



## **Obtenção de corante estável a partir da associação de antocianinas de repolho roxo a proteínas de clara de ovo para aplicação em alimentos.**

Vitória de Barros Silva, Marcella Camargo Marques, Lilian Regina Barros Mariutti  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp

O repolho Roxo (*Brassica oleracea*) é uma hortaliça com alta importância econômica e nutricional, além de possuir elevado teor de antocianinas, que são pigmentos naturais hidrossolúveis com aplicabilidade como corantes em alimentos. As antocianinas são facilmente degradadas durante a manipulação e processamento. Esses pigmentos podem possuir estruturas complexas, aciladas com ácidos cinâmicos ou alifáticos que possibilitam a interação entre moléculas de antocianinas e de outros compostos, como proteínas, por ligações de hidrogênio e por interações apolares. Esse tipo de interação é chamado copigmentação intermolecular o que torna as antocianinas mais resistentes à degradação quando comparadas às antocianinas não aciladas. A natureza e a intensidade dessas interações tem efeito nas propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas, como solubilidade.

Essa pesquisa teve como objetivo geral desenvolver um corante estável de antocianinas associadas a proteínas (clara de ovo e colágeno) para ser aplicado em iogurtes. A extração seletiva de antocianinas do repolho roxo e associação destas com a proteína da clara de ovo seria feita para realizar esse objetivo geral. Antes de se iniciar a obtenção do corante, houve a necessidade de caracterização destas matérias primas (repolho roxo e clara de ovo em pó) devido a importância de descrevê-las e documentá-las. Além disso, mudanças nas propriedades físico-químicas podem afetar significativamente sua funcionalidade, afetando os resultados do corante que seria obtido.

A caracterização física do repolho roxo foi realizada através de métodos não destrutivos, como a determinação de massa ( $1104,44 \pm 201,30$  g), altura ( $13,7 \pm 0,83$  cm), perímetro ( $42,18 \pm 2,86$  cm) e de índice de formato (razão entre diâmetro medido vertical sobre o diâmetro medido horizontalmente) ( $1,07 \pm 0,09$  cm;  $0,95 \pm 0,08$  cm;  $1,02 \pm 0,08$  cm;  $1,03 \pm 0,20$  cm;  $0,96 \pm 0,11$  cm) de 5 unidades de repolho roxo compradas no comércio local de Campinas. Os repolhos foram fracionados para as análises físico-químicas como cor instrumental, teores de umidade e cinzas, atividade de água, pH, e uma parte foi reservada para a liofilização. O material liofilizado foi armazenado em embalagens a vácuo, em freezer a  $-15^{\circ}\text{C}$ , até utilização no preparo de extratos para análise de antocianinas monoméricas e do perfil de antocianinas por HPLC-DAD.

O pH do repolho roxo foi analisado utilizando pHmetro que foi calibrado seguindo as instruções do equipamento. A média encontrada (6,23) está apresentada na Tabela 1. Em pH próximo a 6, o equilíbrio entre as 4 diferentes formas coexistentes de antocianinas é deslocado favorecendo variedades de formas estruturais que conferem coloração roxa ao repolho.

A análise de cor das amostras foi feita utilizando 25 frações das camadas externas dos repolhos roxos separadas antes do fatiamento. Utilizou-se escala Hunter (CIELAB), tomando-se como base os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  em equipamento ColorQUEST II. Os valores de  $a^*$  e  $b^*$  apresentados na Tabela 1 mostram que as amostras apresentavam a cor predominantemente próxima do roxo. O valor elevado do  $L^*$  associado a uma grande variabilidade (alto valor de CV) pode indicar a presença de pontos mais claros. O uso de diferentes cultivares, diferentes graus de maturação dos repolhos, solo

do local de plantação, diferentes espécies utilizadas nas análises e ação enzimática implica na variabilidade característica desse tipo de vegetal.

A medida de atividade de água ( $A_w$ ) das amostras de repolho roxo ( $n=6$ ) foi feita em em Aqualab. O valor de  $A_w$  está apresentado na Tabela 1. O repolho roxo possui alta atividade de água ( $> 0,6$ ), o que aliado ao pH próximo a neutralidade favorece o crescimento de microrganismos, inclusive os patogênicos, o que o torna um produto muito perecível. Portanto, são necessários processos como a liofilização, que reduz a quantidade de água livre no produto, aumentando a sua vida de prateleira, e consequentemente concentrando compostos de interesse, como as antocianinas. Isto torna possível aplicações tecnológicas do repolho roxo, tais como o uso como corante natural.

Os teores de umidade e cinzas dos dois lotes de clara de ovo e de 6 amostras da fração in natura do repolho roxo foram determinados segundo os métodos da A.O.A.C (1997). A umidade do repolho roxo cru é 90,1 % (TACO, 2011), valor próximo a média encontrada na Tabela 1. O repolho roxo cru possui 0,7 g de cinzas em 100g de alimento, ou seja 0,7% (TACO, 2011), valor pouco diferente do apresentado na Tabela 2.

A determinação de proteína total das amostras dos dois lotes de clara de ovo em pó e do repolho roxo liofilizado foi realizada pelo método de Kjeldahl segundo a A.O.A.C. (1997), utilizando como fator de conversão  $N=6,25$  para ambos. O repolho roxo cru (portanto base úmida) possui teor de proteína igual a 1,9 % (TACO, 2011), valor levemente maior do que o encontrado como média na Tabela 1, porém os dois valores possuem a mesma ordem de grandeza.

**Tabela 1:** Valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , pH, e atividade de água, teores de umidade, cinzas, e proteínas (em base seca e em base úmida) do repolho roxo.

	pH <sup>a</sup>	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$A_w$	Umidade <sup>a</sup> (%)	Cinzas <sup>a</sup> (%)	Teor de proteína (dw) <sup>a</sup> (%)	Teor de proteína (dw) <sup>a</sup> (%)
Média	6,23	25,84	21,20	-9,04	0,987	90,8	0,43	14,4	1,3
Desvio Padrão	0,07	2,44	5,26	2,17	0,003	0,4	0,02	0,6	0,06
CV (%)	1,16	9,44	24,80	24,02	0,282	0,41	5,90	4,5	4,5

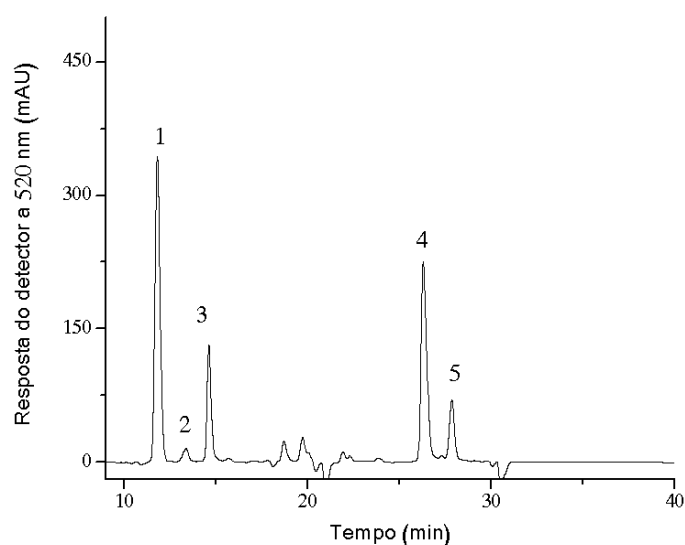
<sup>a</sup> as análises foram feitas com  $n=4$  replicatas

Extratos de repolho roxo liofilizado foram preparados em quadruplicata pelo método de extração acelerada por agitação, utilizando como solvente soluções de metanol acidificado com 1% de HCl e de água destilada acidificada com 1% de HCl.

Para a análise de antocianinas monoméricas, utilizando soluções tampão de cloreto de potássio 0,025 M pH 1 e de acetato de sódio 0,1 M pH 4,5 e pequenas quantidades do extrato de repolho roxo, o fator de diluição que tornou a absorbância a 520 nm próxima a 0,8 foi de 0,03225 (40  $\mu$ L de extrato para 1200  $\mu$ L de tampão). Para cada extrato foram preparadas 2 soluções com os 2 tampões - seguindo o fator de diluição determinado no momento da análise - que foram lidas em espectrofotômetro a 520 nm e a 700 nm e o cálculo das antocianinas em equivalente cianidina-3-glicosídeo foi feito utilizando a equação apresentada por Lee (2005). O teor de antocianinas monoméricas foi de  $313 \pm 37,2$  mg de antocianinas em equivalente de cianidina 3-glicosídeo/100 g de repolho roxo liofilizado e  $34,1 \pm 4$  mg de antocianinas em equivalente de cianidina 3-glicosídeo/100 g de repolho roxo *in natura*, superior ao teor de antocianinas monoméricas

do extrato de antocianinas de repolho roxo encontrado por Machado et al (2017), que foi de 108,46 mg de antocianinas/100 g repolho roxo liofilizado. A quantidade de antocianinas presente no repolho roxo pode variar com o cultivo e maturidade dos frutos analisados (SCHWARTZ et al, 2008)

Para determinação do perfil de antocianinas por HPLC-DAD, os compostos foram separados em coluna C<sub>18</sub> Zorbax (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA) a 29 °C, identificados e quantificados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado aos detectores de arranjo de diodos. As condições de operação como fase móvel, fluxo e gradiente foram as descritas por Faria et al. (2011). A quantificação da concentração dos compostos detectados foi feita com base em curva padrão de cianidina 3-glicosídeo. A Figura 1 apresenta o cromatograma do extrato de repolho roxo obtido por HPLC-DAD processado a 520 nm.



**Figura 1:** Cromatograma processado a 520 nm obtidos por HPLC-DAD do extrato de repolho roxo liofilizado feito pelo método de extração acelerada por agitação.

As antocianinas foram identificadas de acordo com os parâmetros de ordem de eluição em coluna C18 de fase reversa, caracterização dos espectros UV-Vis e comparação com os dados disponíveis na literatura, são elas: cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo (pico 1), cianidina 3,5-diglucosídeo (pico 2), cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo (pico 3), cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo (pico 4) e cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo (pico 5). A cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo foi a antocianina majoritária (pico 1, 42,89%), seguida da cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo (pico 4, 24,73%) e da cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo (pico 3, 14,30%). Esses dados estão em concordância com a literatura, que descrevem a cianidina 3-diglucosídeo-5-glicosídeo como a majoritária em repolho roxo (WICZKOWSKI *et al*, 2013). No entanto, no extrato de repolho roxo as antocianinas aciladas representaram 45,96% (picos 3, 4 e 5), enquanto na literatura essas antocianinas estão descritas como antocianinas em maior concentração do que as formas não aciladas (85% das antocianinas) (WU, 2006).

Foram adquiridos 2 lotes de clara de ovo em pó denominados CLA e CLB que foram caracterizados quanto aos teores de umidade, cinzas e proteínas, turbidez e solubilidade protéica. A

análise de turbidez foi realizada através da solubilização da proteína em tampão fosfato e em seguida medida da absorbância a 600 nm e 280 nm em espectrofotômetro a temperatura ambiente (25°C)

As médias dos valores de umidade encontrados na Tabela 3 se aproximam do valor de umidade para clara de ovo em pó desidratadas por atomização a 120 °C (GRASSI et al, 2016), equivalente a 4,76 %. Segundo o Padrão de Identidade e Qualidade (BRASIL, 2005), o ovo integral desidratado deve ter teor de cinzas máximo de 4%. Como a clara de ovo desidratada e o ovo integral desidratado são produtos similares, pode-se dizer que as amostras de clara de ovo em pó analisadas - Tabela 2 - estão dentro da Legislação Brasileira para teor de cinzas.

O teor médio de proteínas apresentado na Tabela 2 foi de 82,7%, valor próximo a 81% de teor proteico em claras de ovos submetidas a atomização (RAO et al, 2012). Estas variações podem ser explicadas pela diferença de umidade final entre as claras analisadas devido a utilização de processos de secagem (temperatura, tempo, pressão) diferentes.

A turbidez é causada pela presença de materiais (orgânicos ou não) coloidais em solução e serve como estimativa do grau de agregação protéica já que a agregação destas moléculas forma partículas que fazem a solução se tornar turva, pois dispersam a luz. A turbidez depende do tamanho e efeito do espalhamento dos agregados e da sua concentração (MCCLEMENTS; KEOGH, 1995).

**Tabela 2:** Teores de umidade, cinzas e proteínas e turbidez de clara de ovo desidratada.

	Umidade <sup>a</sup> (%)	Cinzas <sup>a</sup> (%)	Teor de proteína (base seca) <sup>a</sup> (%)	Turbidez a Abs 280 nm <sup>a</sup>	Turbidez a Abs 600 nm <sup>a</sup>
<b>CLA</b>	4,63 ± 0,2	3,27 ± 0,2	83,72 ± 2,09	0,497 ± 0,012	0,065 ± 0,0012
<b>CLB</b>	4,65 ± 0,1	3,15 ± 0,05	82,70 ± 0,72	0,521 ± 0,008	0,071 ± 0,004

<sup>a</sup> as análises foram feitas com n=4 replicatas

Para a análise de solubilidade de clara de ovo em pó foram preparadas dispersões de clara de ovo em pó (n=4) para cada pH (3, 5 e 7) para os dois lotes de clara. As dispersões foram agitadas por 1h sem a formação de vórtex, e o pH foi monitorado com pHmetro e corrigido com as soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M de modo que se mantivesse no valor desejado durante todo o período. Em seguida, as dispersões foram transferidas para balões de 100 mL, e o volume de cada balão foi completado com solução de NaCl 0,1 M. Uma alíquota de 5 mL de cada amostra foi tomada, e filtrada em filtro de papel qualitativo em funis de vidro acoplados aos tubos de Kjeldahl. O conteúdo protéico do sobrenadante foi determinado pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1997), utilizando como fator de conversão N = 6,25.

Em estudo feito por Pelegrine e Gasparetto (2003) a solubilidade da clara de ovo em pH que variou de 6,0 a 9,0 para temperaturas de 40 a 60 °C demonstra que a temperatura influencia na solubilidade protéica através da modificação estrutural (desnaturação) das proteínas e que as proteínas da clara de ovo se tornaram mais solúveis a 40 °C e em pH 7,5. O estudo cujo resultado se apresenta na Tabela 3 não foi realizado com aquecimento pois o objetivo deste projeto é desenvolver um corante estável de antocianinas associadas a clara de ovo para ser aplicado em iogurtes.

**Tabela 3:** Solubilidade das amostras de clara de ovo desidratadas.

pH	Solubilidade CLA A(%)	Solubilidade CLB B(%)
3	10,8 ± 0,8	10,6 ± 0,6
5	10,3 ± 0,2	10,8 ± 0,2
7	12,5 ± 0,6	10,4 ± 0,3

Devido ao cancelamento de bolsa após 6 meses do seu início, apenas a caracterização das matérias primas (repolho roxo e clara de ovo em pó) e o treinamento em todas as análises do projeto foram realizados.

### Referências Bibliográficas

- BRASIL. RDC 005 de 05 de Julho de 1991. Dispõe sobre o Padrão de Identidade e Qualidade para o Ovo Integral. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/suasa/arquivos/RES00000005.pdf>>. Acesso em 07 out 2020.
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygiumcumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126, p 1571-1578. 2011.
- GRASSI, T. L. M; MARCOS, M. T. S; CAVAZZANA, J. F; PONSANO, E. H, G. Desidratação de claras de ovos por atomização. *Ciência Animal Brasileira*, v 17, n 4, p 601 - 607. 2016. Disponível em <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/38077/21923>>. Acesso em 8 dez 2019.
- LEE, J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruits juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.
- MACHADO, M. H. Desenvolvimento e caracterização de filme indicador de pH com extrato de repolho roxo para monitoramento da qualidade de alimentos. 2017. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/183228/348599.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 13 jan 2020.
- McCLEMENTS, D. J.; KEOGH, M. K. Physical properties of cold-setting gels formed from heat-desnaturated whey protein isolate. *Journal of the Science and Food Agriculture*, London, v. 69, p. 7-14, 1995.
- PELEGRINE, D. H; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.5, n.1, p.57-65, 2003. Disponível em <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev51/Art517.pdf>>. Acesso em 14 dez 2019.
- SCHWARTZ, S. J; COOPERSTONE, J. L; CICHON, M. J; VON ELBE, J. H; GIUSTI, M. M. Colorants. IN: DAMODARAN, S; PARKIN, K. L. *Fennema's Food Chemistry*. CRC Press, 2008.
- TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos - Universidade Estadual de Campinas. 2011. Disponível em <[http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=taco\\_4\\_versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf)>. Acesso em 3 de out. 2019
- WICZKOWSKI, W; SZAWARA-NOWAK, D; TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food research international*, v. 51, n. 1, p. 303-309, 2013.
- WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., GEBHARDT, S. E., PRIOR, R.L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54. p 4069-4075. 2006.