas presentes no milho roxo, tendo como variáveis a origem da matriz e o tipo de extração ao qual tem sido submetido. A variedade de milho roxo *arequipeño* tem sido avaliada como uma das melhores cepas, entre as outras conhecidas, principalmente pelo elevado teor de antocianinas totais presente nos grãos e, especialmente, no sabugo do milho. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar as antocianinas presentes no extrato do sabugo de milho roxo variedade *arequipeño*, obtido segundo Cerro-Quintana e Godoy (dados ainda não publicados). Para tanto, inicialmente foram realizados testes de separação das antocianinas presentes no extrato, por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Uma vez separadas as possíveis antocianinas presentes, identificaram-se as mesmas por meio da técnica de Espectrometria de Massas (EM). As antocianinas identificadas no extrato otimizado foram: cianidina-3-o-glicosídeo, pelargonidina-3-o-glicosídeo, peonidina-3-o-glicosídeo, cianidina-3(6"malonilglicosídeo), pelargonidina-3(6"malonilglicosídeo), peonidina-3(6"malonilglicosídeo), cianidina-3-(3",6"-dimalonilglicosídeo), peonidina-3-(3",6"-dimalonilglicosídeo) e pelargonidina-dimalonilglicosídeo, sendo esta pela primeira vez observada, embora a posição dos grupos malonil ainda necessitem de confirmação.

Palavras chave: sabugo de milho roxo, antocianinas, identificação, CLAE, EM.

ANTHOCYANINS IDENTIFICATION OF OPTIMIZED PURPLE CORNCOB EXTRACT BY MASS ESPECTROMETRY

ABSTRACT

Purple corn is a great anthocyanins source, which are important to prevent and fighting degenerative diseases like colon cancer, lung cancer, arteriosclerosis, arthritis, cataracts, among others. From this, determination of anthocyanins present in this matrix are being studied by different scientists, having as independent variables the matrix origin and the kind of extraction process that the sample has passed through. Purple corn variety called *Arequipeño* has been evaluated as one of the best strains among the most known strains of purple corn, because of the high yield of anthocyanins present in the kernels and especially at the cob. In this way, this job had the aim of identifying the anthocyanins presents on the previously optimized purple corn extract (Cerro-Quintana e Godoy, 2009) of this special variety. With this purpose, were separated the compounds in this extract, with high performance liquid chromatography technique (HPLC). Once that the possible anthocyanins were separated, were found out their identities with mass spectrometry technique (EM). The identified anthocyanins on the optimized extract were: cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-(6''malonylglucoside), pelargonidin-3-(6''malonylglucoside), peonidin-3-(6''malonylglucoside), cyanidin-3-(3'',6''-dimalonylglucoside), peonidin-3-(3'',6''-dimalonylglucoside) e pelargonidin-dimalonylglucoside, since it's the first time that the presence of this compound has been noticed, however, the position of the malonic groups still need to be confirmed.

Key words: purple corncob, anthocyanins, identification, HPLC, MS.

INTRODUÇÃO

O milho roxo é uma variedade de milho que se caracteriza por apresentar altos teores de antocianinas nos seus grãos e sementes.

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes à classe dos flavonóides e são responsáveis por uma variedade de cores atrativas de frutas,

flores, folhas e cereais que variam do vermelho ao azul. Na natureza encontram-se associadas a moléculas de açúcares (Albarici et al., 2006).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada à detecção por arranjo de diodos (DAD) em extratos de plantas, tem sido eficiente para a separação, identificação e quantificação de compostos polares como as antocianinas. (Jing e Giusti, 2007) No entanto, o detector de arranjo de diodos não provê a seletividade necessária para a garantia da identidade dos analitos.

A existência de tecnologias modernas de análise como a espectrometria de massas, tem demonstrado ser apropriada para identificar e quantificar matrizes (Horbowicz et al., 2008).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica de elevada seletividade, que permite a identificação das substâncias analisadas a partir do monitoramento dos seus íons produzidos. O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica (*atmospheric pressure ionization* – API) permitiu uma nova era em análises qualitativas e quantitativas. O sistema API inclui a ionização por *electrospray* -ESI e a ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI), que são capazes de auxiliar na determinação de composto de alta massa molar e de características não voláteis sem a necessidade de derivatização. A ionização por ESI é uma das técnicas mais versáteis de ionização, especialmente para caracterização de biomoléculas (Jing e Giusti, 2007). Por ser uma técnica branda, é apropriada para produzir íons de espécies complexas, que podem ser termolábeis, como é o caso das antocianinas, por isso, tem sido reconhecida como uma técnica de resultados satisfatórios para determinação de estruturas de vários tipos de flavonóides (Harborne, 1994).

A espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) é um processo no qual um íon formado em uma dada fonte de ionização é selecionado pela sua razão massa/carga (m/z) em um primeiro estágio da análise, seguido de uma reação de fragmentação, e então, seus fragmentos iônicos formados são monitorados no

segundo estágio da análise. O tipo e a qualidade dos dados obtidos podem variar significativamente dependendo do tipo de analisador de massas empregado nos diferentes estágios da análise. Instrumentos híbridos de EM/EM são os que envolvem a combinação de dois analisadores diferentes, como o analisador de massas do tipo quadrupolo (Q) associado em série a um tempo de voo (*time-of-flight*, ToF)

A confirmação da identidade das antocianinas presentes no extrato do sabugo de milho roxo é uma etapa importante a ser realizada, já que, pode servir de base para processos tecnológicos nos quais o extrato possa ser aplicado como aditivo natural. Diante disto, o presente trabalho objetivou a confirmação da identidade das antocianinas nas formas mono e diglicosiladas, assim como grupos complexados com um ou mais moléculas de ácido malônico, empregando um equipamento do tipo ESI-EM/EM (Q-ToF).

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Material

Foram usados aproximadamente 100 sabugos de milho roxo (*Zea mays L.*), da variedade *arequipeño*, adquiridos no mercado local da cidade de Tacna, Perú. Os sabugos foram selecionados, cortados em fatias e posteriormente moídos, homogeneizados e armazenados em sacolas de polietileno de baixa densidade (PEBD) com zíper hermético a -12°C .

3.1.2 Solventes e reagentes

Foram utilizados acetonitrila e metanol grau cromatográfico, fornecidos pelo Omnisol (Alemanha) e J.T. Baker (USA) respectivamente, ácido fórmico P.A., ácido clorídrico P.A., foram fornecidos pela Ecibra (Brasil), ácido acético glacial P.A. (Synth, Brasil), água ultra pura (Millipore, Brasil). A filtragem das amostras foi feita

com membranas de tetrafluoroetileno de 0,45 e 0,22 μm , ambos fornecidos por Millipore (EUA).

3.1.3 Equipamentos

Para os testes de separação das possíveis antocianinas presentes no extrato foi utilizado um cromatógrafo a líquido (Agilent, EUA), com injetor automático, bomba quaternária, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD). O processamento dos dados foi realizado no programa Chemstation.

Para a identificação das antocianinas presentes nas amostras, foi empregado um equipamento de espectrometria de massas (EM) modelo Micromass (Waters, USA), composto por um sistema de ionização por *electrospray* (ESI), associado a um sistema híbrido de analisadores de massas constituído pelo quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF). O controle instrumental e o processamento dos dados foram realizados no programa Masslynx versão 4.0.

3.1.4 Obtenção do extrato de sabugo de milho roxo

O extrato foi obtido por extração líquido-sólido. Um grama de sabugo moído de milho roxo foi extraído com 100 mL de água a pH 4,0, por 60 minutos a 50°C e em constante agitação em banho Maria (Dubnoff, Brasil).

O extrato aquoso foi filtrado em papel filtro Whatman n° 1 e reextraído mais duas vezes. Os extratos foram combinados, liofilizados (Terroni Lb 300TT, Brasil) e armazenados a -15°C. A extração foi feita em triplicata para validação dos resultados.

3.1.5 Separação de antocianinas por CLAE

A separação das antocianinas por CLAE foi baseada na metodologia de Sampaio (2008) com algumas modificações. Foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈ (150 x 3,9 mm, 5 µm) utilizando-se como fase móvel ácido fórmico 10% e metanol, com eluição por gradiente. As soluções foram filtradas em membranas de 0,45 µm de porosidade, antes da injeção direta no espectrômetro.

3.1.6 Preparação das amostras para injeção no ESI-EM/EM

Para a aquisição dos espectros de massas, preparou-se soluções de 1,25 mg/mL do extrato liofilizado de sabugo de milho roxo em água: acetonitrila (50:50 v/v), adicionando-se 6,9 µL de ácido acético, para um volume final de 5 mL. As soluções foram filtradas em membranas de 0,22 µm de porosidade, antes da injeção direta no espectrômetro.

Foram dispensadas a concentração e purificação da amostra por técnicas como extração em fase sólida (SPE), baseada na pesquisa de Sampaio (2008), a qual demonstrou que não havia diferença significativa entre os espectros de antocianinas adquiridos com e sem purificação.

O analisador de massas quadrupolo foi programado para selecionar a faixa de íons de razão m/z entre 200 e 900 u. As condições analíticas do ESI-EM/EM para identificação de antocianinas se apresentam na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Condições analíticas do ESI–EM/EM para identificação de antocianinas em extrato do sabugo de milho roxo

Ionização	
Fonte do íon	ESI
Modo de operação	Positivo
Capilar (V)	2800
Cone da amostra (V)	30
Cone de extração (V)	0,5
Temperatura de desolvatação (°C)	250
Temperatura da fonte (°C)	100
Fluxo do gás no Cone (L/h)	55
Fluxo do gás de desolvatação (L/h)	300
Fluxo da bomba (uL/min)	5
Quadrupolo	
Energia do íon (V)	1
Energia de colisão (V)	10
Tempo de Vôo	
Tubo de vôo (V)	5630
Detector MPC (V)	2700

* Para fragmentação do íon, a energia de colisão (MS/MS) foi de 15 V

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.1 Separação dos compostos presentes no extrato de sabugo de milho roxo por CLAE

Inicialmente foram realizados testes segundo a metodologia descrita por Sampaio (2008), mas, essas condições não resultaram adequadas para a

separação dos analitos, por tanto, realizaram-se algumas modificações na metodologia. O gradiente de eluição e os respectivos tempos utilizados para a melhor separação dos compostos estão apresentados na Tabela 3.2. A detecção foi realizada a 520 nm. Os cromatogramas foram obtidos após filtração em membranas com porosidade de 0,45 µm.

Tabela 3.2 Gradiente de eluição e tempo para separação de antocianinas

Tempo (minutos)	Acido Fórmico (v/v)	Metanol (v/v)
0	80	20
20	75	25
30	70	30

- Vazão da fase móvel: 0,7 mL/min.

- Volume de injeção: 50 µL

- Tempo de eluição: 30 min

O cromatograma com os compostos separados do extrato liofilizado de sabugo de milho roxo é mostrado na Figura 3.1

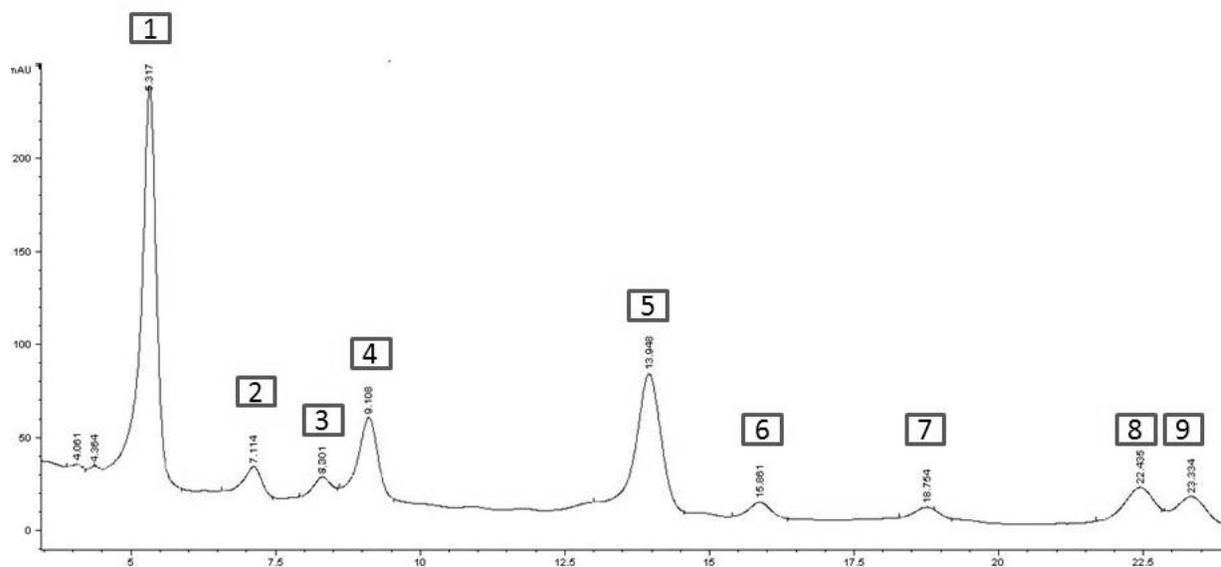


Figura 3.1 Cromatograma do extrato liofilizado do sabugo de milho roxo

*A possível identificação dos compostos aqui numerados correspondem aos listados no quadro 3.1

A partir do cromatograma obtido e dos estudos de Fossen et al. (2001), Pascual-Teresa et al. (2002), Aoki et al (2002), Pedreschi e Cisneros-Zevallos (2006) e Jing (2006), foram presumidas as presenças de 9 antocianinas no extrato analisado. Ainda, tomando como base os espectros de absorção de todos os picos eluídos (os quais mostraram espectros característicos) na região do visível, bem como a ordem de eluição dos mesmos, foram apontadas as possíveis identidades das antocianinas encontradas. Os espectros de absorção e as possíveis antocianinas presentes no extrato são mostrados no anexo 1 e na Tabela 3.3 respectivamente.

Tabela 3.3 Possíveis antocianinas presentes no extrato de sabugo de milho roxo

Pico	Antocianina
1	Cianidina-3-glicosídeo
2	Pelargonidina-3-glicosídeo
3	*
4	Peonidina-3-glicosídeo
5	Cianidina-3(6''malonilglicosídeo)
6	Pelargonidina-3(6''malonilglicosídeo)
7	*
8	Peonidina-3(6''malonilglicosídeo)
9	Cianidina-3(3''6''dimalonilglicosídeo)

* desconhecido

Diante da indisponibilidade de padrões analíticos de antocianinas glicosiladas e aciladas no período das análises, a confirmação da identidade dos analitos foi realizada mediante o emprego da técnica de espectrometria de massas (ESI-EM/EM).

3.2.2 Identificação das antocianinas por espectrometria de massas

As amostras foram analisadas por injeção direta no espectrômetro de massas. As condições de operação do EM estão apresentadas na Tabela 3.1.

Como etapa inicial para os testes de identificação das antocianinas, foi realizada injeção da amostra no espectrômetro de massas para o monitoramento em varredura, com o propósito de se observar os íons presentes. Foi empregado o sistema de ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI+), operando nas condições descritas anteriormente na Tabela 3.1. O espectro de massas obtido é apresentado na Figura 3.2.

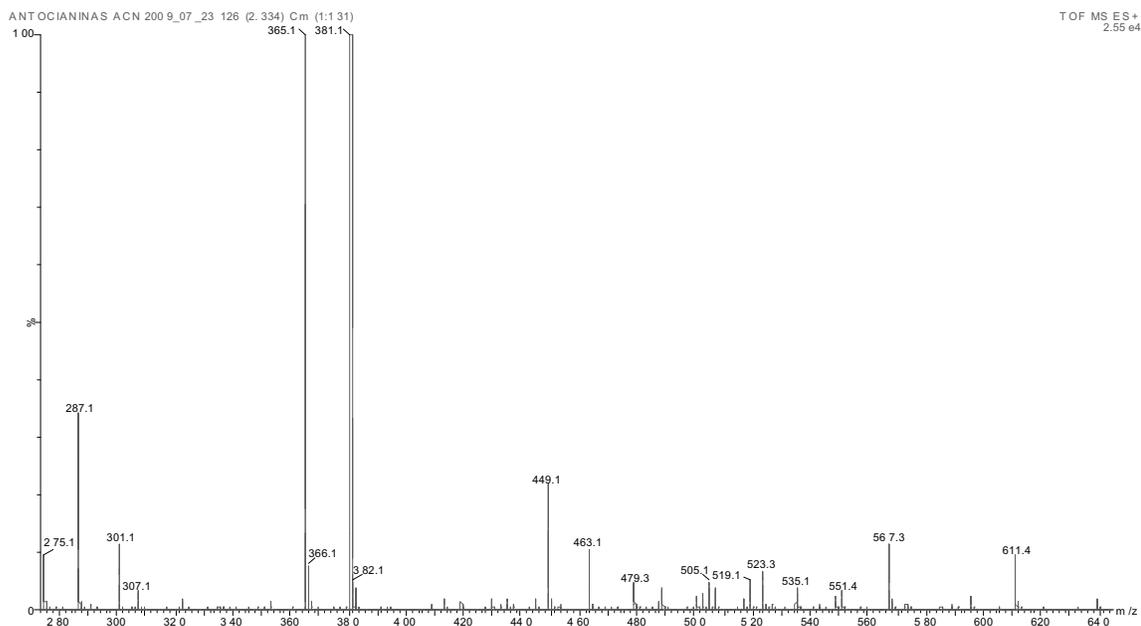


Figura 3.2 Espectro de massas dos íons do extrato de sabugo do milho roxo.

A partir do espectro apresentado na Figura 3.2, foram selecionados os íons obtidos que corresponderiam às antocianinas de interesse, apresentados na Tabela 3.3. Para a confirmação da identidade desses íons, procedeu-se a análise dos mesmos por EM/EM. Nessa operação, o quadrupolo foi programado para selecionar o íon de interesse ($\pm 1u$), e então, foi aplicada uma energia de 15 eV na célula de colisão para promover a fragmentação do mesmo. Desta forma, o íon de interesse e seu respectivo fragmento principal foram monitorados durante 1 minuto de aquisição de dados.

Alguns trabalhos relatados na literatura identificaram três antocianidinas (cianidina, pelargonidina e peonidina) no milho roxo, tanto na forma glicosilada, quanto em formas complexadas (glicose-ácido malônico) (Fossen et al. 2001, Pascual-Teresa et al. ,2002; Aoki, et al. 2002; Pedreschi e Cisneros-Zevallos,

2006 e Jing, 2006). Autores como Baraud et al. (1974) verificaram além da presença das antocianinas já mencionadas, a presença de cianidina-3-galactosídeo nas folhas e sementes desta variedade de milho, enquanto Harborne e Self (1987) e Fossen et al. (2001) indicaram a presença de cianidina-3-(3",6"-dimalonilglicosídeo) nas folhas e flores da planta. Schwarz et al. (2003) encontraram a presença de traços de cianidina-3-(3",6"-dimalonilglicosídeo) em um extrato comercial de milho roxo, assim como traços de peonidina-3-(3",6"-dimalonilglicosídeo), sendo que este último composto resultou numa novidade para os dados já encontrados nesta matriz por diferentes cientistas. González-Paramás et al. (2006) identificou uma nova antocianina, a qual seria um dímero (epi)catequina-cianidina-3-glicosídeo-5-glicosídeo.

No caso das análises realizadas nos três extratos liofilizados do sabugo de milho roxo, foram encontrados íons moleculares positivamente carregados com m/z de 449, 433, 463, 535, 519 e 549u os quais corresponderiam a cianidina-3-o-glicosídeo, pelargonidina-3-o-glicosídeo, peonidina-3-o-glicosídeo, cianidina-3-(6"malonilglicosídeo), pelargonidina-3-(6"malonilglicosídeo) e peonidina-3-(6"malonilglicosídeo), corroborando os resultados de Fossen et al. (2001), Pascual et al. (2002), Pedreschi e Cisneros-Zevallos (2006), Jing (2006) e Aoki et al. (2002). Nos extratos analisados, essas seis antocianinas foram confirmadas ao serem observadas as m/z de 287, 271 e 301u, as quais são as m/z correspondentes das agliconas cianidina, pelargonidina e peonidina respectivamente. Observou-se também a perda de 162u correspondente a uma molécula de glicose no caso dos íons 449, 433 e 463, assim como, a perda de 248u correspondente a uma molécula de glicose (162u) somada a uma molécula de ácido malônico (86u) para os íons 535, 519 e 549, quando foi aplicada uma energia de ionização alta sobre as moléculas promovendo a fragmentação ou dissociação das mesmas. As Figuras 3.3 a 3.8 apresentam os espectros de massas em *tandem* (EM/EM) das antocianinas anteriormente indicadas.

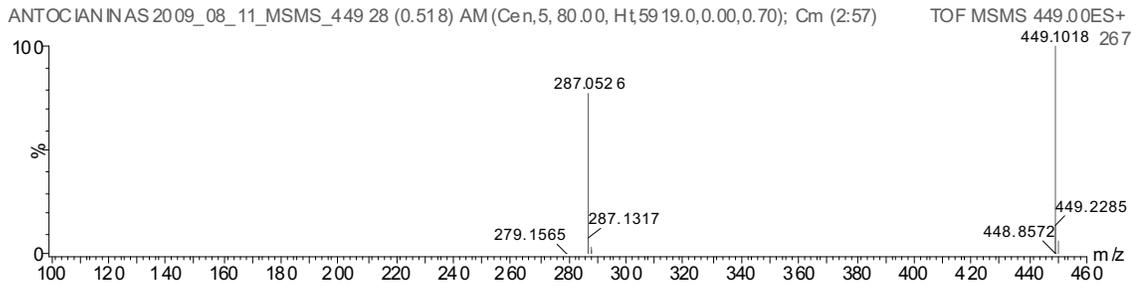


Figura 3.3 Espectro de fragmentação da cianidina-3-glicosídeo (m/z 449).

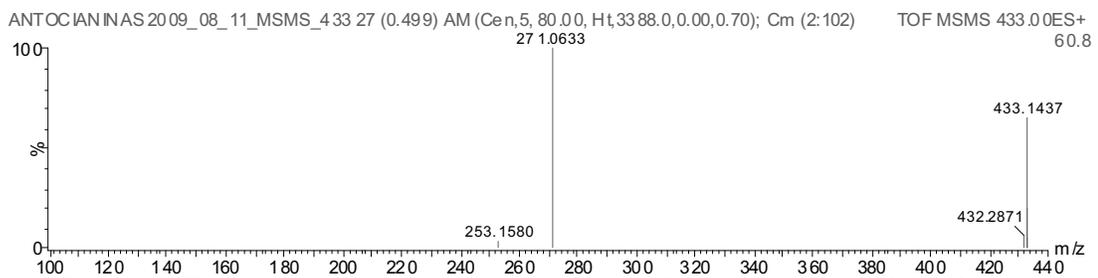


Figura 3.4 Espectro de fragmentação da pelargonidina-3-glicosídeo (m/z 433).

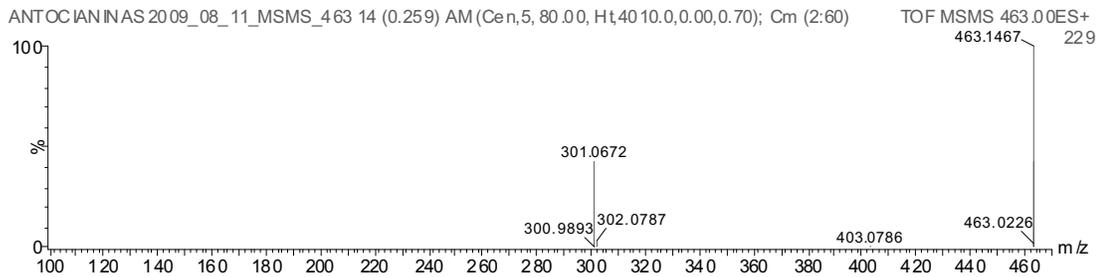


Figura 3.5 Espectro de fragmentação da peonidina-3-glicosídeo (m/z 463).

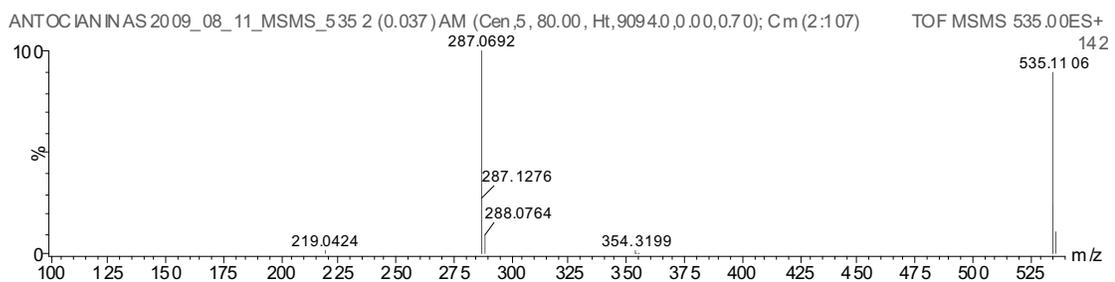


Figura 3.6 Espectro de fragmentação da cianidina-3-(6'-malonilglicosídeo) (m/z 535).

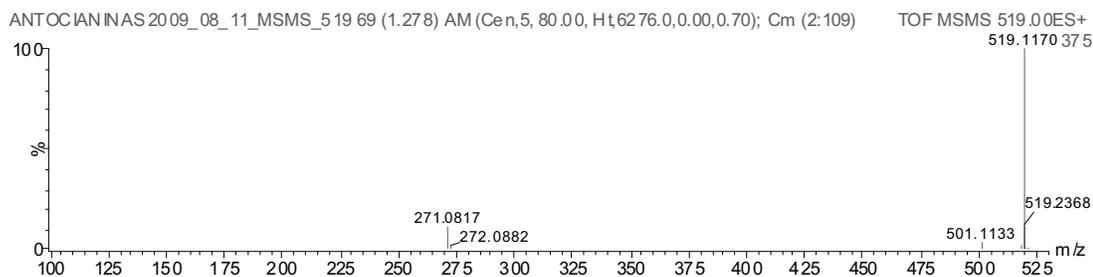


Figura 3.7 Espectro de fragmentação da pelargonidina-3-(6'malonilglicosídeo) (m/z 519).

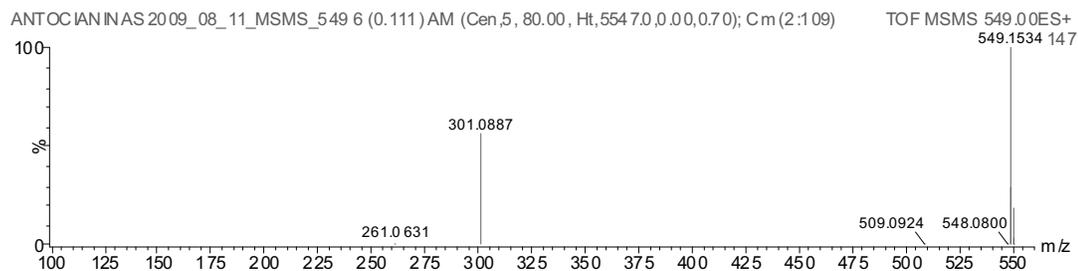


Figura 3.8 Espectro de fragmentação da peonidina-3-(6'malonilglicosídeo) (m/z 549).

Nas análises realizadas por ESI-EM/EM nos extratos liofilizados obtidos a partir do sabugo de milho roxo foram corroboradas as presenças de íons de m/z 621 e 635 os quais correspondem as moléculas de cianidina-3-(3",6"dimalonilglicosídeo) e peonidina-3-(3",6"dimalonilglicosídeo), respectivamente, sendo que uma vez aplicada uma energia de ionização mais elevada se reconheceram os íons de m/z 287 e 301u correspondentes as agliconas cianidina e peonidina, as quais sofreram a perda de 334u, devido a dissociação de duas moléculas de ácido malônico (172u) somada a uma molécula de glicose (162u) da antocianidina. Também foi confirmada a presença do íon de m/z 605 o qual corresponderia à molécula de pelargonidina complexada com duas moléculas de ácido malônico e uma de glicose, sendo que, nenhum dos trabalhos anteriormente

publicados observou a presença desta antocianina nas flores, folhas, grãos ou mesmo no sabugo do milho roxo. Os espectros de massas em *tandem* (EM/EM) dos extratos liofilizados obtidos a partir do sabugo de milho roxo demonstrando a presença das três antocianinas complexadas com duas moléculas de ácido malônico e uma molécula de glicose, são mostrados nas Figuras 3.9 a 3.11.

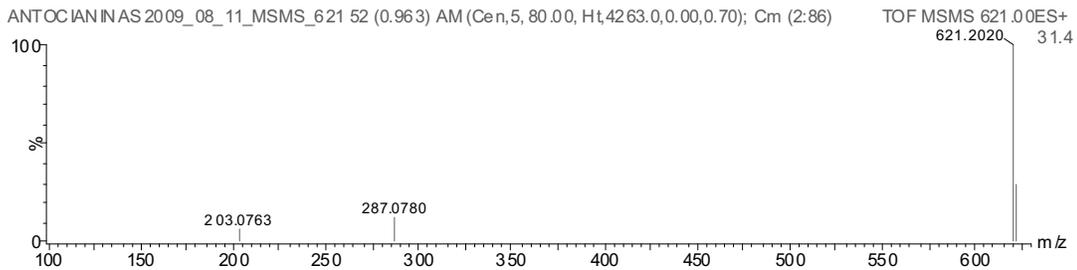


Figura 3.9 Espectro de fragmentação da cianidina-3-(3",6"dimalonilglicosídeo) (m/z 621)

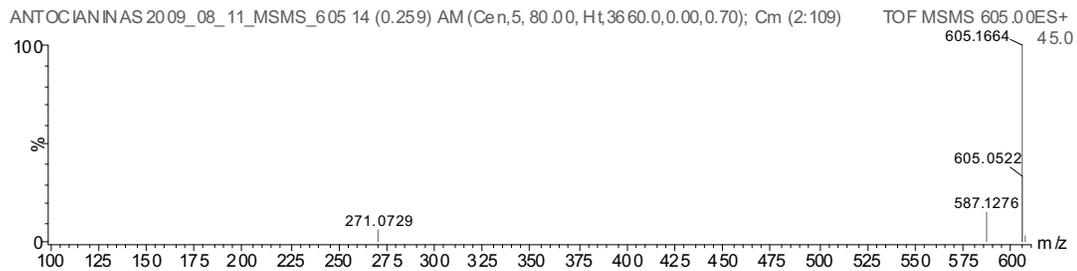


Figura 3.10 Espectro de fragmentação da pelargonidina-dimalonilglicosídeo (m/z 605)

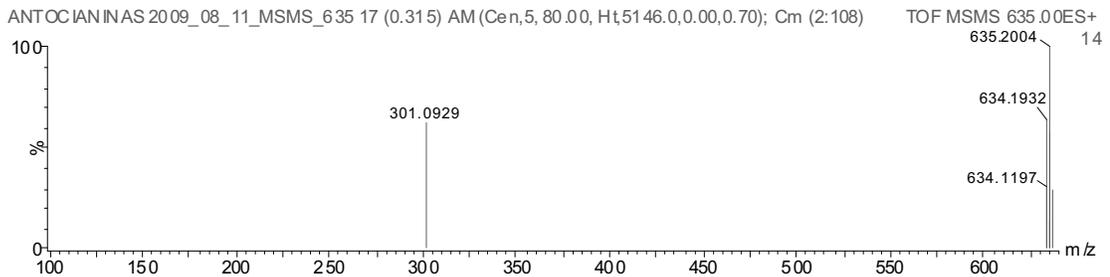


Figura 3.11 Espectro de fragmentação da peonidina-3-(3",6"dimalonilglicosídeo) (m/z 635)

O analisador do tipo TOF (tempo de voo) tem a reconhecida característica de alta exatidão de massas, com erro de massas de até 10 ppm. No entanto, os íons monitorados apresentaram um erro de exatidão de massas expressivamente superior ao que o equipamento oferece devido a problemas de calibração.

Não foi possível utilizarmos o recurso do “*lockspray*”, o qual é responsável pela manutenção da calibração do equipamento durante as análises. Desta forma, o equipamento foi calibrado imediatamente antes de se proceder as análises, porém, a calibração não pode ser assegurada durante a aquisição dos dados das mesmas. O ToF é um analisador de massas especialmente vulnerável à variação de temperatura em virtude do comprometimento do percurso do íon ao longo do túnel de voo, o que pode também afetar ou influir nas análises realizadas.

3.3 CONCLUSÕES

A separação das antocianinas por CLAE foi eficiente, mas sem a disponibilidade de padrões analíticos glicosilados e/ou acilados não foi possível a identificação das agliconas com esse equipamento.

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* mostrou-se uma poderosa ferramenta para monitorar a presença e identificação das antocianinas do extrato a partir do sabugo de milho roxo.

Foram identificadas nove antocianinas presentes no extrato de sabugo de milho roxo, das quais oito tem sido relatadas em pesquisas anteriores e uma delas (pelargonidina-dimalonilglicosilada) foi identificada pela primeira vez nesta matriz, entretanto ainda falta a identificação das posições dos grupos malonil.

Os resultados mostraram que o extrato analisado contém antocianinas com presença de grupos glicosídicos e malônicos, os quais conferem maior estabilidade a estrutura.

3.4 AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CNPQ pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa e FAPESP (Proc. n°04/09149-8) pelo uso do espectrômetro de massas.

3.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALBARICI T.; CRUZ J.; ROSSI M., **Efeito das variações de pH e temperatura sobre polpa de açaí – estudos espectrofotométricos e cromatográficos**, Comunicado Técnico 78, ISSN 1517-4786, Ministério de Agricultura, pecuária e abastecimento, 2006.
- AOKI H.; KUZE N.; KATO Y., Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays L*), *Food and Food Ingredients J. Jpn*, 199,41, 2002.
- BARAUD, J.; GENEVOIS L., PANART J.P., Anthocyanins of corn. **J. Agric. Biol. Trop. Bot. Appl.** 11: 55-59, 1974.
- FOSSEN T.; SLIMESTAD R., Anthocyanin.; Andersen O., Anthocyanins from Maize (*Zea mays*) and Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea*), **J Agric Food Chem**, 49: 2318-2321, 2001.
- GONZÁLEZ-PARAMÁS A.; LÓPEZ DA SILVA F.; MARTÍN-LÓPEZ P.; MACZ-POP G.; GONZÁLEZ-MANZANO, ALCALDE-LEÓN C.; PÉREZ-ALONSO J.; ESCRIBANO-BAILÓN M.; RIVAS-GONZALO J.; SANTOS-BUELGA C., Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts, **J Food Chem**, 94: 428-436, 2006.
- HARBONE, J., *The Flavonoids: advanced in research since 1986*, 5th edition, Champman and Hall: New York, 1994.
- HARBORNE J; SELF R, Malonated cyanidin 3-glucosides in *Zea mays* and other grasses, **J Phytochem** 26: 2417-2421, 1987.
- HORBOWICZ M.; KOSSON R.; GRZESIUK A.; DEBSKI H., Anthocyanins of fruits and vegetables - their occurrence, analysis and role in human nutrition, 2008.

- JING P., **Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships**, Tese de doutorado, The Ohio State University, USA, 2006.
- JING P.; GIUSTI M., Analysis of anthocyanins. In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties, Taylor and Francis Group, LLC., 479-506, 2007.
- PASCUAL-TERESA S.; SANTOS-BUELGA T.; RIVAS-GONZALO J., LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob, **J. Science Food Agric.**, 82: 1003-1006, 2002.
- PEDRESCHI R.; CISNEROS-ZEVALLOS L., Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays L.*), **J. Agric Food Chem**, 54: 4557-4567, 2006.
- SAMPAIO G., **Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas**, dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 2008.
- SCHWARZ M.; HILLEBRAND S.; HABBEN A.; DEGENHARDT P.; WINTERHALTER P., Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins **Biochem. Eng. J.** 14:179-183, 2003.

CAPITULO 4

APLICAÇÃO DO EXTRATO DO SABUGO DE MILHO ROXO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR AO LONGO DO TEMPO EM TRÊS SISTEMAS MODELOS

Cerro-Quintana, Romina Sofia; Godoy, Helena Teixeira

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-862 – Campinas-SP.

RESUMO

As antocianinas são substâncias responsáveis pela cor de alguns alimentos, como flores, frutas e grãos, que vão desde a coloração vermelha até a azul. O interesse nessas substâncias não se deve apenas à cor que apresentam, mas as propriedades antioxidantes e antimutagênicas que auxiliam a prevenir e até combater doenças como câncer, diabetes, hipertensão, entre outras. Além dessas importantes propriedades, o mercado tem grande interesse na utilização de pigmentos naturais em substituição aos artificiais. Neste trabalho aplicou-se o extrato do sabugo de milho roxo em três sistemas modelo (bebida isotônica, suco instantâneo e gelatina), e em três diferentes concentrações, com a finalidade de se avaliar o poder tintorial do pigmento em comparação com amostras contendo pigmentos sintéticos e a estabilidade da cor dos produtos ao longo do tempo de consumo dos produtos, sob condições de temperatura e luminosidade diferentes. Os resultados obtidos mostraram que o pigmento extraído a partir do sabugo de milho roxo foi estável nas amostras de gelatina e suco instantâneo, no entanto, na bebida isotônica apresentou diferenças significativas na coloração durante o período de estocagem. Em relação às concentrações testadas, verificou-se que no caso da gelatina, nenhuma das três concentrações testadas conseguiu atingir os parâmetros de cor da amostra padrão. No entanto, a concentração de 0,8 mg/mL testada na amostra de suco instantâneo conseguiu chegar nos parâmetros de cor da amostra comercial utilizada como padrão. Por último, as concentrações de 0,5 e 0,8 mg/mL testadas nas amostras de bebida isotônica chegaram muito próximas do padrão.

Palavras chave: cor, antocianinas, vida de prateleira, estabilidade, poder tintorial, gelatina, suco instantâneo, bebida isotônica.

APLICACION OF PURPLE CORNCOB EXTRACT AND STABILITY EVALUATION OF COLOR OVER TIME IN THREE MODEL SYSTEMS

ABSTRACT

Anthocyanins are phenolic compounds responsible for some flowers, fruits and grain's bright attractive orange, red, purple and blue colors. The considerable interest on them isn't only due to the coloring properties, instead, it is because of the antioxidant and antimutagenic activities that helps to prevent and combat diseases as cancer, diabetes, hypertension, among others. Color and stability of vegetables pigments are associated to its chemical structure, and the medium condition of the matrix where are applied, as pH, concentration of the pigment, metal presence, ascorbic acid presence, sugars, oxygen, temperatures and enzymes. pH sensitivity is the principal limitation factor. On this job, were applied the purple corncob extracts in three food model matrixes (isotonic soft drink, instant juice and gelatin) and in three different concentrations, with the objective of evaluate the color strength of the pigment comparing with synthetic samples, and color stability of these products over time, when located under different temperature and light conditions. Obtained results showed that purple corncob pigment was stable over time in gelatin and instant juice samples, however, isotonic soft drink showed significance difference on color parameters at the end of the evaluations. While, the three tested concentrations didn't reach the standard color parameters on gelatin samples. However the concentration of 0,8 mg/mL, tested on instant juice matched with the color parameters of the standard one. Finally, 0,5 e 0,8 mg/mL concentrations in isotonic soft drink were very close of the standard color parameters.

Key words: color, shelf-life, stability, color strength, anthocyanins, gelly, instant juice, isotonic soft drink.

INTRODUÇÃO

A escolha e compra de um alimento é normalmente baseada na aparência do mesmo. Os consumidores reconhecem cor, sabor e textura como os atributos mais importantes na hora da escolha de um produto. Destes, a cor ressalta-se

como o mais importante, já que, é associado à segurança alimentar (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003; Mattila-Sandholm e Saarela, 2003; Giusti e Wrolstad, 2003).

Os corantes sintéticos têm sido muito utilizados em alimentos, fármacos e cosméticos. Embora muitas substâncias podem ser utilizadas com a finalidade de colorir, em alimentos esse número se restringiu a sete corantes artificiais (Delgado-Vargas e Paredes-López, 2003). A crescente preocupação por possíveis efeitos adversos à saúde pelo consumo de corantes sintéticos, levou à comunidade científica a pesquisar sobre eles, e os seus possíveis substituintes. Os corantes vermelho nº40 e vermelho nº2 são os mais usados a nível mundial, embora, em países como o Japão, a Áustria, a Noruega e a Suécia tenham sido proibidos de usá-los por indícios de que o consumo de corantes sintéticos vermelhos provoquem quadros de hiperatividade em crianças em idade escolar (Garzón, 2008).

O milho roxo é uma variedade de milho que apresenta coloração intensa nos seus grãos e sabugos, sendo que esta cor se deve à grande quantidade de antocianinas presentes na matriz. As antocianinas são componentes que se encontram naturalmente em frutas, flores, cereais e folhas e tem como função protegê-los da radiação ultravioleta, ademais, estão associadas à resistência aos patógenos e atuam melhorando a fotossíntese (Mazza e Miniati, 1993). Além disso, apresentam propriedades benéficas como melhora da visão noturna, redução do risco de doenças coronárias, redução do colesterol ruim, propriedades anticâncer e antimutagênicas, entre outros. Motivos pelos quais vem ganhando importância e o interesse dos consumidores (Angelo e Jorge, 2006; Garzón, 2008).

A estabilidade das antocianinas varia dependendo da forma de extração do pigmento, do meio em que se encontram, assim como, do pH, temperatura,

presença de metais, açúcares, outras moléculas associadas a sua estrutura, luz, enzimas, entre outros. (Jing, 2006)

Desde o ponto de vista tecnológico e da saúde o uso de pigmentos naturais para coloração de alimentos é preferido e recomendável. Entretanto, o alto custo da extração destes pigmentos a partir de fontes naturais, a baixa capacidade tintorial e estabilidade em produtos industrializados provocaram uma diminuição do interesse das indústrias na utilização dos mesmos (Socaciu, 2008).

Este trabalho teve como objetivo a aplicação do pigmento do sabugo de milho roxo em três sistemas alimentares, com a finalidade de avaliar o poder tintorial e a estabilidade da cor ao longo do tempo em condições diferentes de luz e temperatura, utilizando o sistema CIE L* a* b* por meio dos parâmetros de cor L*C* h e ΔE .

4.1 MATERIAIS E METODOS

4.1.1 Material

Foram usados os sabugos de milho roxo (*Zea mays L.*), da variedade *arequipeño*, adquiridos no mercado local da cidade de Tacna, Peru. Os sabugos foram selecionados, cortados em fatias e posteriormente moídos, homogeneizados e armazenados em sacolas de polietileno de baixa densidade (PEBD) com zíper hermético a -12°C.

As garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 100 mL foram fornecidas por Vedapack (Brasil), e as embalagens de sobremesa (PET) de 80 mL foram fornecidas por Galvanotek (Brasil).

4.1.2 Amostras e reagentes

Foram utilizadas amostras comerciais não coloridas, de bebida isotônica e gelatina em pó. Para a preparação das amostras de suco, foram utilizados ácido cítrico fornecido pela Synth (Brasil) e açúcar refinado comercial. Todos os reagentes e solventes necessários para as determinações foram de grau analítico.

4.1.3 Equipamentos

Para armazenagem das amostras foi utilizada uma geladeira doméstica (Brastemp-Brasil) enquanto que para as análises de sólidos totais e pH, foram usados um refratômetro de bancada e um pHmetro (Mettler – Toledo 320-UK)

4.1.4 Obtenção do pigmento

O pigmento foi obtido por extração líquido-sólido, segundo os resultados obtidos por Cerro-Quintana e Godoy (dados não publicados). Porções de 1g de sabugo moído de milho roxo foram extraídos com 100 mL de água a pH 4, por 60 minutos, a 50°C e em constante agitação em banho Maria (Dubnoff, Brasil). Os extratos aquosos foram filtrados em papel filtro Whatman n° 1 e reextraídos mais duas vezes, para serem posteriormente secos em liofilizador (Terroni Lb 300TT, Brasil). Os extratos foram armazenados a -15°C, até o momento de sua aplicação.

4.1.5 Preparo e condicionamento dos sistemas modelos

Foram realizadas análises físicas e de cor das amostras comerciais coloridas artificialmente as quais foram utilizadas como padrões, com a finalidade de reproduzir essas características nos sistemas modelo utilizados.

No Quadro 4.1 se descrevem o pH, graus Brix e os parâmetros de cor L*a*b* das amostras comerciais.

Quadro 4.1 Características físicas e visuais das amostras comerciais

Amostras	pH	Brix	L*	a*	b*
Gelatina sabor cereja	3,89	7	34,50	68,02	36,94
Suco instantâneo dietético sabor amora	2,81	0,5	37,83	53,54	49,05
Bebida isotônica sabor morango-maracujá	3,02	5,5	55,90	68,67	70,39

Os extratos liofilizados foram adicionados em três sistemas modelo (bebida isotônica incolor, gelatina incolor e suco instantâneo) em três concentrações diferentes para cada uma delas, com as respectivas triplicatas, para avaliação do erro experimental. As concentrações utilizadas são mostradas no Quadro 4.2.

Quadro 4.2 Concentrações do pigmento usado nos sistemas modelo

Amostra	Conc.	mg/mL
Bebida Isotônica	1	0,2
	2	0,5
	3	0,8
Suco Instantâneo	1	0,2
	2	0,5
	3	0,8
Gelatina	1	0,2
	2	0,3
	3	0,4

Uma vez adicionado o extrato, as matrizes foram agitadas, homogeneizadas até solubilização total e fechadas hermeticamente com tampa de rosca (no caso dos isotônicos e sucos artificiais) e com tampa simples no caso da gelatina. Nas garrafas contendo as bebidas isotônicas foi feita a substituição do ar por nitrogênio (para evitar a influencia do oxigênio na amostra, já que não existe presença deste na amostra comercial antes de aberta). Imediatamente,

realizaram-se as leituras dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*), “tempo 0” para análise da estabilidade e vida prateleira das amostras.

O tempo, a luz incidente e a temperatura em que as amostras foram colocadas, foram os fatores condicionantes para a avaliação da estabilidade da cor, sendo que as bebidas isotônicas estiveram estocadas numa câmara fechada, com uma fonte de luz fluorescente direta (3200 lux), localizada na parte superior central da câmara, simulando o período médio de 13 horas de luminosidade diária a que um produto fica exposto numa prateleira convencional nos supermercados, chegando a uma temperatura média de 26,9°C, umidade relativa de 37,5%, e mantidos na câmara por até 16 dias. No caso dos sucos artificiais e as gelatinas, foram estocados em geladeira convencional a uma temperatura média de 6 ± 2 °C por 7 dias e com iluminação ocasional, simulando o consumo e estocagem destes produtos em geladeira residencial por um consumidor.

4.1.6 Análise de cor

A cor das amostras foram determinadas utilizando-se o colorímetro Hunter Lab., Modelo ColorQuest II, previamente calibrado no modo transmitância total, para a leitura dos parâmetros L^* , a^* e b^* , no qual L^* define a Luminosidade ($L^*=0$ preto e $L^*=100$ branco), enquanto a^* e b^* , associam-se a cromaticidade (valores positivos de a^* estão na região do vermelho e valores negativos na região do verde, no caso do parâmetro b^* , valores positivos estão na região do amarelo e valores negativos estão na região do azul) e os resultados convertidos para L^*C^*h e ΔE . As leituras foram feitas com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°.

4.1.7 Análise estatística

Cada tratamento foi analisado pelo Teste de Tukey com um nível de confiança de 95%, com ajuda do programa Statistic Versão 7.0.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1 Análise comparativa entre as concentrações das amostras

- Amostra “gelatina”

As concentrações escolhidas para a gelatina foram: Gel 1 (0,2 mg/mL), Gel 2 (0,3 mg/mL), Gel 3 (0,4 mg/mL). A Tabela 4.1 mostra os valores médios L*, a*, b*, C* e h das amostras no “dia 0”, assim como o valor do ΔE em relação à amostra padrão, as quais representam as concentrações iniciais sem mudança ou influência de nenhum fator externo.

Tabela 4.1 Valores dos parâmetros L*, a*, b*, C* e h para a amostra “gelatina” no início do estudo.

Gelatina/ concentração	L*	a*	b*	C*	h	ΔE
GEL 1 0,2 mg/mL	72,43 ± 0,19 ^a	27,14 ± 0,45 ^a	12,7 ± 0,03 ^a	29,96 ± 0,41 ^a	25,08 ± 0,36 ^a	60,81
GEL 2 0,3 mg/mL	63,50 ± 0,95 ^b	36,42 ± 0,84 ^b	15,19 ± 0,26 ^b	39,46 ± 0,87 ^b	22,64 ± 0,13 ^b	48,09
GEL 3 0,4 mg/mL	58,79 ± 1,53 ^c	41,57 ± 1,24 ^c	17,11 ± 0,41 ^c	44,95 ± 1,30 ^c	22,37 ± 0,12 ^b	41,02
GEL 4 PADRÃO	34,5 ^d	68,02 ^d	36,94 ^d	77,4 ^d	28,51 ^c	0

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

De acordo com os dados obtidos, observou-se que nenhuma das três concentrações empregadas nas gelatinas conseguiu atingir a coloração da gelatina padrão, sendo que, todas as amostras diminuíram em luminosidade com

o aumento da concentração da mesma, mas, sem alcançar o valor de L^* da amostra padrão. Os mesmos resultados foram observados para o ΔE (mudança total da cor). Enquanto a cromaticidade (C^*) os quais envolvem a relação entre a^* e b^* , notou-se que a saturação das amostras incrementou-se com o aumento da concentração de 0,2 para 0,4 mg/mL, mas não foi suficiente para atingir os valores de C^* da gelatina padrão. Todas as amostras se mostraram mais claras, menos saturadas e com ângulo de tonalidade mais vermelho que o padrão, como mostrado na Figura 4.1.

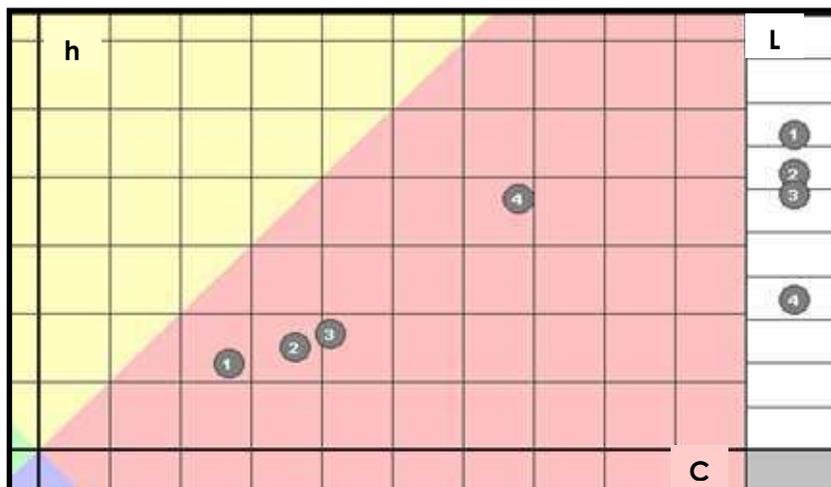


Figura 4.1 Quadrante da região do amarelo-vermelho mostrando as coordenadas L^* C^* e h das amostras (1- 0,2 mg/mL; 2- 0,3 mg/mL e 3- 0,4 mg/mL) e do padrão (4) de gelatina.

- Amostra “suco instantâneo”

As concentrações do pigmento escolhidas para o suco instantâneo foram de 0,2; 0,5 e 0,8 mg/mL. A Tabela 4.2 mostra os valores médios L^* , a^* , b^* , C^* e h das amostras, assim como o ΔE obtidos no início do ensaio.

Tabela 4.2 Valores dos parâmetros L*, a*, b*, C*, h e ΔE para a amostra “suco instantâneo” no início do estudo.

SUCO/ concentração	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
SUC 1 0,2 mg/mL	64,98 ± 0,48 ^a	53,18 ± 0,47 ^a	22,81 ± 0,45 ^a	57,87 ± 0,59 ^a	23,22 ± 0,26 ^a	37,76
SUC 2 0,5 mg/mL	48,02 ± 1,67 ^b	64,25 ± 0,20 ^b	46,61 ± 1,64 ^b	79,38 ± 1,08 ^b	35,96 ± 0,90 ^b	15,11
SUC 3 0,8 mg/mL	38,06 ± 0,61 ^c	63,14 ± 0,16 ^c	51,61 ± 0,21 ^c	81,55 ± 0,25 ^c	39,26 ± 0,04 ^c	9,94
SUC 4 PADRÃO	34,5 ^c	53,54 ^a	49,05 ^d	72,61 ^d	42,49 ^d	0

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Observou-se uma relação linear em relação a luminosidade das amostras analisadas, sendo que, a maior concentração do pigmento, o valor de L* diminuiu, se aproximando ao padrão. A luminosidade da amostra com concentração 0,8 mg/mL foi estatisticamente igual ao do padrão. O ΔE e o ângulo de tonalidade do suco mais concentrado seguiram a mesma tendência, sendo a amostra mais concentrada a mais próxima dos valores padrões.

Os dados demonstraram que as amostras com concentrações de 0,5 e 0,8 mg/mL aproximaram-se mais aos dados do suco padrão, sendo que uma concentração média entres estes dois últimos, poderia ser suficiente para reproduzir a cor artificial aplicada no produto comercial (Figura 4.2).

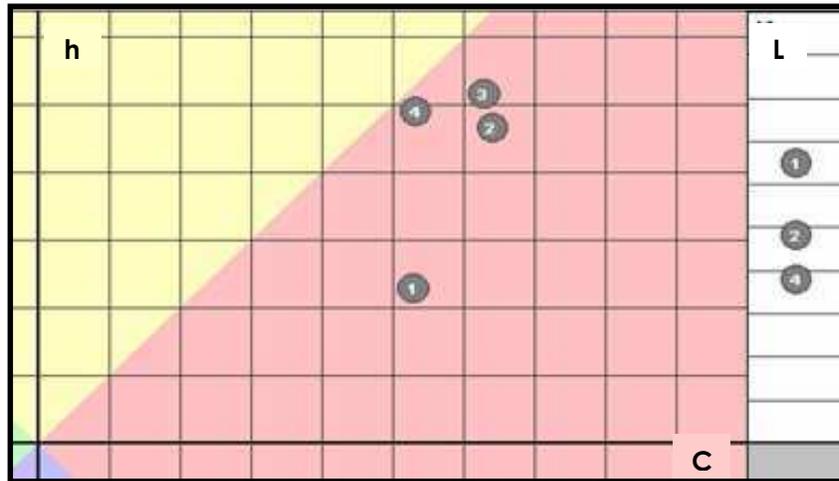


Figura 4.2 Quadrante da região do amarelo-vermelho mostrando as coordenadas L^* C^* h das amostras e do padrão de suco instantâneo.

- Amostra “bebida isotônica”

As concentrações escolhidas para o suco instantâneo foram: Iso 1 (0,2 mg/mL), Iso 2 (0,5 mg/mL), Iso 3 (0,8 mg/mL). A Tabela 4.3 mostra os valores médios L^* , a^* , b^* , C^* e h e ΔE das amostras, adquiridos no início do estudo.

As amostras com concentrações de 0,5 e 0,8 mg/mL demonstraram valores próximos de C^* , ainda que diferentes estatisticamente, a maior diferença foi em relação a luminosidade. Este resultado indica que, o pigmento tem uma saturação máxima em relação ao vermelho e ao amarelo, o qual não aumenta linearmente com o aumento da concentração, apenas fica mais escuro. Foi observado que a bebida isotônica base para aplicação do pigmento apresentava turbidez inicial, sendo assim, por não ser uma solução transparente pode ter interferido nos valores de luminosidade.

Tabela 4.3 Valores dos parâmetros L*, a*, b*, C*, h e ΔE para a amostra “bebida isotônica” no início do estudo.

Bebida isotônica	L*	a*	b*	C*	h	ΔE
ISO 1	58,51 ±	46,93 ±	23,47 ±	52,47 ±	26,57 ±	51,7
0,2 mg/mL	0,52 ^a	0,39 ^a	0,42 ^a	0,52 ^a	0,26 ^a	
ISO 2	42,69 ±	58,13 ±	43,62 ±	72,68 ±	36,88 ±	31,6
0,5 mg/mL	0,79 ^b	0,07 ^b	0,70 ^b	0,47 ^b	0,42 ^b	
ISO 3	32,93 ±	57,77 ±	46,55 ±	74,19 ±	38,86 ±	34,8
0,8 mg/mL	0,91 ^c	0,28 ^b	0,77 ^c	0,70 ^c	0,33 ^c	
ISO 4	55,90 ^d	68,67 ^c	70,39 ^d	98,34 ^d	45,71 ^d	0
PADRÃO						

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

No caso da amostra com concentração mais baixa, esta apresentou uma luminosidade maior, muito próxima do padrão e ao mesmo tempo cromaticidade muito diferente. Foi observado que o C* das amostras apresentou um aumento linear em relação a concentração do pigmento empregado. As três concentrações avaliadas não foram suficientes para atingir o C* apresentado pelo padrão. Por último, o ΔE, o qual demonstra a mudança total da cor em relação ao padrão, apresentou o menor valor com concentração média (0,5 mg/mL), mas o valor de ΔE determinado foi grande, o que indica diferença significativa em relação ao padrão (Figura 4.3).

Como mencionado anteriormente, para a amostra “gelatina” nenhuma das três concentrações aplicadas foi suficientemente elevada para atingir a coloração da amostra padrão, mas, foi possível notar que com uma concentração maior poderia chegar-se nos valores correspondentes ao modelo padrão. Já na amostra “suco instantâneo” a concentração 3 (0,8 mg/mL) foi o suficientemente intensa para conseguir atingir os parâmetros do suco padrão, resultando numa excelente alternativa de substituição do corante artificial. Finalmente, as concentrações testadas na amostra “bebida isotônica” não conseguiram apresentar uma tonalidade similar a amostra padrão, sendo que a concentração 3 se aproximou muito à cor desejada, mas não apresentou parâmetros de cor semelhantes.

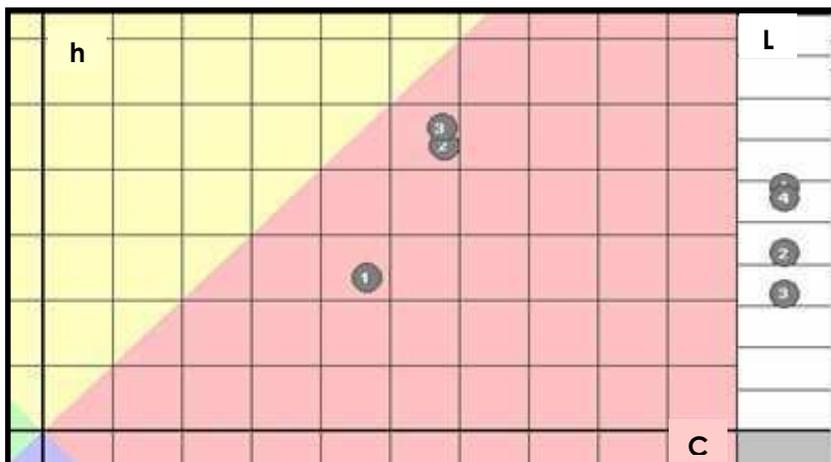


Figura 4.3 Quadrante da região do amarelo-vermelho mostrando as coordenadas $L^* C^* h$ das amostras e do padrão de bebida isotônica.

Rodriguez-Saona et al. (2001), estudaram a viabilidade do uso do extrato de rabanete vermelho em substituição do corante vermelho nº40, encontrando resultados promissores, já que o ângulo de tonalidade mostrado pelo extrato numa concentração de 0,2 mg/mL (38) se mostrou muito próximo do h do corante sintético (32) o qual esta no quadrante próximo ao vermelho-laranja. No caso das amostras de gelatina, suco instantâneo e bebida isotônica (0,2 mg/mL) se encontraram h_s de 25, 23,2 e 26,6 respectivamente, e mostraram tonalidades um pouco mais avermelhadas do que o corante sintético. Giusti e Wrolstad (2003) também avaliaram a viabilidade de extratos obtidos a partir de fontes naturais em sistemas modelo como iogurte e “sour cream” na faixa de pH de 4,2 a 4,5, demonstrando mais uma vez, que os extratos de rabanete vermelho pode prover de uma coloração similar ao corante nº40, assim como o, o extrato a partir de cenoura negra. O h do repolho roxo se mostrou um pouco mais baixo apresentando uma tonalidade um pouco mais azulada, lembrando as tonalidades de *blueberries*. Com ajuda dos dados obtidos para cada uma das amostras e suas respectivas concentrações, chegou-se na conclusão que o extrato de sabugo de milho roxo apresenta boas características tintoriais, as quais podem ser aproveitadas para aplicação como corante natural em gelatina e suco instantâneo.

4.2.2 Análise de estabilidade e vida de prateleira

As leituras obtidas (L^* , a^* e b^*) para cada uma das amostras de gelatina, suco instantâneo e bebida isotônica ao longo do tempo, foram convertidas em parâmetros L^* , C^* , h e ΔE com ajuda do programa *Universal versão 3.0*.

Os principais fatores que influenciam a estabilidade das antocianinas são a estrutura química, pH, temperatura, luz, oxigênio e enzimas (Francis, 1989). A partir disso, as amostras contendo o extrato do sabugo de milho roxo foram colocadas em diferentes condições de conservação para se observar a influência dos fatores previamente mencionados, tendo os seguintes resultados:

- Amostra “gelatina”

Na amostra onde se utilizou a concentração de 0,2 mg/mL, foi observado que não houve diferença significativa da luminosidade, da cromaticidade, nem do ângulo de tonalidade entre as amostras avaliadas durante os sete dias. Ainda assim, houve uma pequena diferença no ΔE obtido em cada dia avaliado. A amostra avaliada no segundo dia mostrou um valor maior de ΔE em relação às outras amostras, causada provavelmente pela diminuição da luminosidade, tornando a amostra mais escura e intensificando as tonalidades vermelha e amarela. Os resultados obtidos com a concentração 2 (0,3 mg/mL) foram similares, sendo que nenhum dos parâmetros observados mostrou diferença significativa entre si. As amostras avaliadas com a maior concentração (0,4 mg/mL) seguiram o mesmo comportamento, sendo que, apenas o a^* da amostra analisada no sétimo dia resultou estatisticamente diferente das amostras analisadas nos dias anteriores, contudo, a diferença não foi determinante para mostrar diferença significativa na cromaticidade ou no ângulo da tonalidade entre as amostras. Todos os valores observados e calculados estão apresentados nas Tabelas 4.4 a 4.6.

Tabela 4.4 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “gelatina” com concentração 0,2 mg/mL.

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 0	72,43 ± 0,19 ^a	27,14 ± 0,45 ^a	12,7 ± 0,03 ^a	29,96 ± 0,41 ^a	25,08 ± 0,36 ^a	0
DIA 2	70,68 ± 4,23 ^a	30,13 ± 4,86 ^a	13,41 ± 1,19 ^a	32,98 ± 4,92 ^a	23,99 ± 1,57 ^a	3,54
DIA 4	72,72 ± 0,31 ^a	27,09 ± 0,41 ^a	12,29 ± 0,08 ^a	29,75 ± 0,40 ^a	24,4 ± 0,24 ^a	0,5
DIA 7	72,39 ± 0,23 ^a	27,38 ± 0,16 ^a	12,84 ± 0,11 ^a	30,24 ± 0,19 ^a	25,12 ± 0 ^a	0,28

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tabela 4.5 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “gelatina” com concentração 0,3 mg/mL.

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 0	63,5 ± 0,95 ^a	36,42 ± 0,84 ^a	15,19 ± 0,26 ^a	39,46 ± 0,87 ^a	22,64 ± 0,13 ^a	0
DIA 2	61 ± 3,52 ^a	40,96 ± 3,64 ^a	16,48 ± 1,39 ^a	44,15 ± 3,90 ^a	21,92 ± 0,10 ^a	5,34
DIA 4	64,34 ± 0,42 ^a	36,43 ± 0,52 ^a	14,65 ± 0,06 ^a	39,27 ± 0,47 ^a	21,91 ± 0,36 ^a	1
DIA 7	64,59 ± 1,71 ^a	36,36 ± 1,65 ^a	14,91 ± 0,74 ^a	39,3 ± 1,78 ^a	22,3 ± 0,01 ^a	1,13

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tabela 4.6 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “gelatina” com concentração 0,4 mg/mL.

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 0	58,79 ± 1,53 ^a	39,73 ± 1,24 ^a	12,23 ± 0,41 ^a	41,57 ± 1,30 ^a	17,11 ± 0,12 ^a	0
DIA 2	66,45 ± 6,40 ^a	35,02 ± 7,18 ^a	14,66 ± 2,0 ^a	37,96 ± 7,38 ^a	22,72 ± 1,70 ^a	9,31
DIA 4	59,56 ± 0,90 ^a	41,52 ± 0,88 ^a	16,66 ± 0,27 ^a	44,74 ± 0,91 ^a	21,86 ± 0,19 ^a	4,84
DIA 7	58,39 ± 1,79 ^a	41,68 ± 1,04 ^a	17,06 ± 0,37 ^a	45,04 ± 1,07 ^a	22,26 ± 0,01 ^a	5,22

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

- Amostra “suco instantâneo”

Não foram observadas diferenças significativas na luminosidade, cromaticidade e/ou ângulo de tonalidade durante o armazenamento nas amostras com concentração de 0,2 mg/mL. As variações nos valores de ΔE foram mínimas ao longo dos sete dias avaliados, demonstrando a estabilidade do pigmento. O mesmo ocorreu para o suco com concentração de 0,5 mg/mL, apenas foi notado um incremento do ΔE ao final do tempo de estudo, o qual teve uma relação linear, mas de efeito fraco, não afetando a pigmentação inicial da amostra.

A amostra com concentração 0,8 mg/mL não demonstrou diferença significativa entre os valores de luminosidade nem de cromaticidade nos sete dias de avaliação. Apenas mostrou uma diferença significativa no ângulo de tonalidade do segundo dia até o sétimo dia. Contudo, os valores de ΔE se mostraram muito próximos ao padrão e foram se afastando minimamente conforme o tempo transcorreu, demonstrando uma tendência linear. Todos os valores observados e calculados para as amostras são mostrados nas Tabelas 4.7 a 4.9.

Tabela 4.7 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “suco” com concentração 0,2 mg/mL.

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 1	64,98 ± 0,48 ^a	53,18 ± 0,47 ^a	22,81 ± 0,45 ^a	57,87 ± 0,59 ^a	23,22 ± 0,26 ^a	0
DIA 2	65,05 ± 0,16 ^a	53,16 ± 0,07 ^a	22,44 ± 0,26 ^a	57,7 ± 0,16 ^a	22,89 ± 0,21 ^a	0,38
DIA 4	66,45 ± 2,27 ^a	52,05 ± 2,54 ^a	20,56 ± 2,45 ^a	55,96 ± 3,25 ^a	21,55 ± 1,43 ^a	2,92
DIA 7	65,32 ± 0,13 ^a	53,62 ± 0,31 ^a	22,49 ± 0,45 ^a	58,15 ± 0,46 ^a	22,75 ± 0,29 ^a	0,64

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tabela 4.8 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “suco” com concentração 0,5 mg/mL

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 1	48,2 ± 1,67 ^a	64,25 ± 0,20 ^a	46,61 ± 1,64 ^a	79,38 ± 1,08 ^a	35,96 ± 0,90 ^a	0
DIA 2	47,02 ± 1,58 ^a	64,03 ± 0,14 ^a	47,27 ± 1,09 ^a	79,59 ± 0,56 ^a	36,44 ± 0,68 ^a	1,37
DIA 4	46,64 ± 1,02 ^a	64,3 ± 0,08 ^a	46,98 ± 0,66 ^a	79,63 ± 0,33 ^a	36,15 ± 0,41 ^a	1,6
DIA 7	45,3 ± 1,20 ^a	63,9 ± 0,49 ^a	47,78 ± 0,47 ^a	79,79 ± 0,11 ^a	36,79 ± 0,48 ^a	3,15

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tabela 4.9 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “suco” com concentração 0,8 mg/mL

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 1	38,06 ± 0,61 ^a	63,14 ± 0,16 ^a	51,61 ± 0,21 ^a	81,55 ± 0,25 ^a	39,26 ± 0,04 ^a	0
DIA 2	37,95 ± 1,52 ^a	63,53 ± 0,25 ^a	51,09 ± 0,93 ^a	81,66 ± 0,78 ^a	39,25 ± 0,39 ^a	0,48
DIA 4	38,53 ± 0,42 ^a	63,24 ± 0,16 ^a	51,67 ± 0,15 ^a	81,52 ± 0,17 ^a	38,81 ± 0,10 ^{a,b}	0,66
DIA 7	37,35 ± 0,66 ^a	63,1 ± 0,32 ^a	50,25 ± 0,50 ^a	80,66 ± 0,56 ^a	38,53 ± 0,14 ^b	1,53

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tanto para as amostras de gelatina e suco instantâneo não se observou diferenças significativas nos parâmetros de cor avaliados, isso, pode ser devido a que, as amostras foram conservadas em temperaturas de refrigeração e pouca incidência e intensidade da luz, que são os principais agentes catalisadores da degradação das antocianinas. Embora o oxigênio também seja um agente catalisador, não pareceu ter feito efeito negativo nas amostras.

- Amostra “bebida isotônica”

A bebida isotônica com a menor concentração (0,2 mg/mL) mostrou diferenças significativas, principalmente em relação à luminosidade que aumentou consideravelmente à medida que o tempo transcorreu. A cromaticidade e o ângulo da tonalidade também variaram, resultando num aumento progressivo do ΔE . Já na amostra com concentração de 0,2 mg/mL não houve diferenças significativas nos valores de luminosidade, cromaticidade, nem no ângulo da tonalidade, demonstrando boa estabilidade sob condições de luz intensa e temperatura ambiente (27°C). Na bebida isotônica com a maior concentração dos pigmentos (0,8 mg/mL) também não houve diferenças significativas.

Contudo, a cromaticidade das amostras mostrou-se significativamente diferente devido às flutuações obtidas nos valores do parâmetro a^* , mesmo assim o ângulo de tonalidade manteve-se estável ao longo dos dezesseis dias de exposição. Os valores de L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE para essas amostras são mostrados nas Tabelas 4.10 a 4.12.

Tabela 4.10 Valores médios das leituras de L^* , a^* , b^* e os valores de C^* , h e ΔE calculados para a amostra “bebida isotônica” com concentração 0,2 mg/mL

TEMPO	L^*	a^*	b^*	C^*	H	ΔE
DIA 0	58,51 ± 0,52 ^a	46,93 ± 0,39 ^a	23,47 ± 0,42 ^a	52,47 ± 0,52 ^a	26,57 ± 0,26 ^{a,b}	0
DIA 5	60,84 ± 0,77 ^{a,b}	44,95 ± 1,26 ^{a,b}	22,9 ± 0,83 ^{a,b}	50,45 ± 1,48 ^{a,b}	27,0 ± 0,33 ^b	3,11
DIA 9	61,84 ± 0,93 ^{a,b}	44,93 ± 0,94 ^{a,b}	22,1 ± 0,77 ^{a,b,c}	50,07 ± 1,14 ^{a,b}	26,19 ± 0,48 ^{a,b}	4,12
DIA 13	63,65 ± 2,35 ^b	42,03 ± 3,05 ^{a,b}	20,45 ± 1,79 ^{b,c}	46,74 ± 3,53 ^{a,b}	25,95 ± 0,41 ^b	7,72
DIA 16	64,93 ± 2,15 ^b	40,59 ± 2,60 ^b	19,65 ± 1,19 ^c	45,1 ± 2,85 ^b	25,83 ± 0,13 ^b	9,8

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tabela 4.11 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “bebida isotônica” com concentração 0,5 mg/mL

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 0	42,69 ± 0,79 ^a	58,13 ± 0,07 ^a	43,62 ± 0,70 ^a	72,68 ± 0,47 ^a	36,88 ± 0,42 ^a	0
DIA 5	44,12 ± 1,16 ^a	58,31 ± 0,06 ^a	43,47 ± 0,71 ^a	72,73 ± 0,43 ^a	36,7 ± 0,45 ^a	1,45
DIA 9	46,22 ± 1,10 ^a	58,14 ± 0,24 ^a	41,57 ± 0,66 ^a	71,47 ± 0,56 ^a	35,56 ± 0,34 ^a	4,08
DIA 13	50,97 ± 6,55 ^a	52,65 ± 8,25 ^a	35,4 ± 8,71 ^a	63,44 ± 11,66 ^a	33,92 ± 2,74 ^a	12,89
DIA16	45,45 ± 1,15 ^a	57,93 ± 0,32 ^a	41,24 ± 1,30 ^b	71,11 ± 1,01 ^a	35,45 ± 0,71 ^a	3,65

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Tabela 4.12 Valores médios das leituras de L*, a*, b* e os valores de C*, h e ΔE calculados para a amostra “bebida isotônica” com concentração 0,8 mg/mL

TEMPO	L*	a*	b*	C*	H	ΔE
DIA 0	32,93 ± 0,91 ^a	57,77 ± 0,28 ^a	46,55 ± 0,77 ^a	74,19 ± 0,70 ^a	38,86 ± 0,33 ^a	0
DIA 5	34,10 ± 0,97 ^a	58,44 ± 0,51 ^{a,b}	47,56 ± 0,97 ^a	75,35 ± 0,99 ^{a,b}	39,14 ± 0,36 ^a	1,68
DIA 9	35,78 ± 0,96 ^a	59,0 ± 0,32 ^b	48,38 ± 0,21 ^a	76,3 ± 0,38 ^b	39,35 ± 0,04 ^a	3,6
DIA 13	35,01 ± 1,13 ^a	58,6 ± 0,30 ^{a,b}	47,97 ± 0,60 ^a	75,73 ± 0,61 ^{a,b}	39,3 ± 0,21 ^a	2,65
DIA16	35,89 ± 1,56 ^a	58,63 ± 0,42 ^{a,b}	47,05 ± 0,88 ^a	75,17 ± 0,87 ^{a,b}	38,75 ± 0,33 ^a	3,12

*Médias de três repetições com a estimativa do desvio padrão. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística com 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Kirca et al. (2006) estudaram a estabilidade do pigmento extraído de cenoura negra aplicado em vários sucos e néctares, a temperaturas de estocagem de 4-37°C, encontrando um efeito notório da temperatura sobre as antocianinas, ocorrendo rápida degradação a 37°C. Este resultado corrobora o efeito negativo da temperatura sobre a estabilidade das antocianinas nas amostras de “bebida isotônica”, as quais não se mostraram estáveis depois de 16 dias de estocagem a aproximadamente 30°C. Yang et al. (2007), estudaram a degradação das antocianinas do extrato aquoso do sabugo de milho roxo, ao ser expostos a temperaturas de 70 a 90°C, sendo observado uma cinética de primeira ordem,

enquanto que aos parâmetros de cor avaliados b^* e h incrementaram junto com o aumento da temperatura.

Vera de Rosso e Mercadante (2007) avaliaram a estabilidade dos extratos obtidos de açaí e acerola em sistemas modelo de bebida isotônica, encontrando que, a presença de açúcares e sais nas amostras contribuíram significativamente para a degradação das antocianinas nas matrizes testadas. Essa degradação foi ainda mais acentuada quando a bebida isotônica com extrato de açaí foi exposta à luz. Finalmente, chegaram a conclusão de que a estabilidade das antocianinas em sistemas como bebidas isotônicas depende da composição antociânica da matriz.

Por último, Cevallos-Casals e Cisneros-Zevallos (2004) avaliaram a estabilidade do extrato aquoso de milho roxo por um período de até 138 dias, com influência ou não de temperatura, oxigênio, luz e pH, chegando a várias conclusões, entre elas, que, os extratos em pH 3 aumentaram o ângulo de tonalidade em relação com o aumento da concentração. Portanto, pode ser atingida uma coloração semelhante ao corante vermelho 40 em solução de pH 3 apenas mudando a concentração do extrato, embora a cromaticidade possa se mostrar diferente em comparação com o padrão sintético.

Para a temperatura avaliada, os resultados mostraram que os extratos em pH entre 1 e 3 ao ser aquecidos a 98°C e mantidos nessa temperatura até por duas horas, demonstraram que o extrato de milho roxo foi muito susceptível mostrando uma rápida degradação. O mesmo grau de susceptibilidade foi encontrado quando foi exposto a luz fluorescente por até 10 dias.

A partir desses dados, concluiu-se que o extrato de milho roxo pode apresentar tonalidades muito próximas em comparação com o corante vermelho nº 40, e que a estabilidade dele é altamente dependente da exposição à luz, altas temperaturas e o pH do meio. Esta informação foi corroborada com os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados nas amostras de gelatina e suco instantâneo, os quais mostraram estabilidade a temperaturas de refrigeração e

com baixa incidência de luz. De forma contrária, as amostras de bebida isotônica se mostraram instáveis depois de ficar expostos por 16 dias a 30°C e intensa iluminação por 13 horas diárias.

A Figura 4.4 mostra as coordenadas C^* , h e L^* das amostras de gelatina e suco instantâneo ao longo de 7 dias de armazenamento, assim como as amostras de bebida isotônica nos 16 dias que foi avaliada a vida de prateleira.

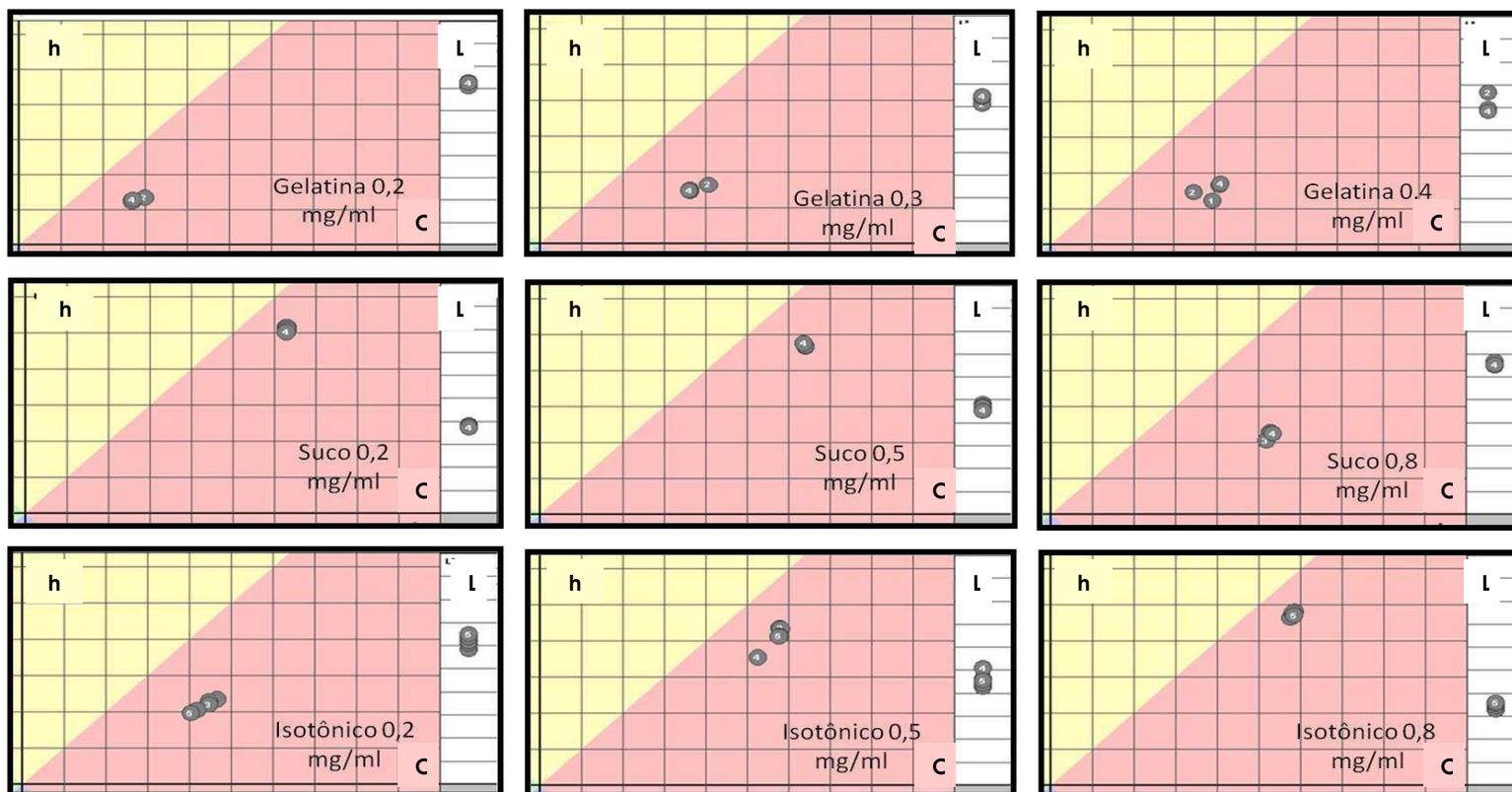


Figura 4.4 Coordenadas C^* , h e L^* das amostras de gelatina e suco instantâneo e bebida isotônica ao longo do tempo.

* (1) Dia1, (2) Dia 2, (3) Dia 4, (4) Dia 7, para as amostras “suco instantâneo” e “gelatina”.

* (1) Dia1, (2) Dia 5, (3) Dia 9, (4) Dia 13, (5) Dia 16, para a amostra “bebida isotônica”

4.3 CONCLUSÕES

O pigmento do sabugo de milho roxo se mostrou eficaz como corante natural nos três sistemas modelo avaliados.

Nenhuma das concentrações testadas na amostra “gelatina” conseguiram atingir os parâmetros de cor da amostra padrão.

Na amostra “suco instantâneo” a concentração de 0,8 mg/mL se aproximou muito dos valores da amostra padrão.

A “bebida isotônica” mostrou que nenhuma das três concentrações testadas atingiram os parâmetros da amostra padrão, embora, notou-se que uma concentração média entre as concentrações de 0,5 e 0,8 mg/mL seria suficiente para atingir valores muito mais próximos aos parâmetros de cor da amostra sintética.

No caso da estabilidade, as amostras “gelatina” e “suco instantâneo” mostraram-se como estáveis ao longo do tempo de conservação avaliado, já que, os parâmetros de cor não mostraram diferença significativa até o final das leituras.

A cor na amostra de bebida isotônica não se mostrou estável, demonstrando flutuações dependendo da concentração do pigmento aplicada

Foi demonstrado que fatores como temperaturas relativamente elevadas e iluminação intensa aceleraram os processos de degradação das antocianinas, como foi o caso da amostra “bebida isotônica”, diferente das amostras de “gelatina” e “suco instantâneo” que foram armazenadas a temperaturas de refrigeração.

4.4 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELO P.; JORGE N., Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 66 (1): 332-240, 2007.
- CEVALLOS-CASALS B.; CISNEROS-ZEVALLOS L., Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants, **Food chemistry**, v. 86, p. 69-77, 2003.
- DELGADO-VARGAS F.; PAREDES-LOPEZ O., Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC press, 2003.
- FRANCIS F., Food colorants: anthocyanins. **Critic Rev Food Sci Nut**, Vol. 28 No.4, p.273-314, 1989.
- GARZÓN G., Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. **Acta biol. Colomb**, v 13, n 3, p 27-36, 2008.
- GIUSTI M.; WROLSTAD R., Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems: Review, **Biochem Eng J**, v. 14, p. 217-225, 2003.
- JING P., **Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships**, Tese de doutorado, The Ohio State University, USA, 2006.
- KIRCA A.; OZKAN M.; CEMEROGLU B., Stability of black carrot anthocyanins in various fruits juices and nectars. **J Food Chem** , v. 97, p. 598-605, 2006.
- MATTILA – SANDHOLM, T.; SAARELA, M., *Functional Dairy Products*, Woodhead Publishing Limited, England, 2003.
- MAZZA, G.; MINIATI, E.; Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton-Florida (USA): CRC Press. 1993

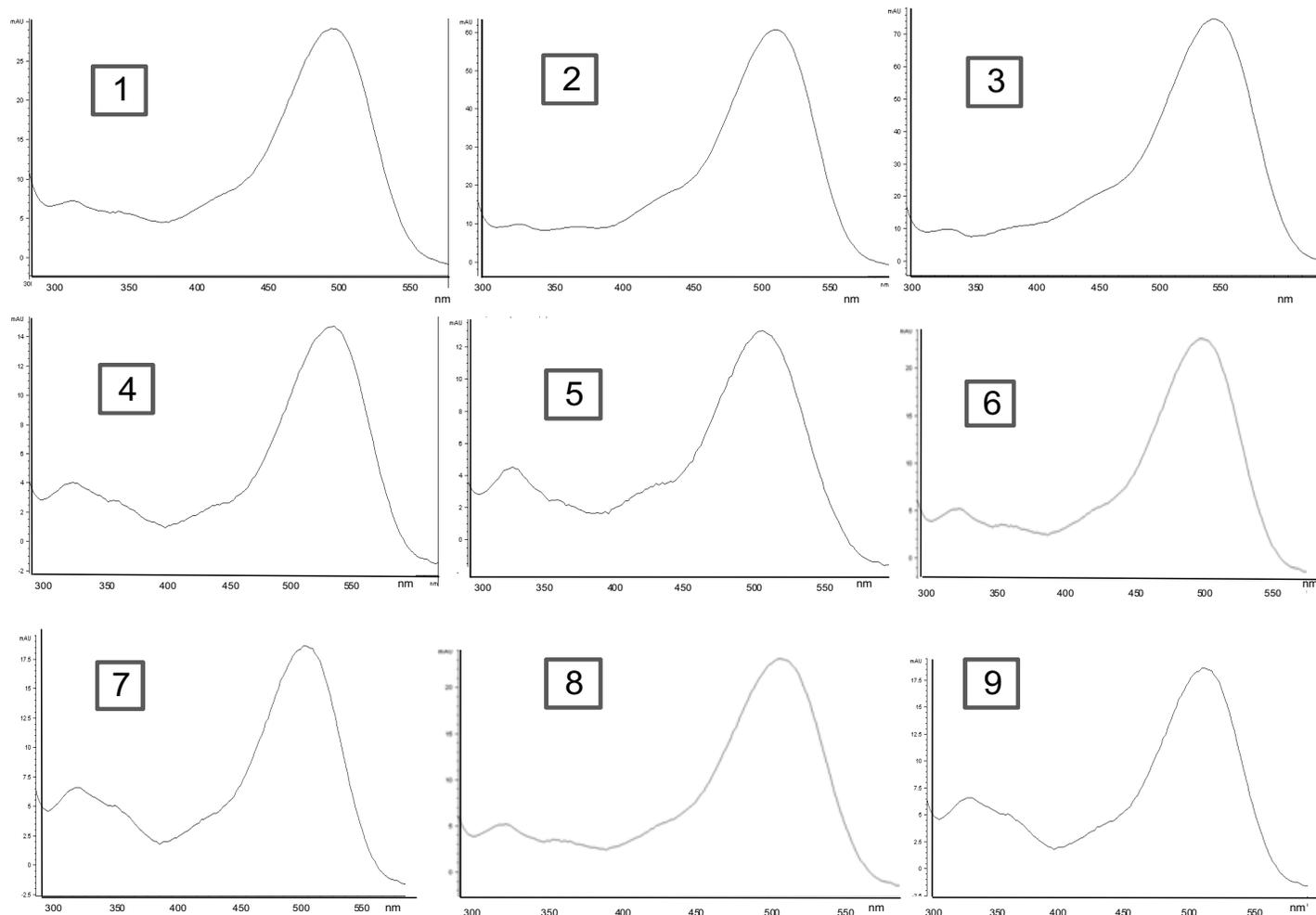
- RODRIGUEZ-SAONA L.; GIUSTI M.; DURST R.; WROLSTAD R., Development and process optimization of red radish concentrate extract as potential natural red colorant, **J Food Proces Preserv**, v. 25, p.165-182, 2000.
- SOCACIU C., Updated technologies for extracting and formulating food colorants. In Socaciu C. (ed.), *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, pp. 303-329. CRC Press, Taylor & Francis, 2008.
- VERA DE ROSSO V.; MERCADANTE A., Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system, **Innov Food Sci Emerg Tech**, v.8, p. 347-352, 2007.
- YANG Z.; FAN G.; GU Z.; HAN Y.; CHEN Z., Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays L.*) cob, **Innov Food Sci Emerg Tech**, v. 9, p. 341-347., 2007

CONCLUSOES GERAIS

Foi otimizado um método de extração do pigmento de sabugo de milho roxo com água como solvente extrator com alto teor de antocianinas e fenólicos totais, um bom índice de atividade antioxidante e alto rendimento, sendo ao mesmo tempo, uma extração de baixo custo e ecologicamente correta, por não empregar solventes caros nem poluentes.

Foi confirmada a presença de nove antocianinas na amostra otimizada, tanto glicosiladas como aciladas. Dessas nove antocianinas, oito foram mencionadas na literatura e uma delas tem sido encontrada por primeira vez nesta matriz.

O extrato do sabugo de milho roxo é uma boa alternativa como substituinte de corantes artificiais em amostras de consumo diário, como foi o caso do suco instantâneo e da gelatina, que mostraram boa estabilidade ao longo do tempo avaliado.



*Anexo 1: Espectros de absorção das possíveis antocianinas presentes no sabugo de milho roxo.
A possível identificação dos compostos aqui numerados correspondem aos listados no quadro 3.1