

**CORANTES ALIMENTARES NATURAIS:  
Extração, foto e termo estabilidade.**

**Fábio Keller Machado**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora, Maria do Carmo Martins Serrano

Co-orientador: Doutora, Margarida Gomes Moldão Martins

Co-orientador: Doutora, Maria Beatriz Rafael Silva e Sousa

**Júri:**

Presidente: Doutora, Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora, Maria do Carmo Martins Serrano, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

Doutora, Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

*“The soul becomes dyed with the colour of it’s thoughts.”*

- Marcus Aurelius

## Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer, primeiramente, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e ao Instituto Superior de Agronomia pela oportunidade que me deram na realização deste trabalho e estudo. De seguida gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram e me ajudaram na realização deste trabalho, em especial à minha orientadora Maria do Carmo Martins Serrano, pelo constante apoio, por todas as dúvidas que me tirou e pela orientação, que eu sei que em certas alturas foi mais complicada do que noutras. Sem si não teria conseguido realizar este trabalho.

Gostaria de agradecer também às minhas co-orientadoras Professora Margarida Gomes Moldão Martins e Maria Beatriz Rafael Silva e Sousa pelas dúvidas pontuais que também me tiraram e pela boa disposição com que encaravam todo este trabalho.

Um obrigado ainda a todas as pessoas no INIAV pela simpatia e por terem me feito sentir tão à-vontade, em especial à Fernanda e à Bruna pela ajuda durante todos os ensaios e pela boa disposição durante as partes mais chatas.

Quero ainda agradecer à minha família, pois sem os seus sacrifícios eu não poderia ter concluído esta etapa da minha vida. A vossa sabedoria, os vossos conselhos fizeram-me a pessoa que sou hoje, e por isso estou vos eternamente grato.

Por fim, um último e grande obrigado a todos os meus amigos que ao longo destes últimos 5 anos me acompanharam nesta minha aventura. Todos os momentos que passamos juntos serão sempre lembrados com um grande carinho. Cláudia, Inês, Tânia, entre muitos outros colegas, começamos juntos e será assim que acabaremos. E claro, a minha companheira de todos os dias, Sara, muito obrigado por todos os momentos, bons ou maus, que passamos. Tu desafiaste-me em muitos sentidos, tornando-me numa melhor pessoa.

Muito Obrigado a todos!

## Resumo

Este estudo insere-se no âmbito da procura de corantes naturais a partir de matéria vegetal. Foram utilizadas duas plantas corantes, a *Calendula officinalis* e a *Centaurea cyanus*. Foram testados diferentes solventes de extração (etanol, metanol e misturas entre outros solventes). No caso da centáurea foram ainda testados diferentes valores de pH (1, 4, 6, 8, 10). Foi avaliada a cor e características bioativas (teor de carotenóides e antocianinas totais, capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais) de ambos os extratos. Foi ainda estudada a foto e termo estabilidade dos extratos ótimos, para uma melhor perceção da sua resistência.

Através dos resultados obtidos foi possível determinar o melhor método de extração, e perceber em que tipo de alimentos os corantes poderiam ser utilizados.

Para a calêndula o metanol foi o melhor solvente de extração e, posteriormente, verificou-se que o extrato obtido demonstrava uma boa capacidade de resistência, tanto por degradações térmicas, como por degradações causadas pela luz.

Para a centáurea verificou-se que o melhor solvente de extração é uma mistura entre etanol e água acidificada com HCl (60:40), a um pH de 1. Ao contrário da calêndula, este extrato já não demonstrou uma resistência tão elevada às condições externas.

**Palavras-chave:** corantes naturais, *Calendula officinalis*, *Centaurea cyanus*, foto estabilidade, termo estabilidade

## Abstract

This study's main goal was to search for natural dyes of a plant origin. Two different plants, *Calendula officinalis* and *Centaurea cyanus*, were studied. Several extraction solvents (such as ethanol, methanol and other solvent mixtures) were tested, and for the centaurea flowers, different pH levels were also tested (1, 4, 6, 8 and 10). The bioactivity of the extracts was analysed in terms of colour, anthocyanin and carotene content, antioxidant activity and total phenolic compounds. Tests to the photo and thermal stability of the extracts were performed to understand their resistance to variations of temperature and light conditions.

From the obtained results it was possible to determine the best extraction process and understand in which food types these extracts could be better used in.

For the calendula dyes, methanol was the best extraction solvent, and it was concluded that the extracts have a high resistance to both thermal and photo degradation.

In case of the centaurea dyes, it was verified that the best extraction solvent was a mixture of ethanol and water acidified with HCl (60:40), with a pH level of 1. Contrary to the calendula extracts, these didn't show a promising resistance level to the external conditions studied.

**Keywords:** natural dyes, *Calendula officinalis*, *Centaureacyanus*, photo degradation, thermal degradation

## Extended abstract

Since time immemorial, colour has affected our lives and society, influencing our mood, the clothes we wear, our house decoration and sometimes our food perception. The first used dyes had their origin in natural materials, such as different plant parts and minerals, being therefore known as natural dyes. Following the industrial revolution, the first synthetic colour appeared, beginning a new era in the food and dye industry.

The need for more information by part of the consumers has changed the food industry in many ways. The use of food additives has a much bigger control than a few decades ago. Therefore, in the past few years a new change has been noticed in the dye market, leading us back to the beginning of the colouring world – the natural dyes.

To answer this demand of a more natural and healthier world without synthetic materials, this study focused on the extraction of dyes from two different plants – *Calendula officinalis* and *Centaurea cyanus*.

*Calendula officinalis*, also known as marigold, has a colour range that can go from yellow to a bright orange. This is due to the presence of carotenes in the flowers composition.

The cornflower, or *Centaures cyanus*, is a flower that has a colour pallet from white to blue, and many purple tones in between. These colours are a result of the presence anthocyanins.

The first part of this study was based on the optimization of the extraction process, where different methods were used, and their extraction rates calculated. Regarding the marigold, different extraction solvents were used, such as ethanol, methanol, acetone, and mixtures from other solvents. Similarly, the cornflower extractions were also performed with different solvents, and a variety of pH levels, ranging from 1 to 10 (1, 4, 6, 8 and 10).

Throughout this study many aspects were analysed, such as the colour of the extracts through the CIE (L a\* b\*), the bioactive compounds like the antioxidant capacity using the FRAP and DPPH methods, the fenolic compounds content by means of the Folin-Ciocalteu test, the carotene content for the marigold extracts and the anthocyanin content for the cornflower extracts.

Since the obtained extracts were meant for the food industry, a more extended study was made. The second part consisted in the evaluation of the photo and thermal stability of the

extracts, enabling a perception of the required conditions for the extractions, and in what kind of foods they can be used in.

To study the photo stability, various samples were put in two different conditions: half with the presence of light and the other half in the dark. The samples of the marigold extracts showed very promising results, while the cornflower extractions not so much.

During the thermal stability study, different samples were subjected to temperatures of 4, 20, 40, 60, 80 and 100 °C. While at 4 °C the study had a time span of 30 days for the cornflower samples, for the marigold samples the duration was prolonged to 55 days, indicating a bigger stability. For the other temperatures the time span was of 1 hour. Also here the best results were obtained with the marigold extracts, in comparison with the cornflower ones.

Overall, it was concluded that dyes extracted from the marigold plant are very promising for the natural dyes market, whereas the cornflower extractions showed a higher degradation rate, highlighting the necessity of a more thorough study.

## Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Extended abstract.....	vi
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xiv
I. Introdução e Objetivos.....	1
II. Enquadramento Teórico.....	2
1. Aditivos alimentares.....	2
2. Corantes.....	4
3. Calêndula.....	7
Carotenóides.....	8
4. Centáurea.....	12
Antocianinas.....	13
III. Desenvolvimento Experimental.....	16
1. Materiais.....	16
2. Métodos.....	18
2.1 Preparação da amostra.....	18
2.2 Extração da fração corante.....	19
2.3 Métodos analíticos.....	27
2.4 Estudo da estabilidade dos corantes.....	32
2.4.1 Foto estabilidade.....	32
2.4.2 Estabilidade térmica.....	33
IV. Resultados e discussão.....	35
Preparação da amostra.....	35
Otimização do processo de extração.....	36
Calêndula.....	36
Centáurea.....	41
Estudo da foto estabilidade.....	45
Calêndula.....	46

Centáurea .....	50
Estudo da termo estabilidade .....	53
A temperatura de refrigeração.....	54
A temperatura médio/altas .....	61
V. Conclusão .....	70
VI. Bibliografia .....	73
Anexos.....	75

## Lista de Tabelas

Tabela 1.- Presença de carotenóides em pétalas de calêndula de cor laranja ou amarela. ....	11
Tabela 2.- Lista de solventes de extração para a obtenção de corantes para a <i>Centaurea cyannus</i> .....	25
Tabela 3.- Parâmetros $a^*$ e $b^*$ da cor de diferentes extratos de calêndula: Cal.1- Metanol a frio; Cal.2- Acetona; Cal.3- Éter etílico; Cal.4- Metanol a quente; Cal.5- Etanol/Água (60:40) .....	38
Tabela 4.- Parâmetros $a^*$ e $b^*$ da cor de diferentes extratos de centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5- Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH).....	43
Tabela 5.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da calêndula, na ausência de uma fonte luminosa.....	47
Tabela 6.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da calêndula, na presença de uma fonte luminosa.....	47
Tabela 7.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da centáurea a um pH 1, na ausência de uma fonte luminosa .....	51
Tabela 8.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da centáurea a um pH 1, na presença de uma fonte luminosa.....	51
Tabela 9.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da calêndula, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C) .....	55
Tabela 10.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da centáurea a um pH=3, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C).....	59
Tabela 11.- Parâmetros L $a^*$ $b^*$ da cor das amostras da centáurea a um pH=1, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C).....	59
Tabela 12.- Parâmetros colorimétricos (L, $a^*$ , $b^*$ ) e teor de carotenóides totais.....	77
Tabela 13.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais.....	77
Tabela 14.- Parâmetros colorimétricos (L, $a^*$ , $b^*$ ) e teor de antocianinas totais .....	78
Tabela 15.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais.....	78

Tabela 16.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais, nos extratos que estiveram sob o efeito da luz.....	80
Tabela 17.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos que estiveram sob o efeito da luz .....	80
Tabela 18.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais, nos extratos que estiveram ao abrigo da luz.....	80
Tabela 19.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos que estiveram ao abrigo da luz .....	80
Tabela 20.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais.....	81
Tabela 21.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais.....	81
Tabela 22.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 20 °C.....	82
Tabela 23.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 20 °C.....	82
Tabela 24.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 40 °C.....	82
Tabela 25.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 40 °C.....	82
Tabela 26.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 60 °C.....	83
Tabela 27.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 60 °C.....	83
Tabela 28.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 80 °C.....	83
Tabela 29.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 80 °C.....	83
Tabela 30.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram sob o efeito da luz .....	85
Tabela 31.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram sob o efeito da luz.....	85
Tabela 32.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram ao abrigo da luz .....	85
Tabela 33.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram ao abrigo da luz.....	85
Tabela 34.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 1 .....	86

Tabela 35.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 1 .....	86
Tabela 36.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 3.....	86
Tabela 37.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 3 .....	86
Tabela 38.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 20 °C.....	87
Tabela 39.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 20 °C.....	87
Tabela 40.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 40 °C.....	87
Tabela 41.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 40 °C.....	87
Tabela 42.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 60 °C.....	88
Tabela 43.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 60 °C.....	88
Tabela 44.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 80 °C.....	88
Tabela 45.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 80 °C.....	88
Tabela 46.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 100 °C .....	89
Tabela 47.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 100 °C.....	89
Tabela 48.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 20 °C.....	89
Tabela 49.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 20 °C.....	89
Tabela 50.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 40 °C.....	90
Tabela 51.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 40 °C.....	90
Tabela 52.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 60 °C.....	90

Tabela 53.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 60 °C.....	90
Tabela 54.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 80 °C.....	91
Tabela 55.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 80 °C.....	91
Tabela 56.- Parâmetros colorimétricos (L, a*, b*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 100 °C .....	91
Tabela 57.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 100 °C.....	91

## Lista de Figuras

Figura 1.- Estrutura química dos principais carotenóides em géneros alimentícios.....	9
Figura 2.- Estrutura geral das antocianinas (Catião Flavílio) e das suas antocianidinas .....	13
Figura 3.- Unidades glicosídicas que se podem encontrar nas antocianinas.....	14
Figura 4.- Transformações estruturais de antocianinas através de mudanças de pH..	15
Figura 5.- Morfologia das flores secas, utilizadas para preparação do material vegetal, calêndula (esquerda) e centáurea (direita) .....	18
Figura 6.- Pétalas antes (cima) e depois (baixo) da moagem, da centáurea (esquerda) e calêndula (direita).....	19
Figura 7.- Diagrama de extração, utilizando metanol a frio ( 4 °C) .....	20
Figura 8.- Diagrama de extração, utilizando metanol como solvente de extração, a quente (65 °C).....	21
Figura 9.- Diagrama de extração utilizando como solução uma mistura entre acetona, etanol e hexano .....	22
Figura 10.- Diagrama de extração através de separação de fases.....	23
Figura 11.- Diagrama de extração a quente (65 °C), utilizando uma solução de etanol:água (60:40) como solvente de extração .....	24
Figura 12.- Diagrama de extração, após estudo da temperatura, da centáurea.....	26
Figura 13.- Rendimentos da morfologia de ambas as plantas.....	35
Figura 14.- Rendimento da moagem das pétalas de ambas as plantas <i>Calendula officinalis</i> e <i>Centaurea cyanus</i> .....	36
Figura 15.- Rendimento das diferentes extrações realizadas tendo como matéria vegetal a calêndula .....	37
Figura 16.- Teor de carotenóides totais de extractos de <i>Calendula</i> .....	38
Figura 17.- Exposição gráfica dos parâmetros $a^*$ e $b^*$ da cor de diferentes extratos de calêndula: Cal.1- Metanol a frio; Cal.2- Acetona; Cal.3- Éter etílico; Cal.4- Metanol a quente; Cal.5- Etanol/Água (60:40) .....	39
Figura 18.- Capacidade antioxidante das diferentes extrações, tendo como matéria prima pétalas de <i>Calendula officinalis</i> .....	40
Figura 19.- Teor de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos de calêndula..	41
Figura 20.- Rendimentos médios das diferentes extrações da centáurea .....	41
Figura 21.- Teor de antocianinas totais nas diferentes extrações da centáurea.....	42

Figura 22.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* da cor de diferentes extratos de centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH) .....	43
Figura 23.- Capacidade antioxidante dos diferentes extratos da centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5- Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH).....	44
Figura 24.- Teor de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos da centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH).....	45
Figura 25.- Evolução do teor de carotenóides de extratos de calêndula na presença e ausência de luz, ao longo do tempo.....	46
Figura 26.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* das amostras da calêndula, durante o ensaio da foto estabilidade, com presença de luz (esquerda) e na sua ausência (direita) .....	47
Figura 27.- Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz, pelo método FRAP .....	48
Figura 28.- Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz, pelo método DPPH.....	49
Figura 29.- Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (55 dias) nos extratos de calêndula, na presença e ausência de luz .....	49
Figura 30.- Variação do teor de antocianinas totais da extração a pH 1, na presença e ausência de uma fonte luminosa, ao longo do tempo (30 dias) .....	50
Figura 31.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* das amostras da extração a pH 1 da centáurea, durante o ensaio da foto estabilidade.....	51
Figura 32.- Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centaurea na presença e ausência da luz, pelo método do FRAP .....	52
Figura 33.- Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centaurea na presença e ausência da luz, pelo método do DPPH.....	52
Figura 34.- Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centaurea na presença e ausência da luz.....	53

Figura 35.- Evolução do teor de carotenóides de extratos de calêndula na presença e ausência de luz e em câmara frigorífica, ao longo do tempo.....	54
Figura 36.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* das amostras da calêndula, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C) .....	55
Figura 37.- Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz e no frio (4 °C), pelo método FRAP .....	56
Figura 38.- Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz e no frio (4 °C), pelo método DPPH.....	56
Figura 39.- Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (55 dias) nos extratos de calêndula, na presença e ausência de luz e no frio (4 °C) .....	57
Figura 40.- Evolução do teor de antocianinas totais de extratos de centáurea a um pH=1, na presença e ausência de luz, e em câmara frigorífica (4 °C) de extratos a um pH=1 e pH=3, ao longo do tempo.....	58
Figura 41.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* das amostras da centáurea a um pH=1 (esquerda) e a um pH=3 (direita), durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C) .....	59
Figura 42.- Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centaurea na presença e ausência da luz e no frio (4 °C), pelo método do FRAP (esquerda) e DPPH (direita).....	60
Figura 43.- Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 3 da centaurea no frio (4 °C), pelo método do FRAP (esquerda) e DPPH (direita)	60
Figura 44.- Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (30 dias) das amostras da extração a um pH=1 da centáurea, na presença e ausência da luz e no frio (4 °C) .....	61
Figura 45.- Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (30 dias) das amostras da extração a um pH=3 da centáurea, no frio (4 °C).....	61
Figura 46.- Evolução do teor de carotenóides de extratos de calêndula, quando aplicadas diferentes temperaturas (20, 40, 60, e 80 °C), ao longo de 60 minutos .....	62
Figura 47.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* das amostras da calêndula, durante o ensaio da termo estabilidade, quando aplicadas diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C) .....	63
Figura 48.- Capacidade antioxidante inicial e final (60 minutos) de extratos de calêndula, após tratamento térmico a diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C), pelo método FRAP.....	63
Figura 49.- Capacidade antioxidante inicial e final (60 minutos) de extratos de calêndula, após tratamento térmico a diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C), pelo método DPPH.....	64

Figura 50.- Teor de compostos fenólicos de extratos de calêndula em função de tratamento térmico a diferentes temperaturas .....	64
Figura 51.- Evolução do teor de antocianinas totais das amostras da centáurea a um pH 1, ao longo do tempo (60 minutos), quando aplicadas temperaturas diferentes (20, 40, 60, 80 e 100 °C) .....	65
Figura 52.- Evolução do teor de antocianinas totais das amostras da centáurea a um pH 3, ao longo do tempo (60 minutos), quando aplicadas temperaturas diferentes (20, 40, 60, 80 e 100 °C) .....	66
Figura 53.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* da cor das amostras em que foi utilizado um solvente de extração a pH 1, ao longo do tempo (60 minutos) a diferentes temperaturas .....	66
Figura 54.- Exposição gráfica dos parâmetros a* e b* da cor das amostras em que foi utilizado um solvente de extração a pH 3, ao longo do tempo (60 minutos) a diferentes temperaturas .....	67
Figura 55.- Capacidade antioxidante inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método FRAP (esquerda) e DPPH (direita), nas amostras da centáurea a um pH 1 .....	68
Figura 56.- Capacidade antioxidante inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método FRAP (esquerda) e DPPH (direita), nas amostras da centáurea a um pH 3 .....	68
Figura 57.- Teor de compostos fenólicos totais inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método de Folin-Ciocalteu, nas amostras da centáurea a um pH 1 .....	69
Figura 58.- Teor de compostos fenólicos totais inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método de Folin-Ciocalteu, nas amostras da centáurea a um pH 3 .....	69
Figura 59.- Evolução espectral durante o ensaio da foto estabilidade, quando presente uma fonte luminosa .....	93
Figura 60.- Evolução espectral durante o ensaio da foto estabilidade, quando as amostras estiveram ao abrigo da luz .....	93
Figura 61.- Evolução espectral durante o ensaio da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas baixas (4 °C) .....	93
Figura 62.- Evolução espectral durante o estudo da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas médio/altas (20, 40, 60 e 80 °C) .....	94
Figura 63.- Evolução espectral durante o ensaio da foto estabilidade, quando presente uma fonte luminosa .....	95

Figura 64.- Evolução espectral durante o ensaio da foto estabilidade, quando as amostras estiveram ao abrigo da luz .....	95
Figura 65.- Evolução espectral durante o ensaio da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas baixas (4 °C) .....	95
Figura 66.- Evolução espectral durante o estudo da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas médio/altas (20, 40, 60, 80 e 100 °C) .....	96
Figura 67.- Evolução espectral durante o ensaio da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas baixas (4 °C) .....	97
Figura 68.- Evolução espectral durante o estudo da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas médio/altas (20, 40, 60, 80 e 100 °C) .....	98

## I. Introdução e Objetivos

O ser humano obtém a informação do mundo que o envolve através dos sentidos. Cerca de 87% é captado pela visão, 9% pela audição e os restantes 4% por via do olfacto, paladar e tacto.

Das várias informações que nos são proporcionadas pela visão, tais como a forma dos objectos, a sua textura, brilho, entre outros, a cor é muito importante.

Na alimentação, a cor tem uma forte influência em vários aspectos, como a aceitação de um alimento ou a associação a certos sabores, sendo por isso necessário recorrer-se aos corantes de forma a tornar um certo alimento mais atractivo. Na indústria alimentar, os corantes são catalogados como aditivos alimentares e são designados como preparações obtidas a partir de géneros alimentícios ou de materiais de base natural obtidos por extração física e/ou química, que provoque a extração seletiva dos pigmentos correspondentes aos componentes nutritivos ou aromáticos. Quanto à sua origem, os corantes podem ser sintéticos ou naturais. Das várias origens naturais, as plantas são as mais comuns, visto que estas têm uma maior variedade de cores no seu estado natural.

Este trabalho foi realizado com o objectivo, numa primeira fase, em extrair corantes alimentares através de duas plantas: a *Calendula officinalis* e a *Centaurea cyanus*, verificando qual o método de extração com maior rendimento. Numa segunda fase, foi estudada a estabilidade dos corantes, em termos de foto estabilidade e termo estabilidade, através de ensaios em que foram submetidas diferentes condições, como a presença/ausência de luz, e diferentes temperaturas.

## **II. Enquadramento Teórico**

### **1. Aditivos alimentares**

Na Era Paleolítica o Homem comia o que caçava ou o que recolhia diretamente da Natureza, sem necessidade de conservar os alimentos. Estas fontes alimentares, perfeitamente suficientes para cobrir as necessidades da população de então, deixaram de o ser quando a densidade populacional aumentou. Foi necessário recorrer ao cultivo de plantas, à criação de animais e à transformação/conservação destas matérias-primas que levou à utilização de aditivos, numa primeira fase de origem natural e posteriormente de síntese.

Na segunda metade do século XX houve profundas alterações nos hábitos alimentares da população. Tais modificações foram muito mais marcantes nos países industrializados onde era possível obter uma enorme gama de géneros alimentícios processados (Dias, 1989). A disponibilidade permanente de determinados alimentos sazonais, a produção e distribuição massiva de alimentos, desde os simples vegetais até aos mais complicados pratos pré-cozinhados, necessitam de responder a padrões de qualidade elevados a preços compatíveis. Tudo isto só é possível graças à utilização de aditivos alimentares.

O uso de aditivos nos alimentos não pode ser encarado com posições de rejeição ou aceitação. Muitos deles têm efeitos verdadeiramente indesejáveis, em doses elevadas e, se bem que as doses empregues nos alimentos estejam muito longe das doses perigosas, vem-nos sempre o receio de que venham a ter efeito cumulativo (Oliveira e Guimarães, 1991). Todavia, os aditivos têm virtudes inegáveis: muitos preservam os alimentos, aumentando o chamado tempo de vida útil destes, permitindo assim diminuir o seu custo; o emprego criterioso de aditivos que melhorem o aspeto físico dos alimentos pode ainda transformar um produto dificilmente aceitável para consumo humano num alimento agradável, saudável e eventualmente barato.

Segundo a norma portuguesa, um aditivo alimentar é “toda a substância, que tenha ou não valor nutritivo, que por si só não é normalmente género alimentício, nem ingrediente característico de um género alimentício, mas cuja adição intencional, com finalidade tecnológica ou organoléptica, em qualquer fase de obtenção, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenagem de um género alimentício, tem como consequência quer a sua incorporação nele ou a presença de um derivado, quer a modificação de características desse género”.

A definição pode variar ligeiramente de país em país, pois cabe ao sistema regulador de cada um esse encargo, como também a avaliação e aprovação científica dos diferentes aditivos, ingredientes e substâncias de contato alimentares (Magnuson *et al*, 2013). No entanto, têm ocorrido cada vez mais mudanças e trabalho para uma harmonização entre países. A União Europeia adotou recentemente novos regulamentos, que estabelecem um procedimento de autorização comum para aditivos alimentares e, pela primeira vez, enzimas alimentares e agentes de *flavour*. Anteriormente à implementação destes regulamentos, as enzimas alimentares e os agentes de *flavour* eram regulados a um nível nacional por cada estado membro. O sistema regulador da U.E é a Comissão Europeia, e a definição de aditivo alimentar anteriormente descrita é a definição europeamente aceite, através do regulamento no. 1333/2008.

Os aditivos alimentares são muitas vezes agrupados nos seguintes tipos característicos: aditivos utilizados com finalidade nutricional (não considerados pela CEE (Comunidade Económica Europeia) nem a nível nacional); aditivos com ação conservante destinados a manter a “frescura” dos géneros alimentícios; “aditivos sensoriais” que modificam ou realçam as características organolépticas; e os aditivos que facilitam certas operações industriais de processamento e fabrico (Dias, 1989). Estes quatro grandes grupos parecem traduzir uma lógica evidente quanto às funções principais dos aditivos alimentares. Contudo, partindo dos casos gerais para os particulares, este tipo de classificação complica-se, não permitindo designações inequívocas que facilitem um relacionamento evidente entre o aditivo ou aditivos e os efeitos desejáveis.

Há uma metodologia que aponta para uma regulamentação global através das NP-1735 – Aditivos Alimentares. Definição, Classificação e Princípios de Aplicação, e NP-1736 – Géneros Alimentícios e Aditivos Admissíveis – cujo conteúdo deverá ser tornado obrigatório. A NP-1735 considera 20 categorias de aditivos alimentares, nas quais temos vários agentes, aromatizantes, conservantes, corantes, espessantes/gelificantes, entre outros.

Para uma melhor organização e de maneira a facilitar a rotulagem dos géneros alimentícios, a CEE, como complemento de classificação funcional estabeleceu um código. Quando o código tem carácter definitivo, a componente numérica é precedida pela letra **E**. Códigos provisórios envolvem unicamente um número, sem o prefixo **E**. O primeiro dígito do número identifica a classe funcional. A título de exemplo, os números de códigos **E100** a **E199** ficaram reservados para os corantes alimentares, **E200** a **E299** para substâncias com ação conservante,

**E300 a E399** para antioxidantes e sinérgicos e **E400 a E499** para emulsionantes, espessantes/gelificantes e outros estabilizadores do equilíbrio físico.

## 2. Corantes

Até ao séc. XVIII, os reinos vegetal e animal eram os únicos recursos de materiais corantes para tingir os têxteis. A utilização de animais raros e de plantas, quer criados e cultivadas, ou existentes no mundo silvestre, teve uma enorme importância sócio-económica para muitas comunidades espalhadas pelo mundo, pelas intensas trocas comerciais que geraram. No entanto, poucos corantes naturais foram referidos para aplicação em produtos alimentares.

A utilização de aditivos corantes nos alimentos é relatado desde o século XV, no Antigo Egipto, onde surgem os primeiros documentos referentes à utilização de extratos naturais e vinhos para melhorar a aparência de doces (Meggos, 1995). Até aos meados do século XIX é referido a utilização do açafrão para melhorar o aspeto decorativo de certos produtos alimentares.

No século XIX, após a revolução industrial houve um enorme desenvolvimento em várias áreas de produção. Na indústria alimentar em geral, mas principalmente nos alimentos processados, ocorreu um desenvolvimento intensivo (Downham e Collins, 2000). Com o descobrimento da mauveína, por Sir William Perking em 1856 e com o desenvolvimento da síntese química, surgem novos corantes sintéticos, mais eficazes que os naturais. Na indústria alimentar, com a descoberta de novas cores proporcionadas pelos corantes sintéticos dá-se início, na Europa e nos E.U.A., à adição descontrolada em vários produtos alimentares, como molhos, geleias e vinhos. Nesta altura, havia disponíveis mais de 80 corantes sintéticos, os quais muitas vezes eram tóxicos e destinados para a indústria textil, levando a vários casos graves de saúde e até mortes (Naidu e Sowbhagya, 2012).

Esta toxicidade não era conhecida, devido à falta de informação disponível e de maneiras de a analisar. Isto, aliado ao facto de que os corantes naturais sofrerem de diversos problemas de estabilidade quanto ao calor, luz, pH e agentes oxidativos, estimulou a popularidade dos corantes sintéticos. Estes são um produto mais barato, com um método de produção mais fácil e com propriedades de cor superiores. São corantes com uma maior facilidade de mistura, sem transmitir sabores aos alimentos. No entanto, com o aumento da sua utilização na indústria

alimentar, levantaram-se questões quanto à sua segurança, originando várias regulamentações. Na América, a lista de corantes sintéticos reduziu-se de 700 para 7 corantes admitidos (Naidu e Sowbhagya, 2012 & Downham e Collins, 2000)

Na Europa foi criada a 30 de Junho de 1994 a Diretiva Comunitária nº 94/36/CE, em que foram estabelecidos os princípios orientadores na aplicação de corantes em géneros alimentícios e onde são apresentados os corantes permitidos, os géneros alimentícios que não podem conter corantes, os géneros alimentícios que podem conter certos corantes, as aplicações restritas a determinados corantes, os corantes permitidos *quantum senis* e os corantes com níveis de inclusão máximos.

Posteriormente foram criadas novas diretivas comunitárias, nas quais foram estabelecidos os critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios (Diretiva Comunitária nº 95/45/CE), com as devidas alterações realizadas em relação aos critérios de pureza para os carotenos mistos e beta-caroteno (Diretivas Comunitárias nº99/75/CE e nº 2001/50/CE).

Segundo a norma portuguesa e europeia, um «corante» é defenido como: “(...) uma substância que confere ou restitui cor a um género alimentício e é constituída por componentes naturais de géneros alimentícios ou outras substâncias naturais que não são normalmente consumidas como alimentos nem como ingredientes característicos de alimentos. (...) São considerados corantes as preparações obtidas a partir de géneros alimentícios ou de materiais de base naturais obtidos por extração física e/ou química, que provoquem a extração seletiva dos pigmentos correspondentes aos componentes nutritivos ou aromáticos.”.

Presentemente os corantes alimentares são divididos em 4 categorias: corantes inorgânicos ou pigmentos, corantes sintéticos idênticos ao natural, corantes sintéticos e corantes naturais (Naidu e Sowbhagya, 2012).

Os corantes inorgânicos são obtidos através de substâncias minerais e submetidos a processos de elaboração e purificação adequados à sua utilização em alimentos. No entanto, este tipo de corantes não é frequentemente utilizado, sendo os restantes tipos os mais preferidos para a indústria alimentar (Netto, 2009).

Um corante sintético idêntico ao natural é um corante cuja estrutura química é semelhante à do princípio isolado do corante orgânico natural, sendo no entanto produzido pelo Homem. Os pigmentos mais comuns que são sintetizados são carotenóides constituídos por hidrocarbonetos conjugados. Estes no entanto estão

sujeitos a perdas oxidativas devidas à descoloração, tendo sido necessário desenvolver formulações com sistemas antioxidantes, de maneira a prevenir estas perdas (Downham e Collins, 2000 & Netto, 2009).

Um corante sintético é aquele obtido por síntese orgânica mediante a utilização de processos tecnológicos adequados e não encontrado em produtos naturais. Na UE são permitidos 17 corantes sintéticos, em comparação com os 7 permitidos nos EUA. Todos estes corantes são hidrosolúveis e originalmente produzidos sob a forma de pós de baixa granulometria e ativos em doses pequenas, o que acarretava vários problemas de aglomeração e doseamento durante a utilização dos mesmos. Para obviar o referido problema estes corantes são comercializados impregnados em géis ou outras substâncias (Downham e Collins, 2000).

Um corante pode ser classificado de acordo com as seguintes categorias: a cor, a origem e a estrutura química. Têm sido utilizadas diversas substâncias orgânicas, quer de origem vegetal quer animal, como corantes naturais para fins alimentares.

Os corantes utilizados para fins alimentares podem ser classificados segundo a estrutura química, ou seja, a classe funcional da molécula corante ou a estrutura cromófora, por exemplo, compostos hidrosolúveis como as antocianinas e as betalainas, a compostos lipossolúveis como os carotenóides e as clorofilas (Naidu e Sowbhagya, 2012). Para além destes compostos referidos, existe ainda um tipo de corantes naturais, os corantes caramelo, que são produzidos pelo aquecimento controlado de hidratos de carbono como a glucose, frutose e sacarose, sendo utilizados maioritariamente em refrigerantes, cervejas e brandys. Existem quatro classes comercialmente produzidas deste tipo de corantes, diferindo consoante o tipo de catalisador utilizado para promover a caramelização (Netto, 2009). Na UE existem correntemente 26 corantes naturais permitidos, segundo a legislação em vigor (Diretiva Comunitária nº 94/36/CE).

Quanto às tendências de mercado, não existem estatísticas de confiança publicadas para os consumos de corantes na indústria alimentar, mas segundo Downham e Collins, em 1999 o mercado mundial rondava os 940 milhões de dolars, repartidos em quatro classes: os corantes sintéticos (400 milhões), seguidos pelos corantes naturais (250 milhões), os corantes sintéticos idênticos ao natural (189 milhões) e os corantes caramelo (100 milhões).

Apesar de haver ainda uma ligeira discrepância entre os valores produzidos relativamente aos corantes sintéticos e aos naturais, a escolha do consumidor por produtos naturais, as mudanças sociológicas e os avanços tecnológicos da indústria alimentar, apontam para um aumento significativo na indústria dos corantes naturais, prevendo-se um aumento entre os 5-10%, enquanto que para os corantes sintéticos o aumento previsto ronda os 3-5% (Downham e Collins, 2000).

### 3. Calêndula

A *Calendula officinalis* é uma planta que pertence à família *Asteracea* (Hamad *et al.*, 2011) e é conhecida por vários nomes: calêndula, malmequer, maravilha, margarida dourada, verrucária, entre outros. É uma planta cuja flor tem um leque cromático desde o amarelo até ao laranja (Efstratiou *et al.*, 2012)

O nome calêndula vem do latim *Calends*, que significa o primeiro dia de cada mês, devido aos seus longos períodos de floração (Hamad *et al.*, 2011). É uma planta anual que, raras vezes, consegue estender o seu tempo de vida, passando a ser bianual (Quer, 1999).

Inicialmente esta planta foi cultivada por egípcios, gregos, hindus e árabes à volta do mar mediterrâneo. Acredita-se que no século XII começou a ser utilizada medicinalmente para tratar febres e promover a menstruação (Kemper, 1999). Ao longo dos séculos, apareceram vários outros problemas de saúde em que a calêndula foi vista como uma possível cura ou meio de prevenção, tais como úlceras no estômago e intestinos, hemorragias, lesões agudas e crónicas na pele, entre outras. Através do historial da calêndula é fácil verificar-se que esta planta é utilizada para sarar feridas (Patrick, *et al.*, 1996).

Este carácter anti-inflamatório, anti-pirético, anti-tumorogénico e cicatrizante é devido aos constituintes das pétalas da flor. Em estudos anteriores, num âmbito fitofarmacológico, foi confirmada a presença de metabolitos bioativos secundários, glicósido flavonóide e triterpenóides. Foi ainda confirmado que estes últimos representam um papel na atividade anti-inflamatória da planta (Kalvatchev, *et al.*, 1997). Investigadores na Venezuela estudaram extratos secos de flores de *Calendula officinalis*, como tendo efeito inibitório do vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (VIH-1). Segundo Lee *et al.*, os carotenóides presentes nesta planta podem agir como agentes foto-protetores (dependendo da

concentração), podendo reduzir o risco de queimaduras solares, alergias à luz e mesmo alguns tipos de cancro da pele (Pintea *et al*, 2003).

Em dias mais correntes, a calêndula tem um valor económico elevado, sendo amplamente utilizada em cosméticos, perfumes, fitoterapia, preparações farmacêuticas e na alimentação (Efstratiou *et al.*, 2012). Esta crescente valorização é fortemente influenciada pelo historial da planta, e pelos vários estudos recentemente efetuados, numa tentativa para melhor conhecer os constituintes presentes na planta.

As cores laranjas e amarelas características desta planta, são devidas a pigmentos de carotenóides (Kishimoto *et al.*, 2005). As variedades amarelas são ricas em xantofilas, que são derivados oxigenados enquanto que as laranjas contêm maiores quantidades de hidrocarbonatos, ou também conhecidos por carotenos (Pintea *et al*, 2003 & Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004). O teor de carotenóides totais está fortemente relacionado com a cor das pétalas, tendo sido verificado que quanto mais laranjas estas se apresentam (entre a cor amarela e laranja), maior será o seu teor e, normalmente, existe uma maior variedade de carotenóides presentes (Pintea *et al*, 2003; Kishimoto *et al*, 2005).

## **Carotenóides**

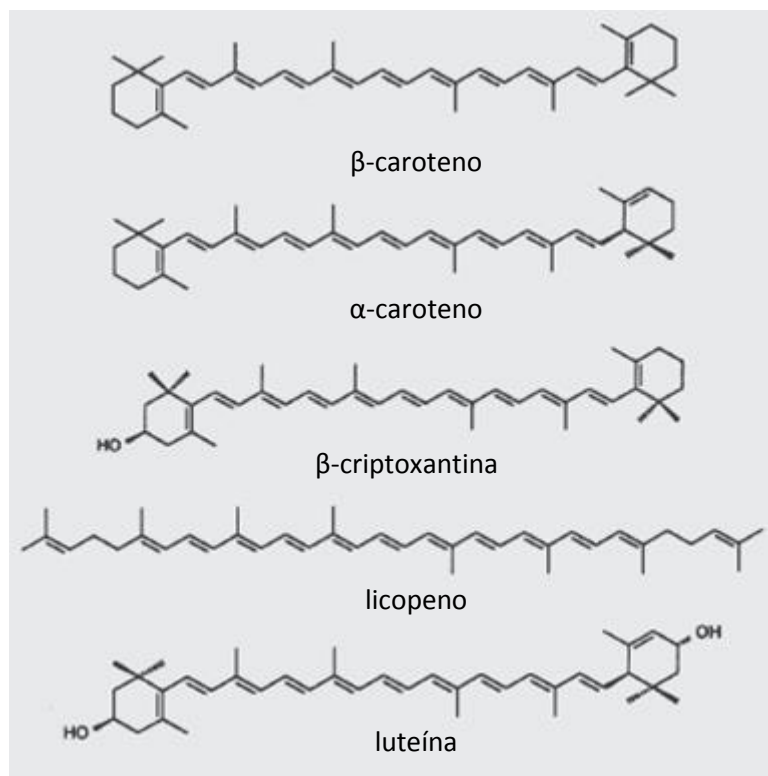
Os carotenóides pertencem ao grupo geral de compostos exógenos bioativos não enzimáticos, e são considerados como pró-vitaminas porque se conseguem converter em vitamina A. São compostos lipossolúveis, associados a frações lipídicas (Efstratiou *et al.*, 2012 & Quirós e Costa, 2004).

De um ponto de vista químico, os carotenóides podem ser divididos em dois grupos: os carotenos ou carotenóides hidrocarbonados, constituídos por apenas átomos de carbono e hidrogénio, e as xantofilas que contêm pelo menos um átomo de oxigénio (Quirós e Costa, 2004)

Mais de 600 carotenóides, não incluindo isómeros *cis* e *trans*, foram isolados e caracterizados em fontes naturais, sendo estes compostos bastante notáveis devido à sua ampla distribuição, diversidade estrutural e funcionalidade variada (Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004).

Nos géneros alimentícios, os carotenóides são geralmente tetraterpenos  $C_{40}$  formados por oito unidades isoprenóides  $C_5$ , ligadas cabeça-a-cauda, exceto no centro, onde existe uma ligação cauda-cauda que reverte a ordem, resultando

numa molécula simétrica (Figura 1). Esta ligação central, que é uma ligação dupla, é uma característica muito importante, pois constitui o cromóforo que absorve a luz e que por sua vez é responsável pela cor destes compostos. A estrutura química dos carotenóides pode ser modificada de várias maneiras, como por ciclização, hidrogenação, pelo encurtamento da cadeia ou um rearranjo, entre outros (Rodríguez-Amaya e Kimura, 2004).



**Figura 1.-** Estrutura química dos principais carotenóides em géneros alimentícios

Fonte: Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004

Existe uma forte correlação no consumo de vegetais, principalmente frutos e legumes de cores vermelhas, laranjas e amarelas, e uma reduzida ocorrência de doenças crónicas, como cancro, doenças cardiovasculares e degeneração macular (Quirós e Costa, 2004). Os elicitores da maioria das doenças crónicas são os radicais livres, que danificam o DNA celular. Esta correlação é devida à presença de carotenóides nestes alimentos, que têm uma forte atividade antioxidante (Dannehl *et al*, 2010). Em adição às propriedades antioxidantes dos carotenóides, são atribuídas propriedades anticancerígenas, impulsionando a avaliação do potencial farmacêutico destes compostos (Schmidt-Dannert, 2000).

Entre os carotenóides, o  $\beta$ -caroteno é o composto bioativo mais importante que se consegue captar através da alimentação e o antioxidante mais eficiente. Em teoria, cada molécula de  $\beta$ -caroteno pode ser convertido em duas moléculas de retinol (vitamina A), conferindo benefícios para a saúde humana (Dannehl *et al*, 2010 & Knockaert *et al*, 2012).

No entanto, a utilização de carotenóides como ingredientes nutracêuticos em alimentos é limitado devido à sua fraca solubilidade em água, ponto de fusão elevado, instabilidade química e baixa biodisponibilidade. Os carotenóides em fontes naturais encontram-se na forma de cristais ou em proteínas complexas, não sendo completamente libertados durante a digestão. Outra barreira que tem que ser ultrapassada é o facto de que, para serem incorporados em géneros alimentícios, estes compostos têm que ser dissolvidos em óleos ou dispersos em outras matrizes adequadas, devido ao comportamento lipossolúvel dos carotenóides. As fortes cores que estes compostos apresentam (vermelho/laranja/amarelo), limitam os tipos de alimentos em que os corantes podem ser utilizados. Por fim, os carotenóides têm uma forte inclinação para sofrer degradações químicas devido a processos térmicos, mecânicos e químicos durante o armazenamento de alimentos (Qian *et al*, 2011)

Os principais compostos presentes na calêndula são a flavoxantina, o licopeno, a auroxantina, a luteína, a  $\alpha$  e  $\beta$ -criptoxantina e o  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno. No entanto, não existe uma composição qualitativa e quantitativa definida, devido a fatores extrínsecos como as condições edafoclimáticas e a fatores intrínsecos como a parte da planta analisada, as condições de produção, o manuseamento pós-colheita, etc (Bakó *et al*, 2001 & Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004 & Ohmiya, 2011).

**Tabela 1.-** Presença de carotenóides em pétalas de calêndula de cor laranja ou amarela.

<b>Carotenóides</b>	<b><i>Calendula officinalis</i> (laranja)</b>	<b><i>Calendula officinalis</i> (amarela)</b>
Flavoxantina	X	X
(8'R)-Luteoxantina	X	X
Licopeno	X	
(8R,8'R)-Auroxantina	X	X
(9'Z)-Luteína-5,6-epoxido	X	X
(5'Z)- $\gamma$ -Caroteno	X	
(5Z,9Z)-Licopeno	X	
(5Z,9Z,5'Z,9'Z)-Licopeno	X	
(5'Z,9'Z)-Rubixantina	X	
(5Z,9Z,5'Z)-Licopeno	X	
$\beta$ -Caroteno	X	X
(5'Z)-Rubixantina	X	
$\gamma$ -Caroteno	X	
Luteína	X	X
Luteína-5,6-epoxido	X	
$\eta$ -Caroteno	X	
Anteroxantina	X	X
$\alpha$ -Caroteno	X	
(9Z)-Luteína	X	X

Na tabela 1 pode verificar-se, e como já foi referido anteriormente, que as pétalas de cor laranja apresentam, na sua composição, um maior número de carotenóides e um maior número de carotenos, do que as pétalas de cor amarela.

#### 4. Centáurea

O género *Centaurea* faz parte da família das Compositae, também conhecida por Asteraceae. É uma planta anual, com suas origens na Europa, na região do mediterrâneo, e na Ásia em regiões subtropicais e com um clima temperado. Esta planta é vista como uma erva que cresce nos campos, havendo estudos que consideram que, em pequenas quantidades, esta planta pode ser uma boa companhia para as culturas de cereais, enquanto que outros relatórios consideram as raízes desta planta como um obstáculo, relativamente à obtenção de nutrientes das cultivares com interesse económico (Chiru, 2009). É conhecida como centáurea, escovinha ou fidalguinhos, e tem uma grande variedade de cores que pode apresentar, como o azul, rosa, branco, vermelho e roxo (sendo a cor azul a mais comum).

A centáurea tem um vasto historial como erva medicinal, apesar de nos dias correntes não ser utilizada com muita frequência. Externamente, esta planta pode ser utilizada como um anti-inflamatório ou como uma erva adstringente para incómodos oculares e limpeza de pele. Infusões de florescências desta planta têm um efeito curativo e acalmante para distúrbios nervosos, como também podem melhorar a digestão e a resistência a infeções (Chiru, 2009).

Todo este carácter medicinal é devido aos compostos presentes na planta, principalmente os compostos fenólicos, como os flavonóides e os taninos. Os compostos fenólicos são os metabolitos secundários mais comuns no reino vegetal, e agem maioritariamente como fitoalexinas, como agentes atrativos de polinizadores, contribuindo ainda para a coloração das plantas e tendo ainda uma componente de proteção contra a luz UV (Blainski *et al*, 2013).

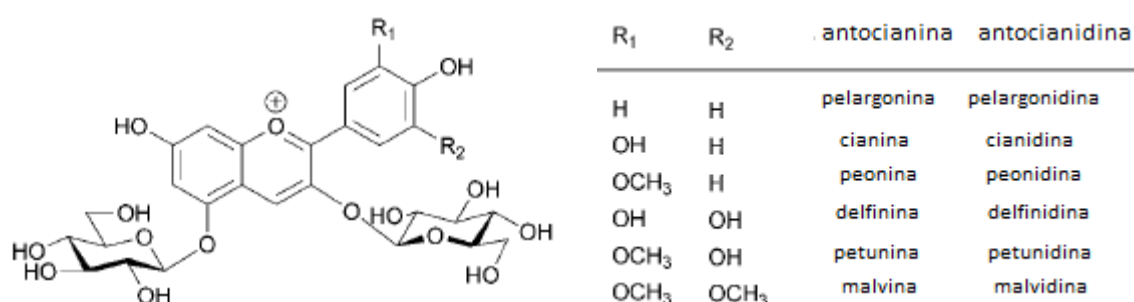
Existem mais de cinco mil compostos de flavonóides na Natureza que foram classificados em diferentes grupos tais como as antocianinas, as flavonas e isoflavonas, as auronas, etc. Dentro destes compostos, as antocianinas irão ser analisadas em maior pormenor neste trabalho.

## Antocianinas

A palavra antocianina provém das palavras gregas *Anthos* que significa flores e *Kyanos* que significa azul (Melo *et al*, 2009).

As antocianinas são os pigmentos hidrossolúveis mais comuns que se pode encontrar nas flores e frutos, e conferem uma grande diversidade de cores, que preenche praticamente todo o espectro visível, desde o laranja e vermelho, passando pelo roxo e os tons azulados (Teixeira *et al*, 2008 & Fernandes *et al*, 2013).

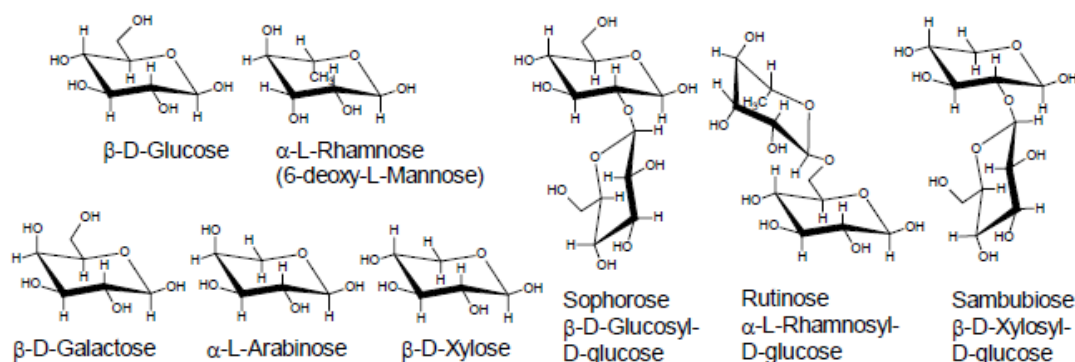
As antocianinas são glucósidos derivados de polihidroxi e polimetoxi de 2-fenilbenzopirílio ou catião flavílio (Figura 2), diferenciando-se no número de compostos hidróxilos na molécula, no grau de metilação, na natureza e no número de moléculas de açúcar como também a posição da ligação. O catião flavílio é a estrutura base, com um esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> típico de flavonóides, que contém ligações duplas conjugadas, responsáveis pela absorção da luz a um comprimento de 500 nm, apresentando a cor vermelha (Rein, 2005). As agliconas, i.e. a parte da molécula sem açúcares presentes são denominadas por antocianidinas, e estas também se diferenciam pelo número, natureza e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo presentes. As antocianidinas mais comuns são as 6 representadas na figura 2 (Khan e Farooqui, 2011).



**Figura 2.-** Estrutura geral das antocianinas (Catião Flavílio) e das suas antocianidinas

Fonte: Yoshida *et al*, 2008

De entre as várias moléculas de açúcar que podem ser encontradas nas antocianinas, as mais comuns são a glucose, a galactose e a ramnose (Figura 3). Estas moléculas normalmente ligam-se ao grupo 3-hidroxilo da antocianidina, no caso de monosacáridos, ou no caso de bissacáridos podem haver ligações nos grupos 3-hidróxilo e 5-hidróxilo ou, raramente, nos grupos 3-hidróxilo e 7-hidróxilo (Rein, 2005 & Khan e Farooqui, 2011)



**Figura 3.-** Unidades glicosídicas que se podem encontrar nas antocianinas

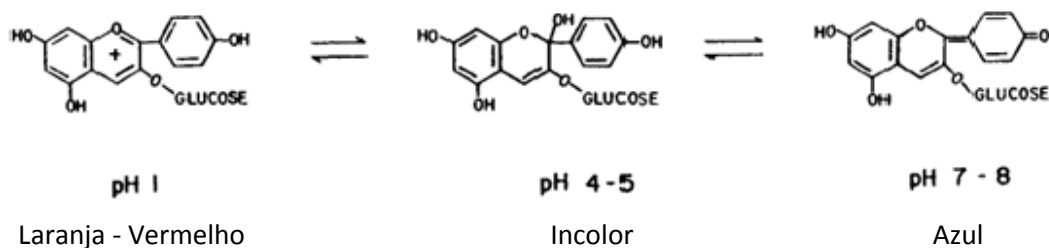
Fonte: Rein, 2005

As antocianinas são representadas por mais de 600 estruturas moleculares e têm um grande interesse para a indústria alimentar, não só por conferirem cores aos alimentos, mas também pelos benefícios que conferem, pela sua ingestão, na saúde humana (Konczak e Zhang, 2004).

Estes benefícios para a saúde humana são vastos: prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e cancro. Para além destes fatores, estes compostos apresentam um nível de toxicidade bastante baixo, promovendo a sua utilização na alimentação (Ribeiro *et al*, 2004 & Liu *et al*, 2012).

Apesar destes benefícios, existem ainda algumas barreiras a ultrapassar, uma vez que as antocianinas são muito instáveis e altamente suscetíveis a degradações. A sua estabilidade é afetada pelo pH do meio, a temperatura, a presença de enzimas, luz, oxigénio e ainda pela estrutura e concentração das próprias antocianinas. A presença de outros compostos como flavonóides, minerais e proteínas também podem influenciar esta estabilidade (Khan e Farooqui, 2011).

Na figura 4 apresenta-se as transformações estruturais das antocianinas e as várias cores obtidas, devido à variação do pH.



**Figura 4.-** Transformações estruturais de antocianinas através de mudanças de pH

Adaptado de: Ronald E. Wrolstad, 1993

Segundo Kôsaku Takeda e Satoko Tominaga, até 1983 acreditava-se que a cor azul da centáurea era proveniente, maioritariamente, devido à cianidina 3,5-diglicósido – cianina. No entanto, após um estudo realizado nesse ano por estes dois autores, concluíram que a cor azul da centáurea era devido à cianidina 3-sucinil glucósido 5-glucósido, em vez de a cianina. Esta nova antocianina, nunca antes identificada, ficou conhecida como centaurocianina (Takeda e Tominaga, 1983).

### **III. Desenvolvimento Experimental**

#### **1. Materiais**

##### **Material biológico**

*Calendula officinalis*

*Centaurea cyanus*

##### **Outros materiais**

Papel de filtro Whatman nº 4 QUALITATIVE

##### **Reagentes**

Acetato de Sódio – Merck; pro analysi

Acetona – Sharlau, SA; puríssima

Ácido acético – Merck-Schuchardt; 99-100% for synthesis

Ácido cítrico – BDH Chemicals; general purpose reagent

Ácido clorídrico – Merck; pro analysi

Ácido gálico – Merck; extra puro

Água destilada

Carbonato de Sódio–Hopkins & Williams

Cloreto de Ferro Hexahidratado – Merck; pro analysi

Cloreto de Potássio – RPE; agente puro

DPPH -

Etanol - Panreac

Éter etílico – Merck; pro analysi

Hexano – Merck; pro analysi

Hidróxido de Sódio – Merck; pro analysi

Metanol – Merck; pro analysi

Reagente Folin-Ciocalteu–Panreac

Solução tampão 4 – Panreac

Solução tampão 7 – Panreac

Solução tampão 9 – Panreac

Tampão acetato –Merck; pro analysi

TPTZ - Flucka

## **Equipamentos**

Destilador Kottermann 1032

Moinho Ika-Werk (Janke & Kunkel)

Homogeneizador Ultra Turrax T25

Centrífuga Martin Christ Osterode/Harz (pequenas quantidades)

Centrífuga Dorval RC-5B com rotor GSA (grandes quantidades)

Evaporador rotativo BUCHI R-114

Agitador

Medidor de pH Crison Basic 20

Colorímetro Minolta Chroma Meter CR-200b

Espectofotômetro Hitachi U-2010

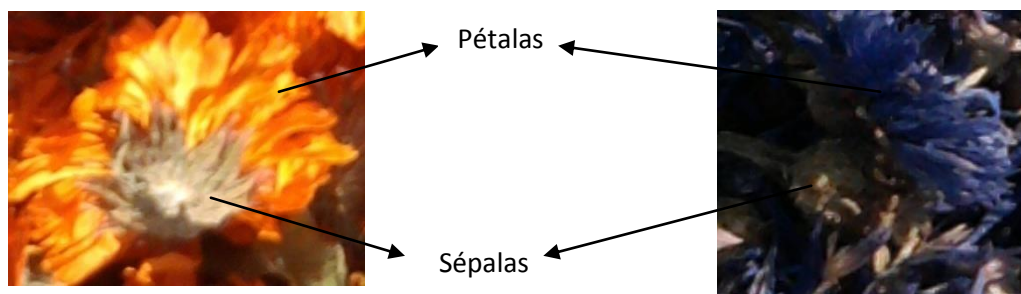
Ultra sons Branson 2200

## 2. Métodos

### 2.1 Preparação da amostra

Este trabalho envolve o estudo de duas plantas, *Calendula officinalis* e *Centaurea cyanus*, as quais foram fornecidas pela Herdade do Gamonal em Montargil, onde foi realizada uma primeira secagem em estufa elétrica. No INIAV, por as plantas terem adquirido humidade durante o transporte, foi realizada uma segunda secagem, em estufa, de modo a poderem ser armazenadas

De seguida, as pétalas foram separadas das sépalas e outros resíduos, pois é nesta parte do material vegetal (pétalas) que se encontram os compostos que interessam extrair e que apresentam interesse para a indústria (Figura 5).



**Figura 5.-** Morfologia das flores secas, utilizadas para preparação do material vegetal, calêndula (esquerda) e centáurea (direita)

De seguida as pétalas foram trituradas num moinho Ika-Werk (Janke & Kunkel), com uma rede de malha 0.5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 6). Nesta etapa pretendeu-se aumentar a área específica da matéria-prima para a extração, de modo a aumentar o rendimento.

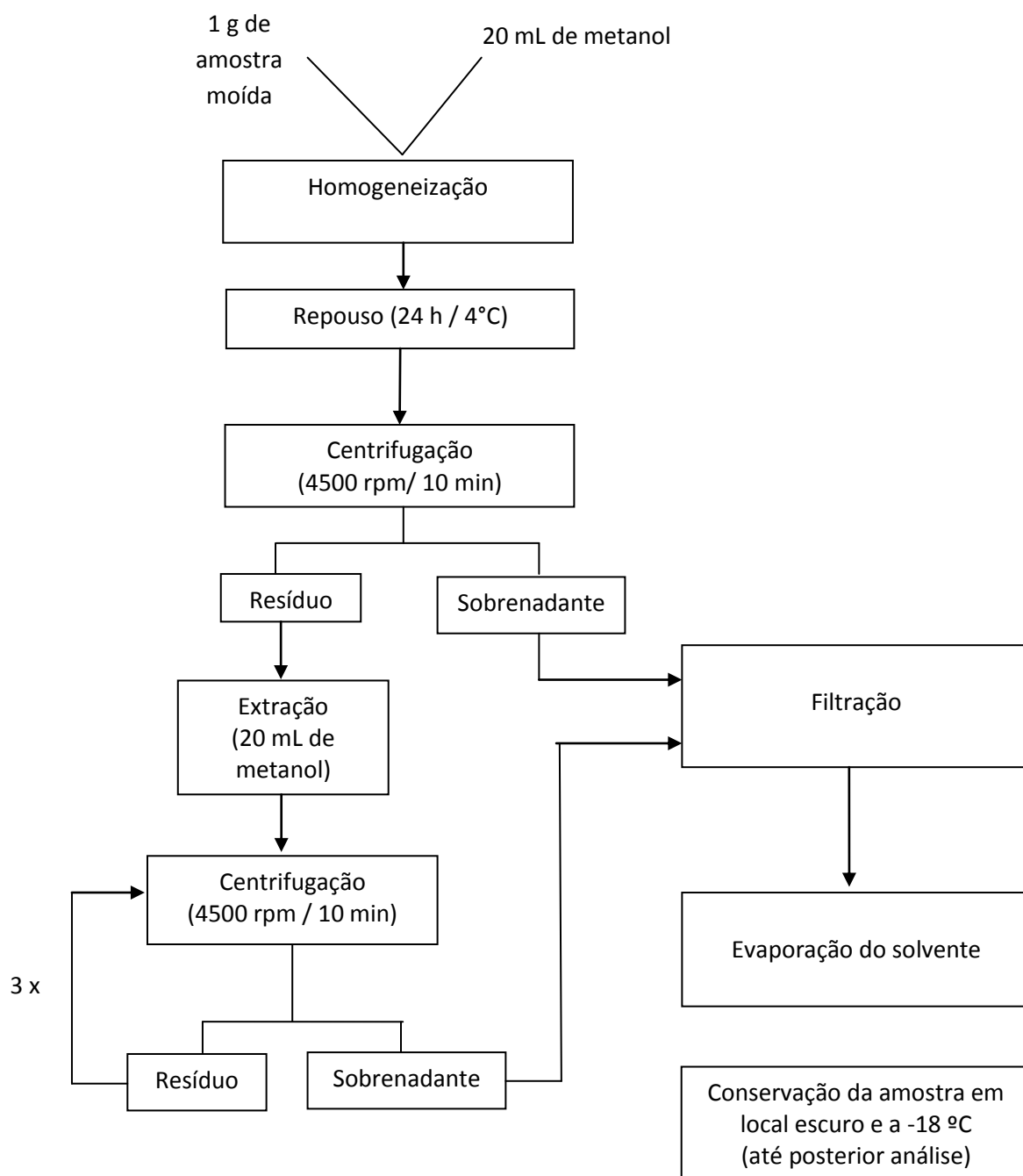


**Figura 6.-** Pétalas antes (cima) e depois (baixo) da moagem, da centáurea (esquerda) e calêndula (direita)

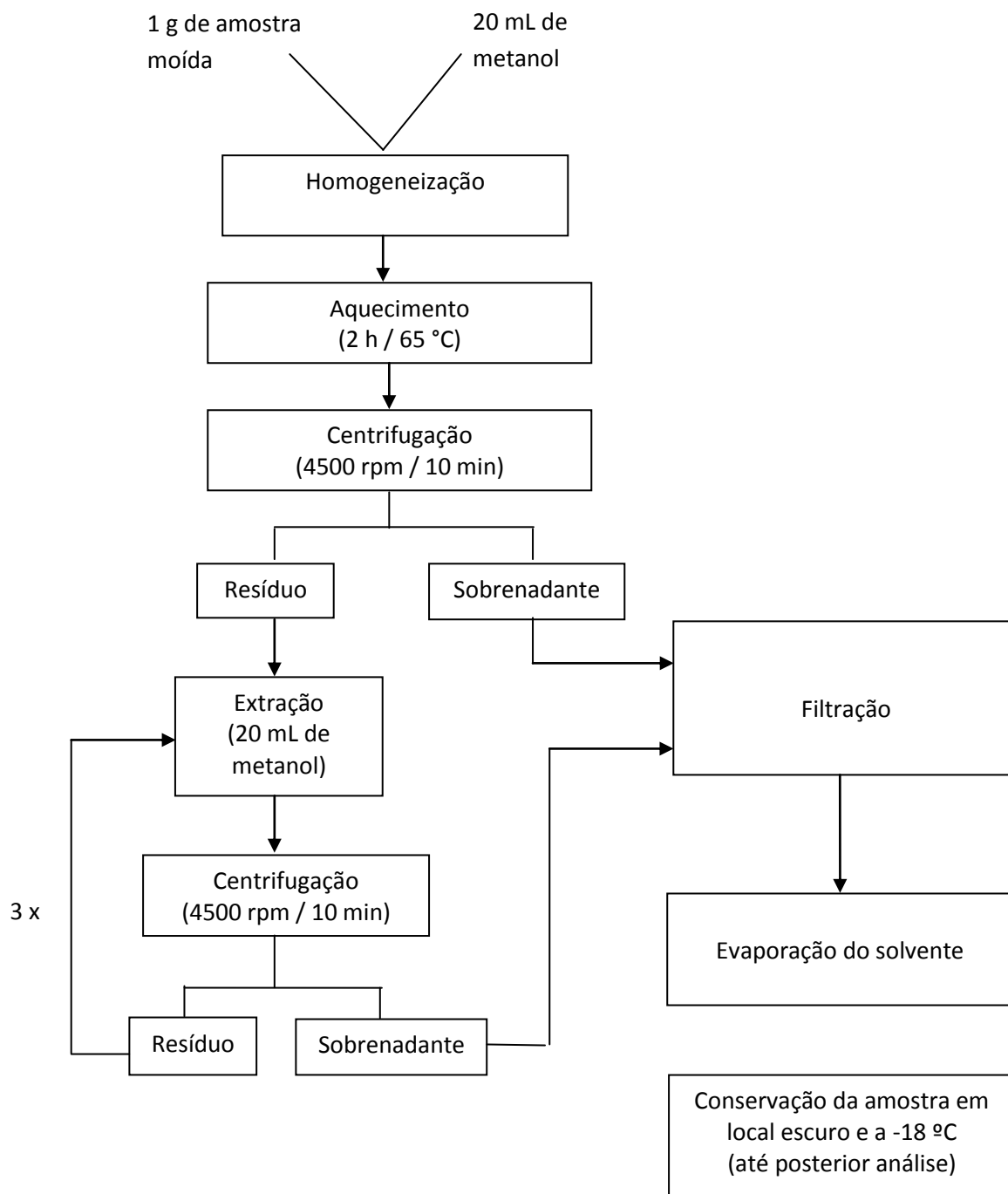
## **2.2 Extracção da fração corante**

Para a obtenção de corantes, em qualquer indústria, o rendimento é um fator muito importante. Com isto em vista, o primeiro passo que foi realizado foi a otimização do processo de extração, que foi realizada de maneira diferente para cada um das plantas.

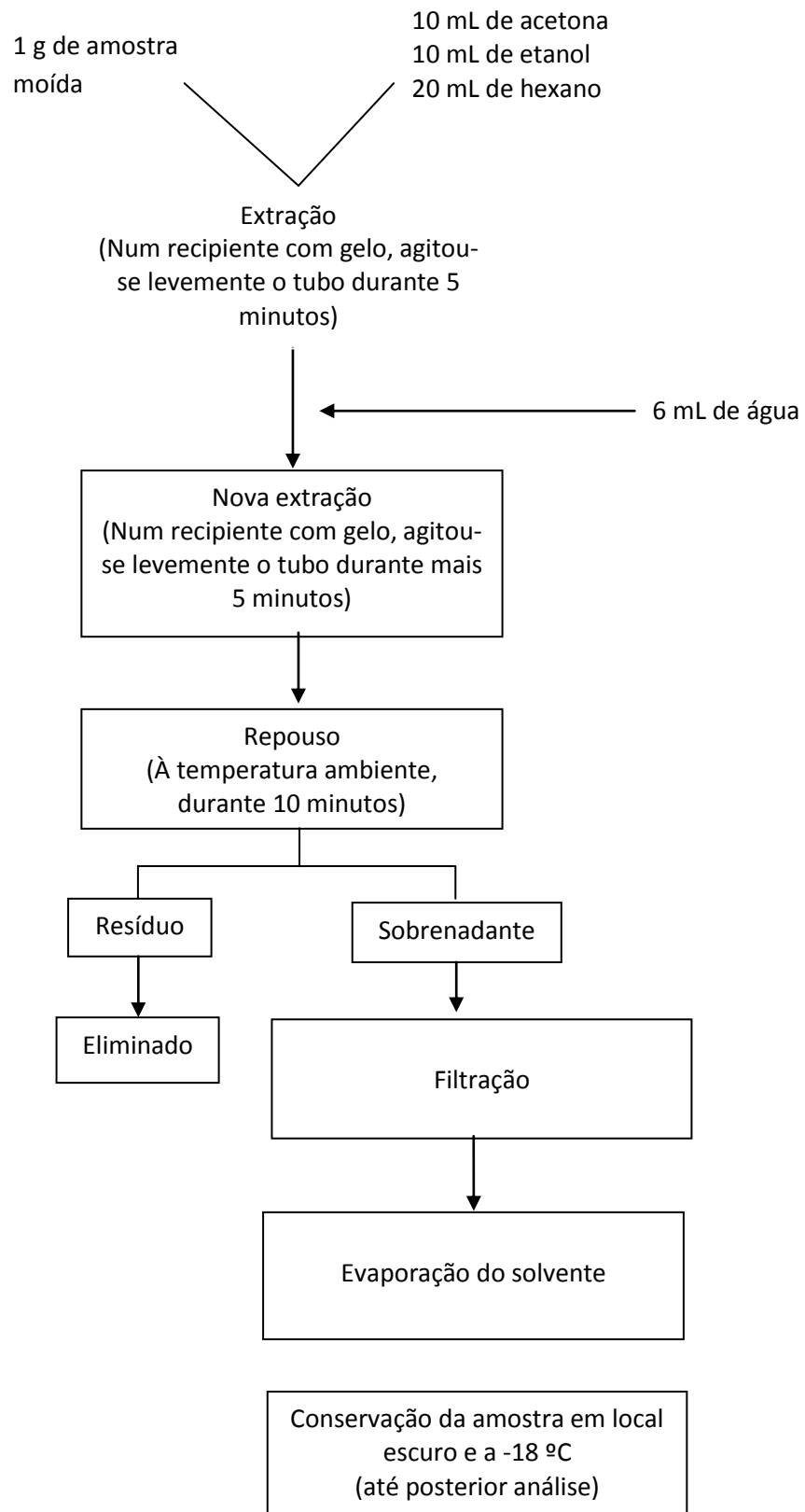
No caso da calêndula, foram testados métodos de extração diferentes, utilizando solventes diferentes e testando ainda a influência da temperatura na extração. São apresentados de seguida os diferentes métodos de extração realizados para a calêndula.



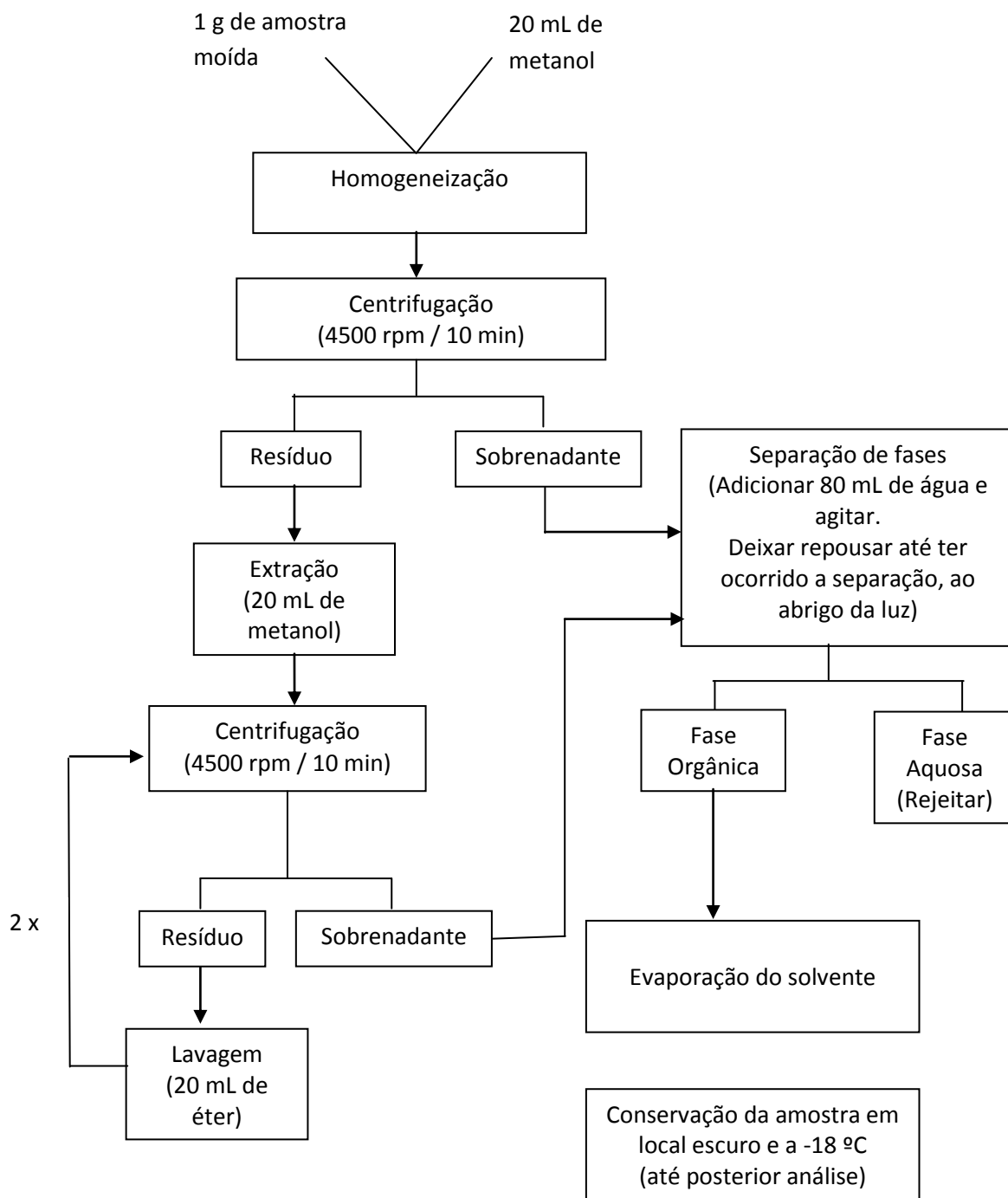
**Figura 7.-** Diagrama de extração, utilizando metanol a frio ( 4 °C)



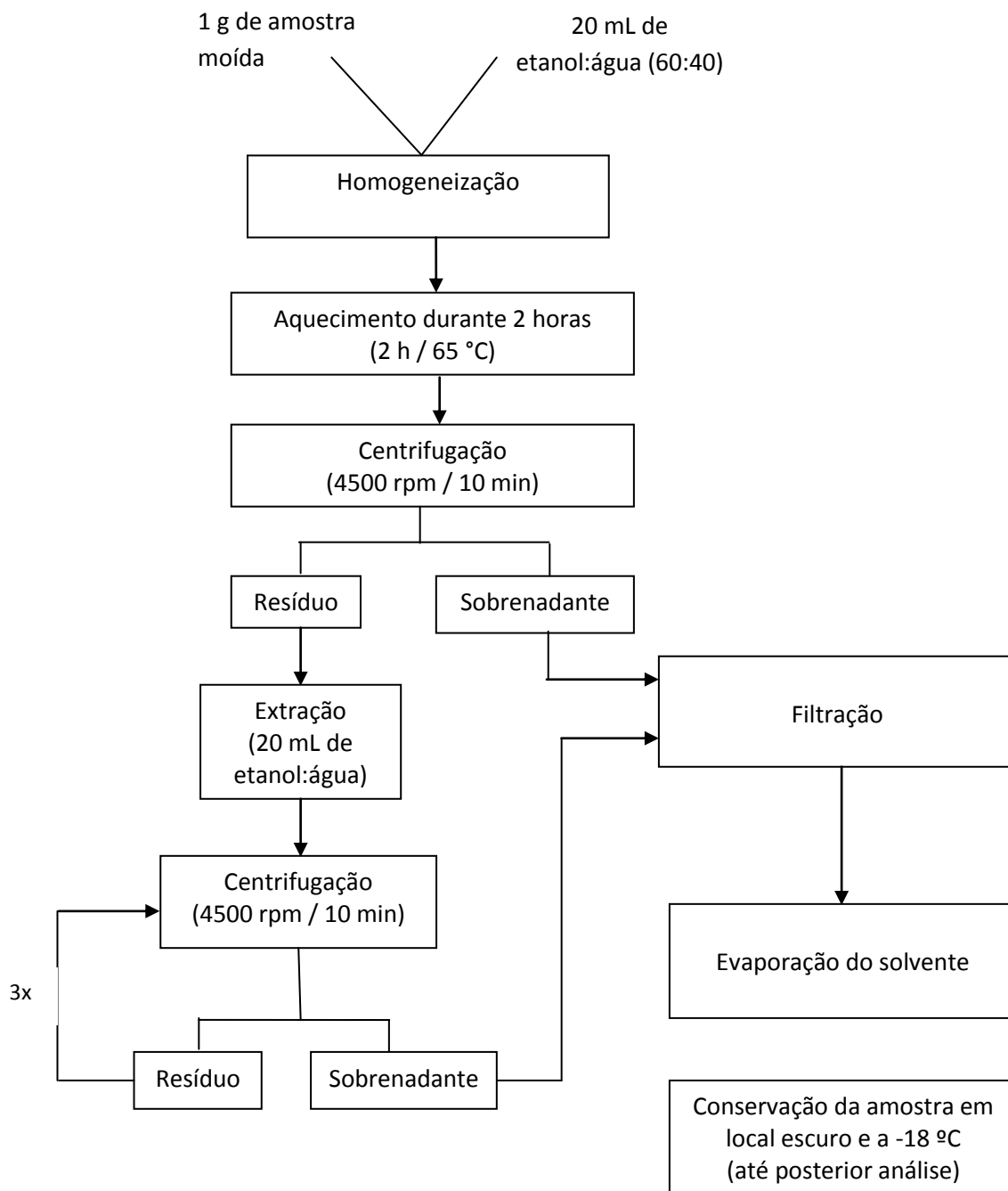
**Figura 8.-** Diagrama de extração, utilizando metanol como solvente de extração, a quente (65 °C)



**Figura 9.-** Diagrama de extração utilizando como solução uma mistura entre acetona, etanol e hexano



**Figura 10.-** Diagrama de extração através de separação de fases



**Figura 11.-** Diagrama de extração a quente (65 °C), utilizando uma solução de etanol:água (60:40) como solvente de extração

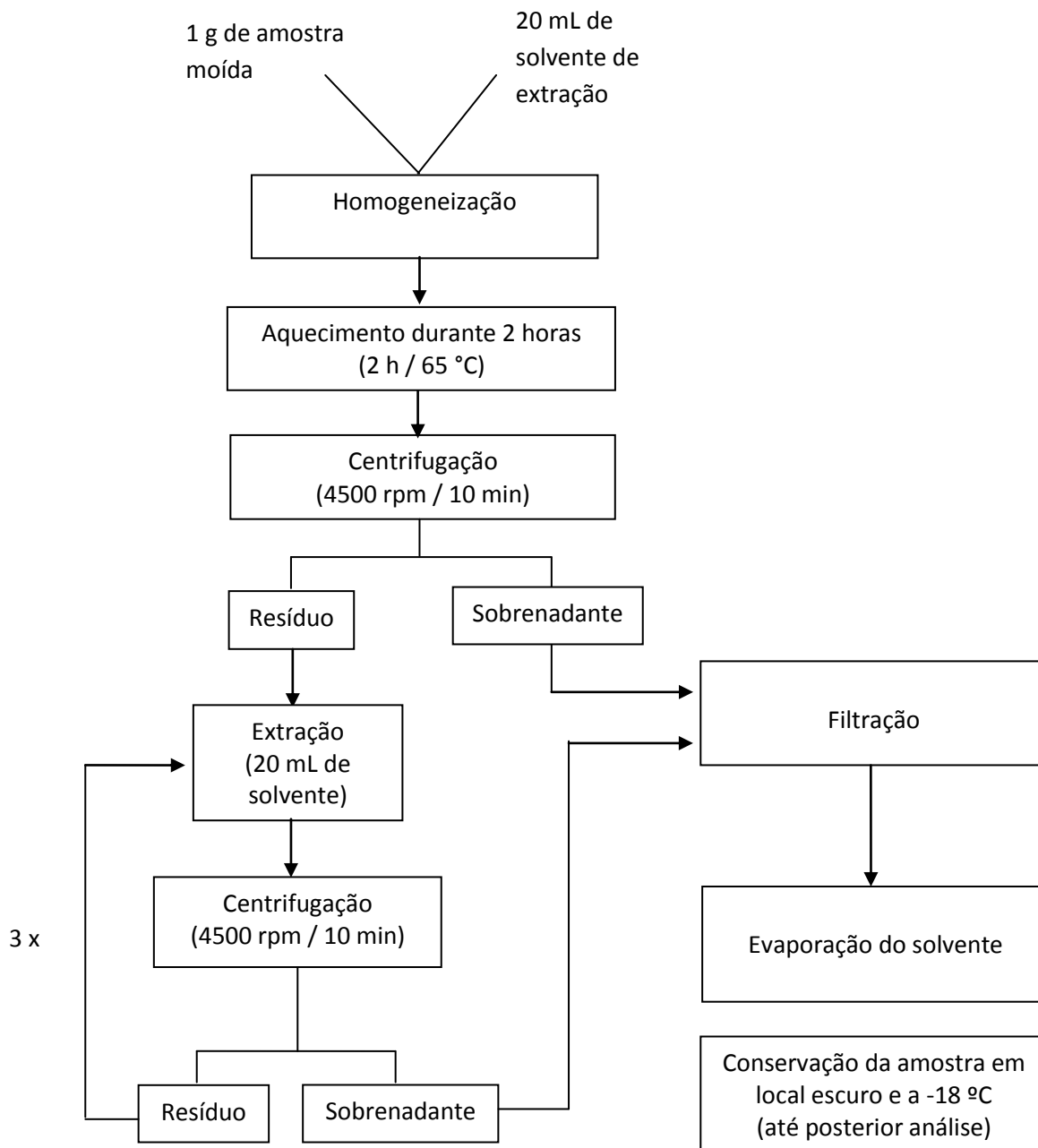
Para a centáurea, analisou-se em primeiro lugar o efeito da temperatura no rendimento da extração, e posteriormente o efeito do pH. Como tal, foram realizadas duas extrações, uma a frio e outra a quente, segundo os diagramas apresentados nas figuras 7 e 8, respetivamente. Para analisar o efeito do pH, manteve-se a temperatura, tendo sido seguido o procedimento esquematizado no diagrama da figura 12, fazendo-se variar o pH do solvente de extração. Na tabela 2, são apresentados os diferentes solventes utilizados e o seu nível de pH.

**Tabela 2.-** Lista de solventes de extração para a obtenção de corantes para a *Centaurea cyannus*

<b>Solventes</b>	<b>Descrição</b>	<b>pH</b>
A	Etanol:HCl:Água (50:1:49)	pH = 1
B	Etanol:Água acidificada com HCl (60:40)	pH = 1
C	Etanol:Água acidificada com HCl (60:40)	pH = 4
D	Etanol:Água acidificada com Ác. Cítrico (60:40)	pH = 4
E	Etanol:Água (60:40)	pH = 6
F	Etanol:Água alcalinizada com NaOH (60:40)	pH = 8
G	Etanol:Água alcalinizada com NaOH (60:40)	pH = 10

Como já foi referido anteriormente, as antocianinas tomam uma cor mais azulada, em meios com um pH mais elevado. Por esta razão, foram realizadas diferentes extrações, em que foi utilizado como solvente de extração soluções com níveis de pH que variaram entre 1 e 10. Infelizmente, não foi possível obter extratos com uma cor azul, uma vez que a cor vermelha esteve sempre presente. Sendo assim, os extratos de soluções com pH mais elevado obtiveram uma cor roxa.

A utilização de ácido cítrico serviu como comparação de rendimentos, para verificar se este solvente poderia substituir o ácido clorídrico, visto este ser considerado mais natural, sendo assim também mais aceitável na indústria alimentar.



**Figura 12.-** Diagrama de extração, após estudo da temperatura, da centáurea

## 2.3 Métodos analíticos

### 2.3.1 Cor

Como já foi dito anteriormente, a cor é um fator muito importante para a aceitação de um produto alimentar, e por isso foi um dos parâmetros estudados neste trabalho.

A cor depende de três fatores: a fonte de luz, a amostra (objeto a ser observado) e o observador. A impressão de cor resulta destas três variáveis e pode ser expressa quantitativamente através da medição da cor (Macdougall, 2002). Wright (1969) e Guild (1931) desenvolveram um trabalho que consistiu no estabelecimento de respostas características de um olho humano padrão a diferentes cores do espectro provenientes de várias fontes de luz. Este trabalho levou à formação da CIE (*International Commission on Illumination*), Comissão Internacional de Iluminação, com o objetivo de promover um fórum para a troca de ideias e informações e para se padronizarem todos os termos relativos à iluminação.

Em 1976, a CIE especificou dois espaços de cores. Um deles foi destinado para uso de cores com iluminação própria (ex.: monitor de televisão), enquanto o outro foi direcionado para o uso com cores de superfície e é conhecido como espaço de cores CIE 1976, ou  $L^* a^* b^*$ , ou, mais correntemente, pela sigla CIELAB. O CIELAB permite a especificação de percepções de cores num espaço tridimensional. A axial “L” é conhecida como luminosidade e estende-se de 0 (preto) a 100 (branco). As outras 2 coordenadas,  $a^*$  e  $b^*$ , representam, respetivamente, avermelhar – esverdear e amarelar – azular (Piggott, 1998)

Para a medida dos parâmetros de cor  $L^* a^* b^*$  recorreu-se a um colorímetro de reflectância Minolta Chroma Meter CR-200b, com uma abertura de leitura de 8 mm, iluminação difusa e ângulo de observação de 0°. Os resultados obtidos por este equipamento foram apresentados no espaço uniforme de cor CIE ( $L^* a^* b^*$ ).

As leituras foram realizadas em todas as etapas do trabalho, desde a otimização do processo de extração, como posteriormente na análise da termo resistência, para avaliar se o corante está apto para ser utilizado em alimentos que sofram aquecimento, como na foto resistência, para se poder ter uma ideia de que tipo de processo tecnológico os alimentos podem ser submetidos ou do tipo de embalagem que podem ser utilizados durante a conservação dos alimentos, para não perderem a coloração durante a transformação e a armazenagem. Todas as leituras foram feitas em triplicado e sextuplicado.

### **2.3.2 Método de redução do íon ferro (FRAP)**

A capacidade antioxidante dos extratos, dos corantes extraídos a partir do material vegetal, foi determinada pelo método de redução do íon ferro (FRAP – Ferric Reducing Ability of Plasma), descrito por Benzie e Strain. Este método é bastante fácil e acessível para qualquer laboratório interessado na determinação da capacidade antioxidante (I. Benzie, J. Strain, 1996). Baseia-se na redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /tripiridiltriázina, em meio ácido (pH = 3.6) no complexo  $\text{Fe}^{2+}$ /tripiridiltriázina. Este último apresenta uma cor azul e tem uma absorção máxima a um comprimento de onda de 593 nm.

Para a realização deste teste foi necessário preparar primeiramente a solução FRAP. Para tal misturou-se, de forma ordenada, os seguintes reagentes: 2,5 mL de (10  $\mu\text{mol/L}$  TPTZ em 40  $\mu\text{mol HCl}$ ), 2,5 mL de (20  $\mu\text{mol/L FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e 25 mL de (16 mL  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2/\text{L}$  em tampão acetato (300  $\mu\text{mol/L}$ , com pH = 3.6). Este tampão acetato foi obtido através da solubilização de 3.1 g de  $\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em água.

De seguida misturou-se 0,2 mL da amostra com 1,8 mL da solução FRAP, agitou-se e esperou-se 5 minutos, com a amostra no escuro. Preparou-se ainda um padrão com água destilada. Por fim fez-se a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 593 nm, em triplicado, num espectrofotômetro de feixe duplo (Hitachi U-2010 Spectrophotometer) com o software UV Solutions, version 1.2 Hitachi Instruments, Inc. 1996-1999.

A capacidade antioxidante dos corantes foi obtida através de uma curva de calibração, onde foram preparadas diferentes concentrações de sulfato de ferro. Os resultados obtidos são expressos em micromol de íon sulfato de ferro por grama ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de resíduo seco.

### **2.3.3 Método de captação do radical DPPH**

Visto não haver um método único para determinar a capacidade antioxidante, foi utilizado outro, o método de captação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Este método, descrito por Bran-Williams *et al* (1995), com modificações apresentadas por Scherer e Godoy (2009), baseia-se na captação deste radical por antioxidantes presentes na amostra, provocando uma diminuição da absorvância (Rufino *et al*, 2007).

A capacidade antioxidante dos extratos dos corantes extraídos a partir do material vegetal foi obtida através da solubilização duma parte da matéria seca extraída, a solução-mãe, e realizando posteriores diluições desta.

De seguida preparou-se uma solução etanólica 95% (v/v), para se solubilizar 8 mg de DPPH, num balão aferido de 100 mL.

Por fim, pipetou-se 100 µL da solução-mãe e de cada diluição e adicionou-se 2 mL de da solução DPPH (0.2 mM), agitou-se e guardou-se durante 1 hora no escuro, antes de terem sido efetuadas as leituras a 517 nm no espetofotómetro. Foi ainda preparado um ensaio em branco, com 200 µL de água destilada e 4 mL da solução etanólica 95% (v/v), e uma solução padrão com 200 µL de água destilada e 4 mL da solução DPPH. As leituras foram efetuadas em triplicado.

Os resultados da captação de radicais livres são expressos em unidades de concentração representada através de  $EC_{50}$  ( $mg \cdot mL^{-1}$ ), isto é, a concentração de antioxidantes necessária para se captar 50% de radicais de DPPH, num certo período de tempo, através da equação 1.

Outra forma de se apresentar a capacidade antioxidante das amostras é pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA), que é calculado pela equação 2.

Cálculo do parâmetro  $EC_{50}$

$$\text{Inibição de DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs do Branco DPPH} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do Branco DPPH}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1.})$$

Pela recta obtida, iguala-se  $EC_{50} \rightarrow 50$ .

Cálculo do IAA

$$\text{IAA} = \frac{\text{Concentração Final de DPPH}}{EC_{50}} \quad (\text{Eq. 2.})$$

### **2.3.4 Método de Folin-Ciocalteu para a determinação de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos totais foi realizado pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Slinkart e Singleton (1977), nos extratos dos corantes extraídos a partir do material vegetal. Este método consiste na redução do reagente de Folin, pelos compostos fenólicos, formando-se óxidos de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ), ambos de cor azul e com uma absorção máxima a um comprimento de onda de 750 nm.

Para a reação utilizou-se entre 500  $\mu$ L e 1 mL da solução dos extratos de corantes (obtida por diluição do resíduo seco), com posterior adição de 7,5 a 7 mL de água destilada (consoante a quantidade de amostra colocada), 500  $\mu$ L de reagente Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio (20%). Para o ensaio em branco foi utilizado 8 mL de água destilada, em substituição da quantidade de amostra. A leitura da absorvância foi realizada após 2 horas, nas quais os extratos dos corantes se encontravam em local escuro, contra o branco, no espectrofotômetro. Todas as leituras foram realizadas em triplicado.

O teor de compostos fenólicos foi calculado a partir de uma curva de calibração, preparada através de diferentes concentrações de ácido gálico ( $6,28 \times 10^{-4}$  a  $1,25 \times 10^{-2}$  g.L<sup>-1</sup>), com um coeficiente de correlação de 0,9975. Os resultados são expressos em equivalente miligrama de ác. gálico por grama de resíduo seco.

### **2.3.5 Carotenóides totais**

Para o teor de carotenóides totais foi necessário solubilizar a matéria seca, resultante dos extratos dos corantes, obtidos nas fases anteriores, e efetuando-se a leitura das absorvâncias dos extratos a um comprimento de onda de 472 nm.

Os resultados foram obtidos seguindo o método de cálculo de K. John Scott, pela equação 3, sendo estes expressos em  $\mu$ g de carotenóides totais por mL de solução. Os resultados finais foram expressos em micrograma ( $\mu$ g) de carotenóides totais por grama (g) de matéria seca, através da densidade.

$$\text{Carotenóides Totais} = \frac{A \times F.D \times P \times 1000}{C.E.M \times V}$$

**(Eq. 3.)**

Na equação temos A como o valor de absorvância obtido pelo espectrofotómetro, F.D como o factor de diluição, caso tenha sido realizado alguma, P o peso (mg), C.E.M é o coeficiente de extinção molar e V o volume utilizado (mL).

### **2.3.6 Antocianinas totais**

Para a determinação do teor de antocianinas utilizou-se o método de pH diferencial, segundo Ronald E. Wrolstad (1993). Este método consiste na determinação da diferença de absorvâncias de duas soluções de pH=1 e pH=4.5, preparadas a partir do resíduo do corante que se pretende analisar e lidas a dois comprimentos de onda (510 nm e 700 nm).

As soluções de pH=1 e pH=4.5 foram preparadas da seguinte forma: para o pH 1 dissolveu-se 1,49 g de cloreto de potássio (KCl) em 100 mL de água destilada, misturou-se 1,7 mL de HCl com água destilada até perfazer 100 mL e por fim misturou-se 25 mL da primeira solução com 67 mL da segunda, fazendo ajustes no volume restante, até se obter 100 mL. Para o pH 4,5 dissolveu-se 1,64 g de acetato de sódio em 100 mL de água destilada, fazendo ajustes com HCl, até se obter o pH de 4,5.

De seguida misturou-se 1 mL de cada amostra com 4 mL de cada uma das soluções de pH 1 e 4.5 , num balão aferido de 5 mL, proseguindo-se à leitura das absorvâncias a dois comprimentos de onda: a 510 nm e a 700 nm. Cada uma das leituras foi feita em quatriplicado.

Relativamente aos cálculos, foi primeiro obtida a absorvância total, através da equação 4. Os resultados do teor de antocianinas totais foram obtidos segundo a equação 5, onde são expressos em miligramas (mg) de antocianinas por litro (L) de amostra.

Cálculo da Absorvância

$$A = (Abs_{510} \text{ pH } 1 - Abs_{700} \text{ pH } 1) - (Abs_{510} \text{ pH } 4,5 - Abs_{700} \text{ pH } 4,5)$$

**eq. 4.**

Cálculo de Antocianinas totais

$$\text{Antocianinas (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 10^3}{\epsilon \times L}$$

eq. 5.

Na equação 5 temos expresso: A como a absorvância total, calculada anteriormente, PM é o peso molecular da antocianina (449,2), FD é o factor de diluição (10),  $\epsilon$  é a absorvância molar de cianidina-3-glucósido (Cyd-3-glu) (26 900) e L é o comprimento da célula (1)

## 2.4 Estudo da estabilidade dos corantes

A indústria alimentar, destino final dos corantes em estudo, é uma indústria onde ocorrem vários processos tecnológicos de transformação e conservação dos alimentos. Por estas razões, devem ser estudadas mais em pormenor certas condições, de maneira a evitar alterações nas estruturas moleculares dos alimentos, causando deteriorações dos mesmos. Por essa razão foram estudadas a estabilidade dos corantes em certos ambientes, como no caso da presença de luz (foto estabilidade) e em ambientes de refrigeração e de aquecimento (termo estabilidade).

Para estes estudos foram analisadas todas as componentes que foram apresentadas anteriormente, pelos devidos testes referidos (Cor, FRAP, DPPH, Folin, carotenóides totais e antocianinas totais).

### 2.4.1 Foto estabilidade

As antocianinas, presentes maioritariamente na *Centaurea*, têm uma certa dificuldade em ser utilizadas devido à sua baixa estabilidade na presença de luz (Bailoni, *et al.* 1998).

O estudo da foto estabilidade, ou da resistência dos corantes à luz, tem como objetivo avaliar em que condições, na presença/ausência de luz, um corante pode ser preservado, sem que a sua cor seja modificada. Estes ensaios de foto-resistência servem para avaliar os alimentos e os processos tecnológicos em que os corantes em estudo

possam ser adicionados sem que haja alteração da cor. Por exemplo, estabelecer o tempo em que um corante, após adicionado a um alimento, possa estar exposto à luz numa vitrina, ou o tempo em que esse corante possa estar no escuro, sem originar a alteração de cor que correspondem a modificações nas estruturas moleculares dos compostos constituintes dos corantes.

Para a realização deste estudo foram preparados extratos dos corantes a partir do resíduo do material vegetal extraído anteriormente e solubilizados em determinados solventes, tendo sido colocados em tubos de ensaio, hermeticamente fechados, para evitar oxidação devido ao oxigénio atmosférico. De seguida os tubos foram sujeitos a diferentes condições de luz e temperatura:

- 10 tubos com iluminação constante, numa estufa, à temperatura de 25 °C;
- 10 tubos foram colocados no escuro à temperatura ambiente.

Para a realização dos testes referidos anteriormente (cor, FRAP, DPPH, Folin, carotenóides totais, antocianinas totais), foram retirados 2 tubos de ensaio, semanalmente. Posteriormente um dos tubos foi congelado a uma temperatura de -18 °C, e o outro posto de novo nas condições em que se encontrava. O tempo deste estudo para a centáurea foi de 30 dias, tendo-se escolhido como dias de análises os dias 7, 14, 21, 24 e 30, enquanto que para a calêndula foi necessário um tempo superior de 55 dias, sendo os dias de análise os dias 7, 14, 21, 24, 30, 40, 47 e 55.

Relativamente às amostras da centáurea a um pH 3, não foi possível obter resultados, visto estas terem desenvolvido fungos durante a sua primeira semana.

#### **2.4.2 Estabilidade térmica**

O estudo da resistência dos corantes ao calor, ou da termo estabilidade, tem como objetivo avaliar a temperatura a partir da qual um corante pode manter a cor, sem se alterar. A maioria dos processos de produção, controlo e armazenamento de produtos alimentícios recorrem a diferentes temperaturas (altas e baixas) para aumentar a eficácia dos processos. Temos como exemplos a esterilização, a refrigeração, a cozedura, etc. Os ensaios de termo-resistência têm como objetivo avaliar os corantes em ambientes de frio (refrigeração) ou ambientes quentes (processamento a altas temperaturas).

#### **2.4.2.1 A temperaturas de refrigeração**

Para o estudo da termo estabilidade a temperaturas de refrigeração, seguiu-se o mesmo método como para o estudo da foto estabilidade. Portanto, foram sempre retirados 2 tubos para análises, seguindo o mesmo esquema de dias anteriormente descrito (7, 14, 21, 24, 30 para a centáurea; 7,14, 21, 24, 30, 40, 47, 55 para a calêndula). Os tubos encontravam-se armazenados num frigorífico, a uma temperatura constante de 4 °C e em condições de ausência de luz (escuro).

Neste estudo já foi possível obter resultados para a extração da centáurea a um pH 3, visto que as condições de temperatura não possibilitaram o desenvolvimento de bolores.

#### **2.4.2.2 A temperatura ambiente e superiores**

Para a realização deste estudo foram preparados extratos dos corantes a partir do resíduo do material vegetal extraído anteriormente e solubilizados em determinados solventes. O resíduo da calêndula foi solubilizado em etanol, uma vez que os carotenóides não são hidrosolúveis, enquanto o resíduo da centáurea foi solubilizado em água. Posteriormente foram colocados em tubos de ensaio, hermeticamente fechados, para evitar oxidação devido ao oxigénio atmosférico. De seguida os tubos foram sujeitos a diferentes condições de temperatura. Num banho-maria, colocaram-se 18 tubos, tendo-se resultados em triplicado. De seguida, retirou-se 3 tubos a cada 10 minutos, até se perfazer 1 hora de tratamento. As temperaturas escolhidas para este estudo foram os 20, 40, 60, 80 e 100 °C.

Os tubos de ensaio com os extratos da calêndula não ultrapassam a temperatura de 80 °C, uma vez que o etanol apresenta um ponto de ebulição de 78 °C.

## IV. Resultados e discussão

### Preparação da amostra

O rendimento do processo de fabrico é um dos pontos mais importantes que orientam o operador durante o procedimento experimental, visto este ter um peso fundamental no cálculo do custo do produto e na rentabilidade de um determinado processo de fabrico. Por esta razão, os fatores que afetam o rendimento devem ser conhecidos, para avaliar as variações que possam ocorrer. Discutem-se de seguida alguns dos pontos que podem afetar o rendimento do processo de fabrico. Houve duas etapas preparatórias iniciais, nas quais ocorreram algumas perdas de matéria-prima. A separação das pétalas das sépalas e outros resíduos presentes demonstrou a maior perda.

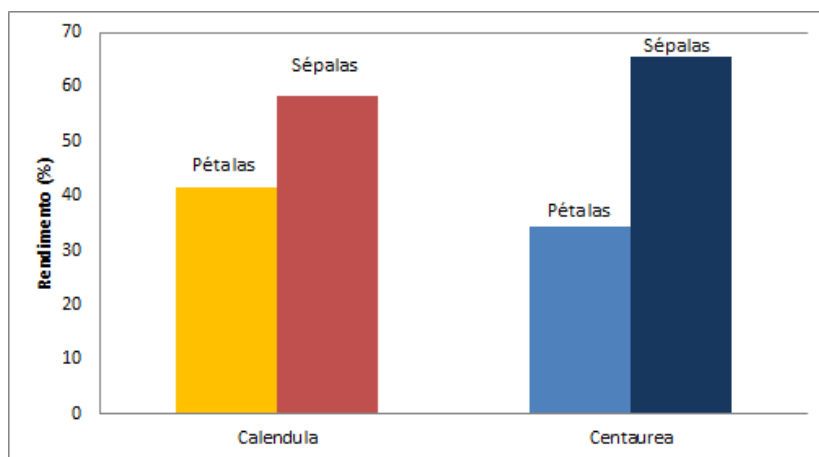
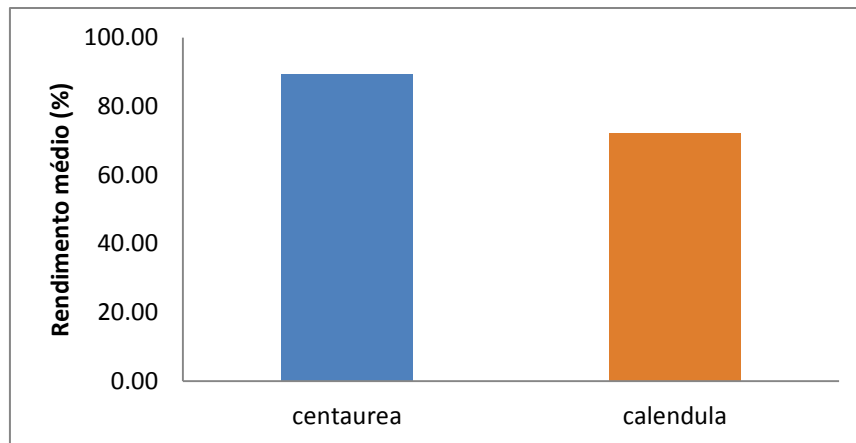


Figura 13.- Rendimentos da morfologia de ambas as plantas

Na figura 13 pode verificar-se que, em ambas as plantas, as pétalas não representam a maioria da planta. Enquanto que na calêndula cerca de 42% ( $\pm 1,43$ ) da florescência da planta são pétalas, na centáurea são aproximadamente 35% ( $\pm 4,21$ ).

A segunda perda de matéria-prima diz respeito à moagem. Esta etapa teve um rendimento bastante maior que a anterior, visto que neste processo foi utilizado equipamento próprio, e não simples mão de obra, como também pelo facto de, nesta etapa, toda a matéria ter sido utilizada.



**Figura 14.-** Rendimento da moagem das pétalas de ambas as plantas *Calendula officinalis* e *Centaurea cyanus*

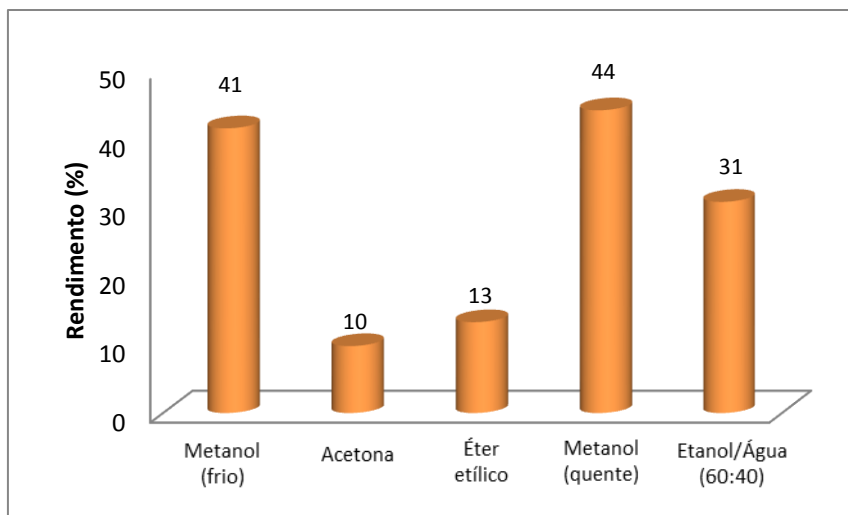
Como é visível na figura 14, a calêndula obteve um rendimento médio aproximado de 72%, enquanto que para a centáurea este rendimento foi de 89%, aproximadamente. Como a centáurea tem pétalas de tamanho inferior que a calêndula, estas foram mais fáceis de reduzir o tamanho.

### **Otimização do processo de extração**

Para a otimização do processo de extração foram realizados diversos ensaios com diferentes solventes de extração, tendo sido feitas análises posteriores ao rendimento da extração, à cor, à capacidade antioxidante (FRAP), ao teor de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e aos teores de carotenóides totais e antocianinas totais, dependendo da planta em estudo. Para uma melhor organização, os resultados vão ser apresentados em separado, sendo os primeiros relativos à calêndula, e posteriormente serão apresentados os da centáurea.

#### **Calêndula**

Para a calêndula foram realizados 5 métodos de extração diferentes, como foi representado anteriormente. Para analisar em qual dos métodos houve um rendimento maior, pesaram-se os resíduos dos extratos, após evaporação do solvente.

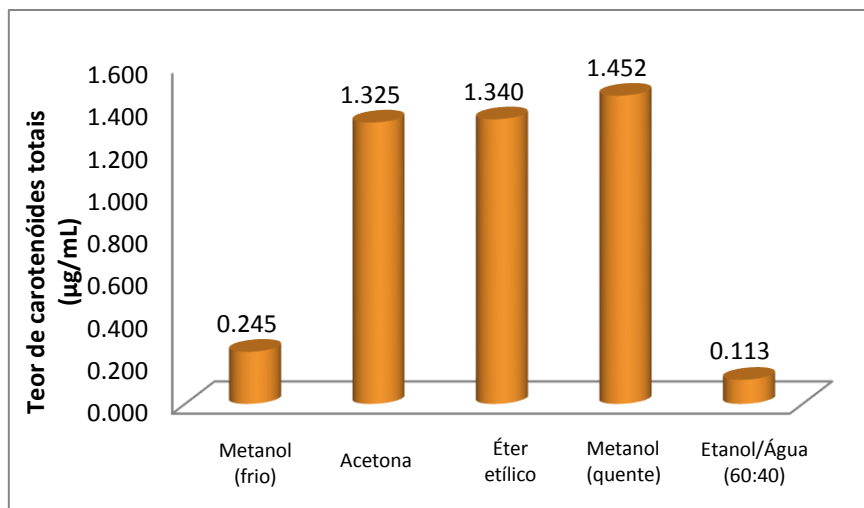


**Figura 15.-** Rendimento das diferentes extrações realizadas tendo como matéria vegetal a calêndula

Através dos resultados obtidos (Figura 15), verificou-se que as extrações com metanol foram as que proporcionaram a obtenção de um maior rendimento, e que, entre estas, a extração onde houve um aumento de temperatura, através de um aquecimento em banho maria, teve um rendimento ligeiramente superior (aproximadamente 41% para a extração a frio, e 44% para a extração a quente).

Na indústria alimentar nem todos os reagentes podem ser utilizados, pois podem pôr em causa a saúde humana. Por essa razão, utilizou-se a água ou o etanol como reagentes de solubilização, para a realização das posteriores análises, uma vez que são reagentes universalmente admissíveis. Para a calêndula, visto os compostos carotenóides serem lipossolúveis, utilizou-se o etanol como solvente de solubilização.

A primeira determinação analítica realizada, após a extração dos corantes foi o teor de carotenóides totais. Dos vários processos de extração houve três que sobressaíram, a extração na qual se utilizou acetona como reagente, a extração por separação de fases e a extração de metanol a quente. Estas extrações obtiveram resultados próximos, 1.325, 1.340 e 1.452  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de amostra, respetivamente, enquanto que para as restantes extrações obtiveram-se valores inferiores a 0.250 micro-gramas por mililitro ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de amostra (Figura 16; Tabela 12, Anexo I).

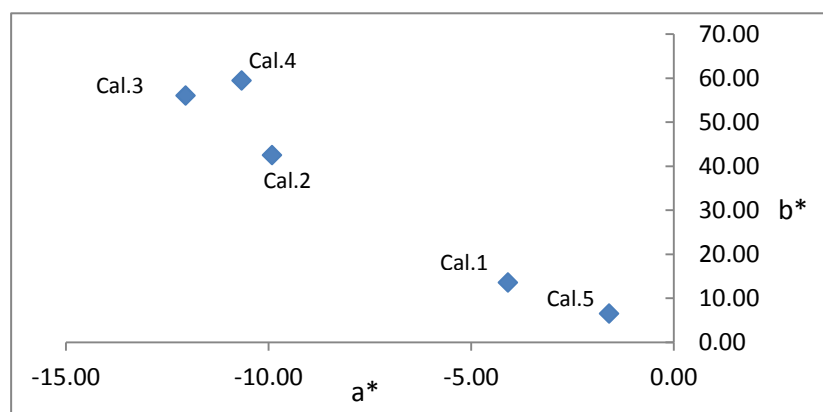


**Figura 16.-** Teor de carotenóides totais de extractos de *Calendula*

Quanto à determinação da cor, visualmente todas as extrações obtiveram uma cor laranja. No entanto, quando solubilizadas, a solução adquiriu uma cor amarelo-dourado, com valores de L a\* b\* ligeiramente diferenciados. A luminosidade não sofreu grandes variações de extração em extração, ao contrario dos parâmetros a\* e b\* (Tabela 3, Figura 17). As extrações onde se obteve um maior teor de carotenóides totais são aquelas que se afastaram mais da zona cinzenta, segundo os valores dos parâmetros a\* e b\* da cor, notando-se assim uma correlação destes dois aspetos.

**Tabela 3.-** Parâmetros a\* e b\* da cor de diferentes extratos de calêndula: Cal.1- Metanol a frio; Cal.2- Acetona; Cal.3- Éter etílico; Cal.4- Metanol a quente; Cal.5- Etanol/Água (60:40)

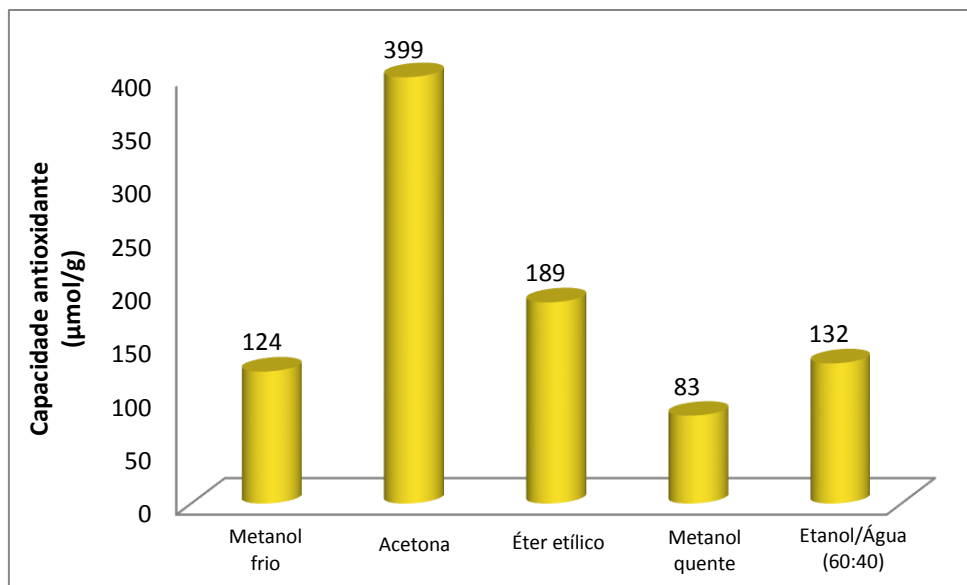
	L	a*	b*
Cal.1	99.15	-4.09	13.54
Cal.2	97.74	-9.91	42.52
Cal.3	97.15	-12.04	55.99
Cal.4	96.32	-10.66	59.42
Cal.5	98.26	-1.59	6.48



**Figura 17.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* da cor de diferentes extratos de calêndula: Cal.1- Metanol a frio; Cal.2- Acetona; Cal.3- Éter etílico; Cal.4- Metanol a quente; Cal.5- Etanol/Água (60:40)

Para se determinar a capacidade antioxidante, nesta fase do trabalho, realizou-se apenas o teste de redução do íon ferro (FRAP), por ser um teste mais rápido e oferecer uma resposta rápida, do que a determinação da capacidade antioxidante através da captação dos radicais livres (DPPH).

Nos resultados obtidos da capacidade antioxidante (Figura 18; Tabela 13, Anexo I), obtiveram-se valores diferenciados para os diferentes solventes de extração usados, sobressaindo-se a extração na qual foi utilizada acetona como solvente, com um resultado máximo de aproximadamente  $400 \mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$  de substrato seco. Para as restantes extrações verificou-se uma maior aproximação dos valores, sendo que a que obteve piores resultados, com valores próximos das  $80 \mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$  de substrato seco, foi a extração com metanol a quente. Não se observou a mesma tendência para os valores obtidos para a capacidade antioxidante e o teor de carotenóides totais, para os diferentes extratos. Uma explicação para estes resultados pode ser o facto de que, ao se ter utilizado a extração com acetona foi possível extrair-se outros compostos, que por sua vez também têm uma componente antioxidante, aumentando assim a capacidade antioxidante.



**Figura 18.-** Capacidade antioxidante das diferentes extrações, tendo como matéria prima pétalas de *Calendula officinalis*

Relativamente à determinação do teor de compostos fenólicos totais, verificou-se que a extração onde se obteve melhores resultados foi onde se utilizou como solvente de extração o metanol a quente, com um teor médio de  $3.17 \text{ mg.g}^{-1}$  de extrato seco, em comparação com as restantes extrações, que por sua vez se encontraram com valores muito próximos, a rondar os  $2.90 \text{ mg.g}^{-1}$  de extrato seco, exceptuando a extração de etanol:água, que obteve os piores resultados,  $0.95 \text{ mg.g}^{-1}$  de extrato seco (Figura 19; Tabela 13, Anexo I). Pode-se concluir que, exceptuando a extração em que foi utilizado como solvente etanol:água (60:40), não existe uma diferença grande em termos de compostos fenólicos extraídos nas diferentes extrações. No entanto, a melhor opção seria utilizar metanol com aquecimento como solvente de extração.

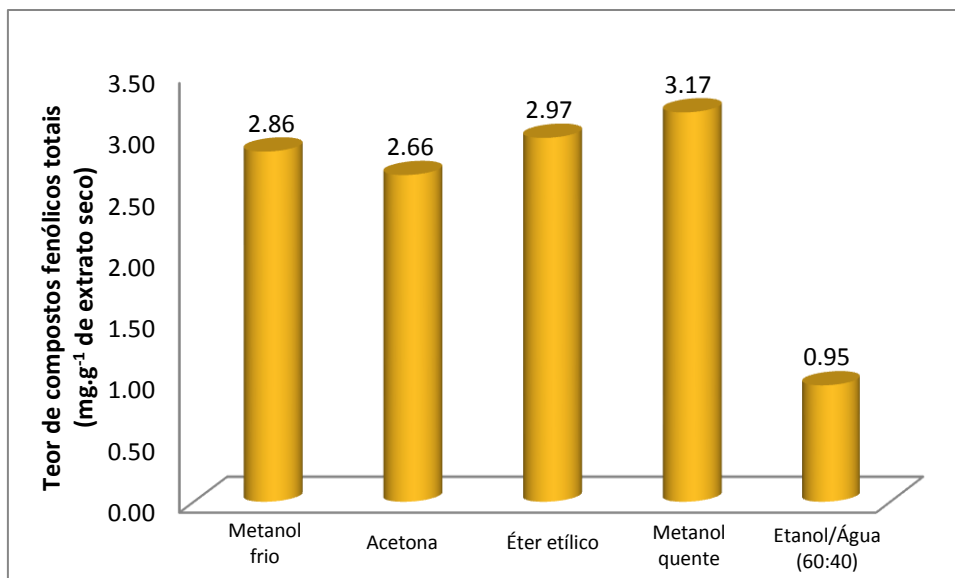


Figura 19.- Teor de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos de calêndula

## Centáurea

Para a centáurea foram realizadas 9 extrações diferentes, nas quais se fez variar o solvente de extração em função do pH. O método de determinação do rendimento foi o mesmo que para a calêndula.

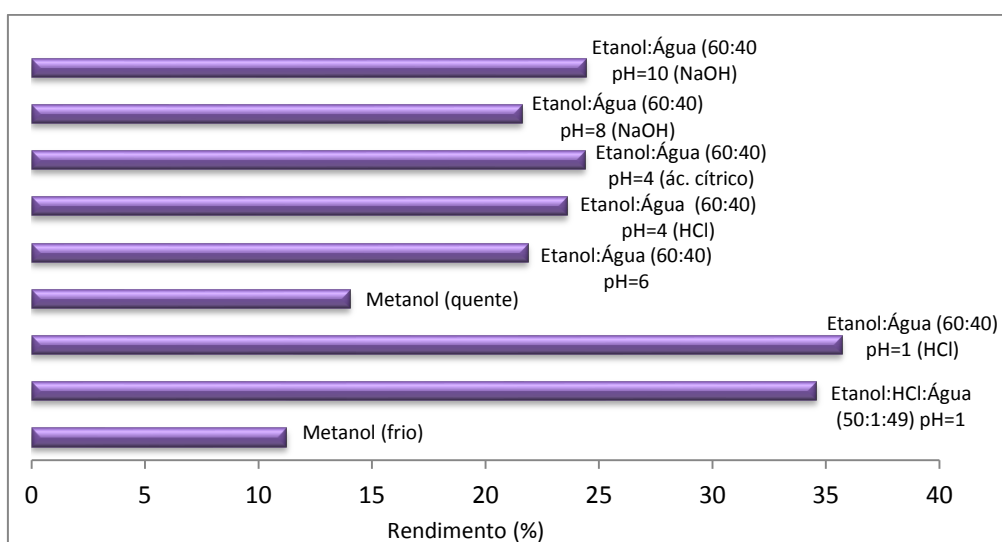


Figura 20.- Rendimentos médios das diferentes extrações da centáurea

As extrações com um maior rendimento foram as que apresentavam o menor valor de pH. Os solventes utilizados, etanol:água acidificada com HCl (60:40) e etanol:HCl:água (50:1:49), tinham ambos o pH=1, e o rendimento obtido foi cerca de 35% (Figura 20). Relativamente às restantes extrações, obteve-se um rendimento entre 22-24%, com exceção para o metanol, onde o rendimento foi inferior a 15%. Como na composição da centaurea existe uma grande quantidade de antocianinas, e estas por sua vez são hidrosolúveis, os rendimentos são mais elevados nas extrações onde foi incorporado água. Verificamos também que o pH tem influência na extração, visto que valores inferiores de pH apresentaram um rendimento superior.

Dado que o metanol apresentou um rendimento de extração bastante inferior à dos solventes acima referidos e como este solvente apresenta limitações para ser utilizado na indústria alimentar, não se prosseguiu com estes extratos nas determinações das antocianinas totais, cor, capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais.

Para realizar os ensaios quantitativos referidos, os resíduos obtidos a partir da centáurea com os diferentes solventes, foram solubilizados em água, devido ao carácter hidrosolúvel das antocianinas.

Os melhores resultados obtidos (Figura 21; Tabela 14, Anexo I) para os teores de antocianinas totais, foram obtidos com os solventes onde o pH=1, tendo apresentado teores de 6,8 e 7,5 mg.L<sup>-1</sup> para a extração com etanol:HCl:água (50:1:49) e etanol:água acidificada (60:40), respetivamente. As restantes extrações tiveram teores ligeiramente inferiores com valores médios de 5 mg.L<sup>-1</sup> de amostra.

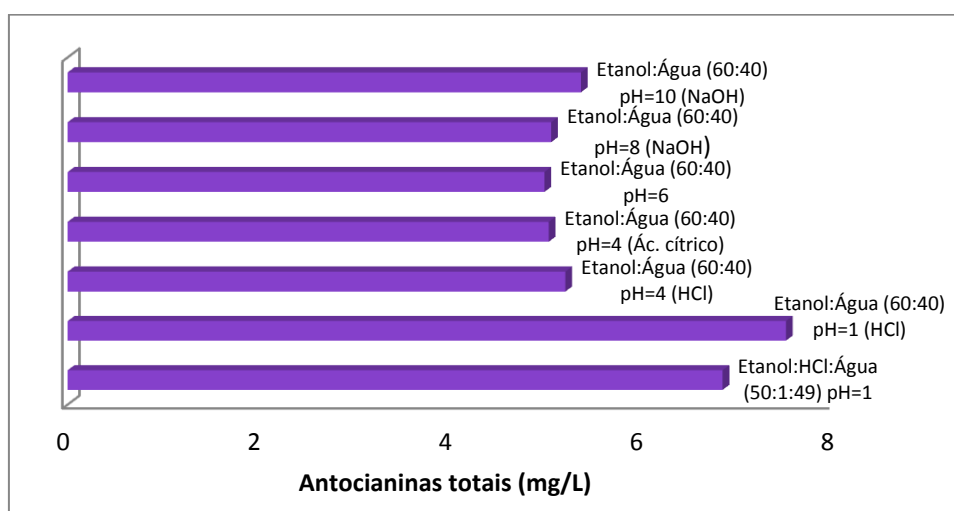
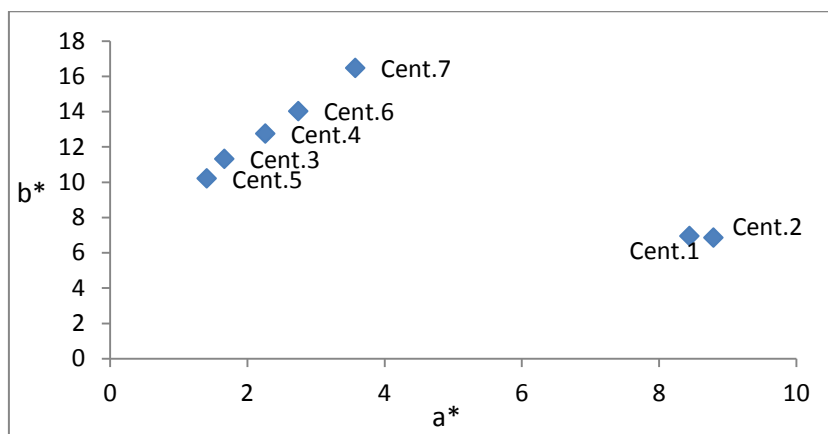


Figura 21.- Teor de antocianinas totais nas diferentes extrações da centáurea

Quanto à cor, esta foi variando de extração em extração, passando por tons mais avermelhados, a pH's baixos, até tons mais roxos a pH's mais altos (em estado sólido). Quanto á solução dos extratos, a cor apresentava tons cor de rosa claros a pH's baixos (pH 1), e ao longo que estes níveis aumentavam, a cor passava a um castanho-acizentado (Tabela 4, Figura 22).

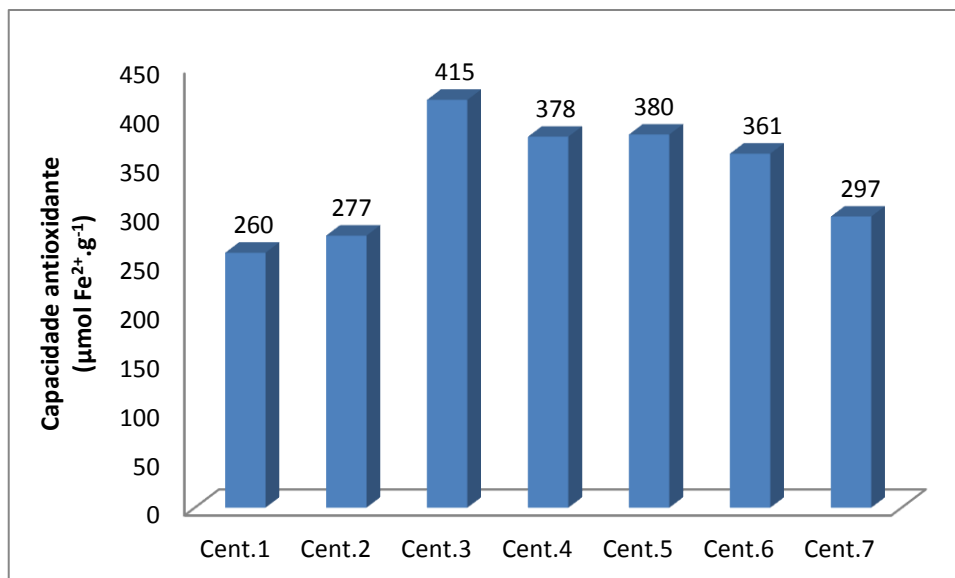
**Tabela 4.-** Parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  da cor de diferentes extratos de centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH)

	L	$a^*$	$b^*$
Cent. 1	80.96	8.44	6.93
Cent. 2	83.20	8.80	6.85
Cent. 3	87.75	1.67	11.32
Cent. 4	77.17	2.26	12.74
Cent. 5	85.28	1.41	10.20
Cent. 6	71.24	2.74	14.02
Cent. 7	61.78	3.58	16.45



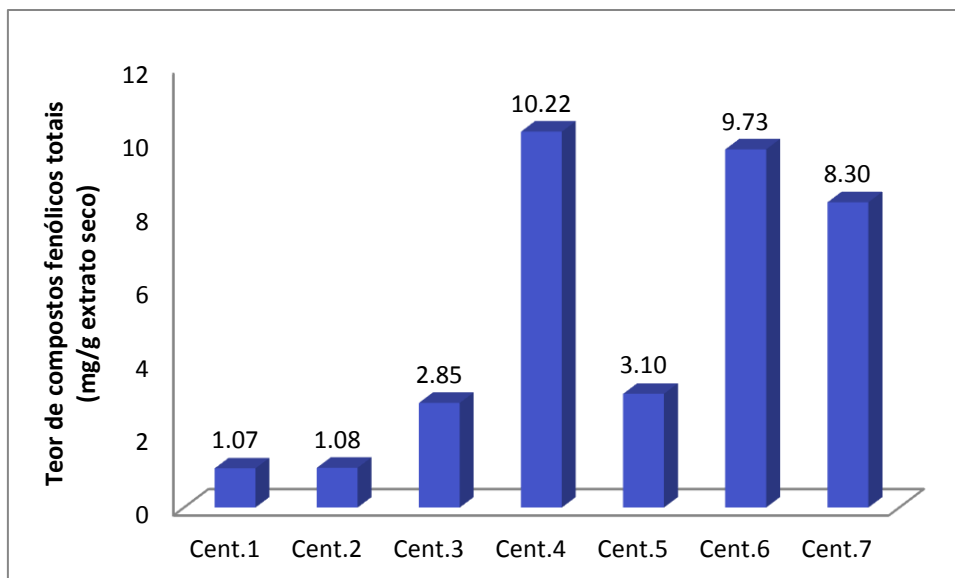
**Figura 22.-** Exposição gráfica dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  da cor de diferentes extratos de centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH)

Os resultados da capacidade antioxidante foram obtidos para o extrato onde foi utilizado como solvente etanol:água (60:40) a pH 6. Houve resultados ligeiramente inferiores nas extrações com solventes a pH's 4 e 8, e ainda mais inferiores a pH's 1 e 10 (Figura 23; Tabela 15, Anexo I). É de notar que a capacidade antioxidante é superior em extratos em que o pH tomava valores próximos de 7, ou seja, soluções neutras, havendo uma dispersão praticamente linear independentemente se o meio é ácido ou básico.



**Figura 23.-** Capacidade antioxidante dos diferentes extratos da centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH)

Relativamente ao teor de compostos fenólicos totais (Figura 24; Tabela 15, Anexo I), houve um comportamento muito diferente do esperado. Pode-se verificar pela figura que quanto menor for o valor de pH, menor vai ser o teor de compostos fenólicos totais, e à medida que o valor de pH aumenta, a mesma tendência se pode observar no teor de compostos fenólicos totais. O extrato **cent.4** obteve um resultado bastante elevado, em comparação com as restantes, o que foge ao comportamento mencionado anteriormente. Isto pode dever-se à presença de alguns compostos que foram extraídos pelo facto de ter sido utilizado um ácido orgânico (ácido cítrico), ou porque este ácido reage com o ácido gálico, aumentando assim o teor dos compostos fenólicos. Tirando este facto, conclui-se que o pH tem uma forte influência na extração de compostos fenólicos.



**Figura 24.-** Teor de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos da centaurea: Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3- Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7- Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH)

## Estudo da foto estabilidade

Neste estudo vai ser analisada a influência da luz relativamente à estabilidade dos extratos obtidos. Para isso, selecionou-se, nos ensaios anteriores, o solvente que proporcionou o melhor rendimento, tendo sido utilizado para obter um extrato, que após evaporação do solvente, permitiu a obtenção de um resíduo que foi utilizado nas diferentes fases delineadas do estudo de foto estabilidade.

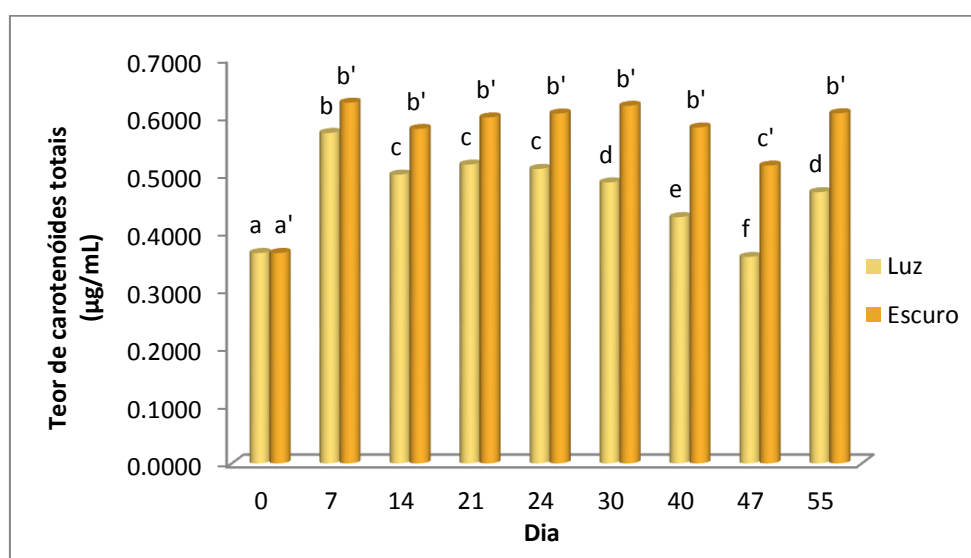
O resíduo foi solubilizado num determinado solvente, de modo a obter 30 tubos de ensaio, que foram repartidos pelas diferentes condições do estudo (escuro, luz do dia, temperaturas). Os 30 tubos foram mantidos simultaneamente, nas condições a testar, durante 30 dias, tendo sido retirados dois tubos, por semana, a que constituiram a amostra a analisar.

Os parâmetros analisados foram o teor de antocianinas totais e de carotenóides totais, a cor, a capacidade antioxidante (pelo método do FRAP e DPPH) e o teor de compostos fenólicos totais. Os primeiros três parâmetros foram realizados nos vários dias em que se retirou a amostra, enquanto que os restantes apenas foram analisados no primeiro e no último dia do estudo.

## Calêndula

Para a calendula a extração ótima que foi selecionada foi a de metanol a quente. A escolha deste solvente deveu-se à obtenção do melhor rendimento, maior teor de carotenóides e simplicidade de execução da extração.

O teor de carotenóides totais, de uma forma geral, diminui ao longo do tempo, no entanto, estas perdas que ocorrem são muito maiores quando existe a presença de uma fonte de luz do que na sua ausência.



**Figura 25.-** Evolução do teor de carotenóides de extratos de calêndula na presença e ausência de luz, ao longo do tempo

Pela análise da Figura 25 (Tabelas 16 e 18, Anexo II), verifica-se que o teor de carotenóides variou significativamente ( $p < 0,05$ ) nos primeiros 7 dias de conservação ao abrigo da luz, tendo-se mantido constante no restante tempo de análise, 55 dias. Para as amostras que se encontravam na presença de luz, verifica-se que o teor de carotenóides varia mais ao longo do tempo. Nos primeiros 14 dias ocorre uma variação significativa ( $p < 0,05$ ), havendo um posterior equilíbrio até ao 30º dia, a partir do qual foi sempre verificado uma variação significativa no restante tempo de análise. O acréscimo verificado no início do período de análise deverá ser confirmado, pois não era espetável. Este aumento pode dever-se a efeitos de concentração do solvente, o mesmo podendo ter ocorrido no acréscimo final, em condições de presença de luz. Pelo exposto pode concluir-se que estes carotenóides são estáveis quando mantidos ao abrigo da luz.

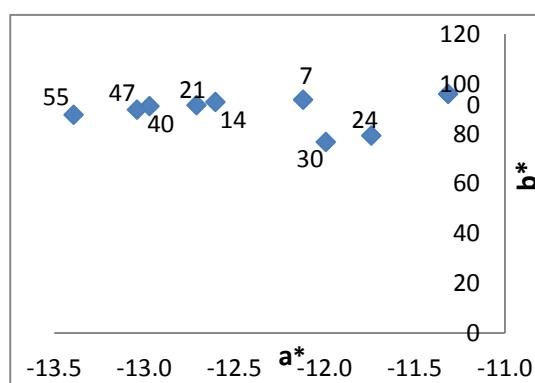
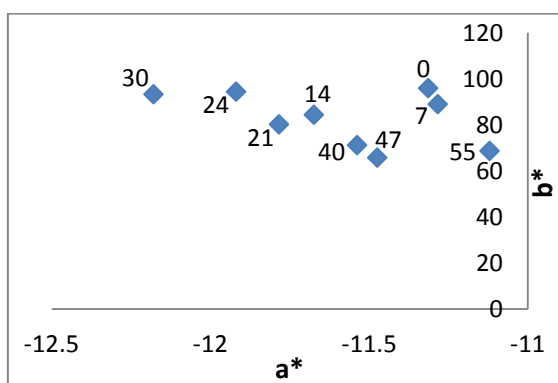
Quanto à cor, no caso das amostras que não ficaram ao abrigo da luz, notou-se uma ligeira descoloração, ficando as amostras com um tom mais amarelo claro, em vez de amarelo. No entanto, nas condições de ausência de luz, não foi verificada alguma modificação da cor. Relativamente aos valores dos parâmetros L a\* b\*, houve um pequeno aumento do L (luminosidade) ao longo do tempo, enquanto que para os parâmetros a\* e b\* houve comportamentos diferentes. O a\* varia de forma aleatória entre os valores -12 e -11, não se registando alguma explicação significativa, e o b\* de uma forma geral, diminui ao longo do tempo, sendo estas descidas mais acentuadas nas soluções que não estavam ao abrigo da luz (Tabelas 5 e 6, Figura 26).

**Tabela 6.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da calêndula, na presença de uma fonte luminosa

Luz	L	a	b
0	94.15	-11.31	95.92
7	94.68	-11.28	88.91
14	95.17	-11.67	84.33
21	95.32	-11.78	80.25
24	94.46	-11.92	94.34
30	94.65	-12.18	93.29
40	95.68	-11.54	71.19
47	96.16	-11.47	65.76
55	96.04	-11.12	68.69

**Tabela 5.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da calêndula, na ausência de uma fonte luminosa

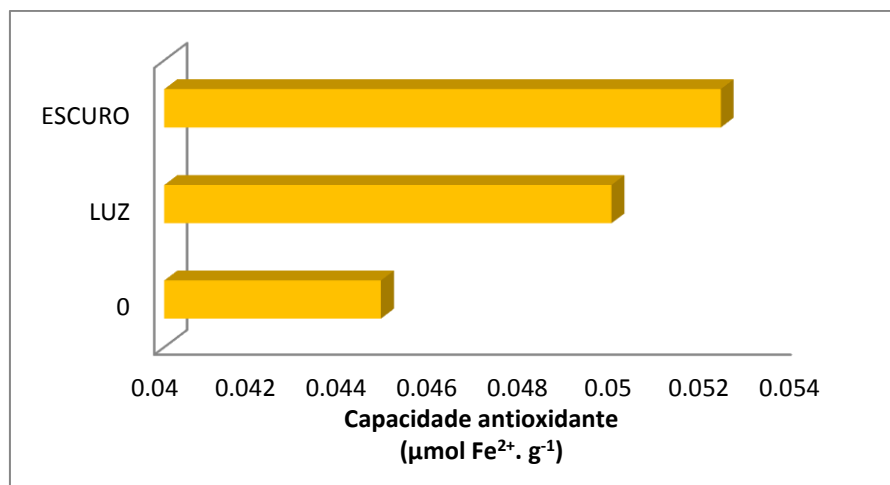
Escuro	L	a	b
0	94.15	-11.31	95.92
7	94.41	-12.12	93.62
14	94.80	-12.60	92.77
21	94.91	-12.71	91.43
24	95.28	-11.74	79.21
30	95.58	-11.99	76.62
40	95.04	-12.97	91.02
47	94.87	-13.04	89.60
55	95.22	-13.39	87.62



**Figura 26.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* das amostras da calêndula, durante o ensaio da foto estabilidade, com presença de luz (esquerda) e na sua ausência (direita)

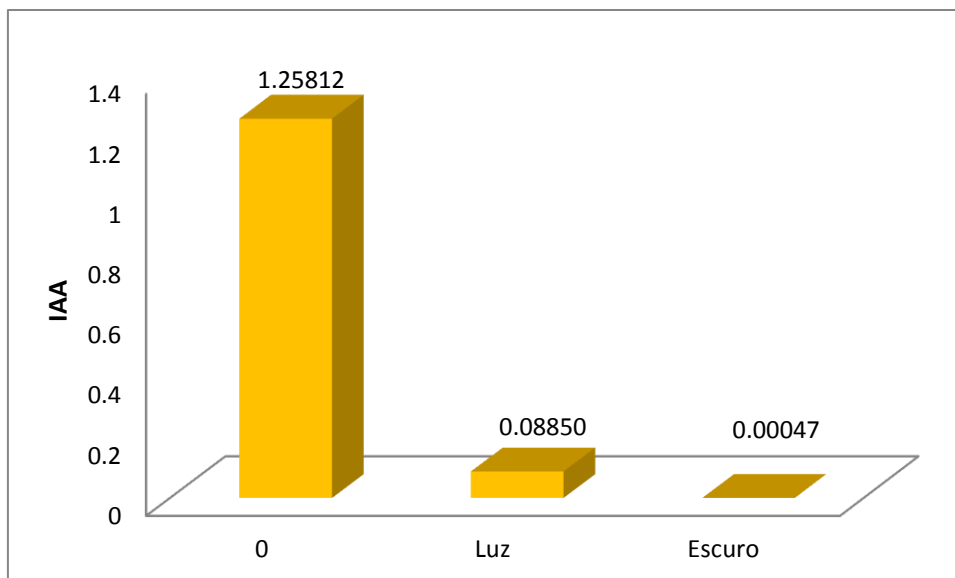
A capacidade antioxidante, obtida através do método de redução do ião ferro (FRAP), sofreu também um acréscimo durante este estudo. Este aumento está relacionado com o acréscimo verificado no teor de carotenóides totais, havendo uma direta ligação entre estes dois parâmetros. Apesar deste ponto, é de se verificar que a luz tem uma influência na

capacidade antioxidante, sendo que as amostras que foram mantidas ao abrigo da luz obtiveram resultados melhores (Figura 27; Tabelas 17 e 19, Anexo II).



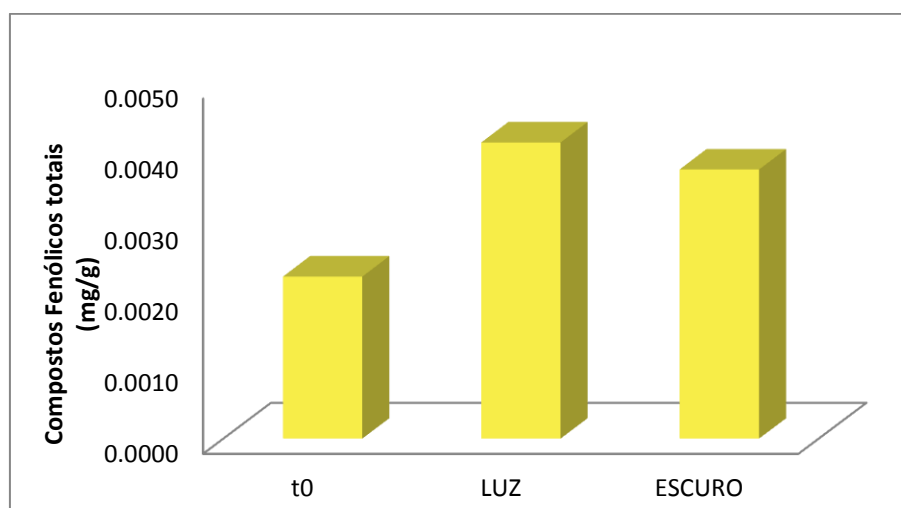
**Figura 27.-** Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz, pelo método FRAP

Quanto aos resultados obtidos da capacidade antioxidante, obtida através do método do DPPH, mostram diferenças significativas relativamente à capacidade antioxidante obtida pelo método de redução do íon ferro (FRAP). Não se verificou o acréscimo que foi registado nas avaliações anteriores e, quanto aos resultados em si, houve uma grande diferença entre o índice de actividade antioxidante inicial e os das diferentes condições após os 55 dias. Verificou-se também que, nas amostras que estiveram ao abrigo da luz, se ter obtido valores inferiores do que nas amostras que tiveram presente uma fonte luminosa (Figura 28).



**Figura 28.-** Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz, pelo método DPPH

Relativamente ao teor de compostos fenólicos totais, mais uma vez notou-se um acréscimo inicial, pelas mesmas razões que no teor de carotenóides. No entanto, ao contrário dos outros resultados, o decréscimo que ocorreu foi mais notado nas amostras que estiveram na ausência de luz, do que nas que estiveram na presença, com  $0.0038 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $0.0042 \text{ mg.g}^{-1}$  de extrato seco, respetivamente (Figura 29; Tabelas 17 e 19, Anexo II).



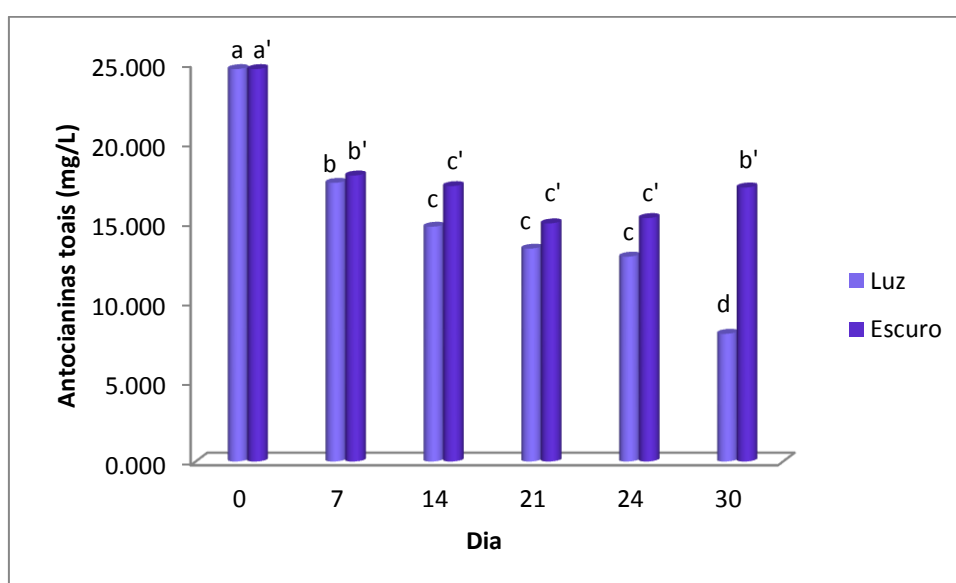
**Figura 29.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (55 dias) nos extratos de calêndula, na presença e ausência de luz

## Centáurea

Como o pH tem uma grande influência no teor de antocianinas extraídas, foram selecionadas duas extrações para os estudos posteriores. Nas duas extrações utilizou-se como solvente de extração etanol:água acidificada com HCl, uma a pH 1 e outra a pH 3. As extrações, com o valor de pH=1 apresentaram um rendimento superior, à com o valor de pH=3, como já foi referido anteriormente.

As amostras da solução a um pH 3 foram eliminadas, após uma semana posterior à iniciação deste estudo, devido ao facto de ter ocorrido o desenvolvimento de bolores nas mesmas. Serão apresentados assim, para este estudo, apenas os resultados da solução a um pH 1.

O teor de antocianinas totais para este estudo, demonstrou resultados que apontam para uma clara degradação destes compostos, quando as amostras se encontraram na presença de uma fonte luminosa. No gráfico (Figura 30; Tabelas 30 e 32, Anexo III) verificamos que as amostras sofreram um decréscimo de aproximadamente 25 mg.L<sup>-1</sup> da amostra inicial, até um valor final aproximado de 8 mg.L<sup>-1</sup>, para as amostras que se encontravam na presença de luz e 17 mg.L<sup>-1</sup> para as amostras que se encontravam no escuro. É ainda possível verificar que existe um certa degradação natural, durante a primeira semana e que em ambas as condições se verificou que a variação é igualmente significativa ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 30.-** Variação do teor de antocianinas totais da extração a pH 1, na presença e ausência de uma fonte luminosa, ao longo do tempo (30 dias)

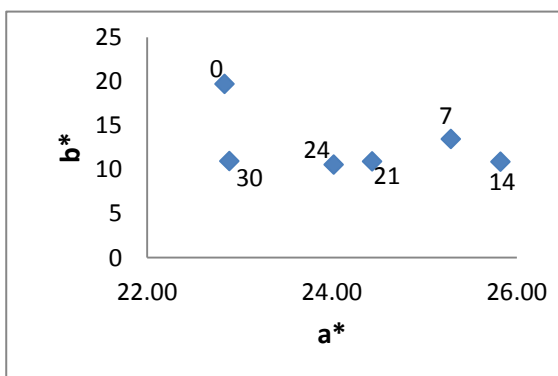
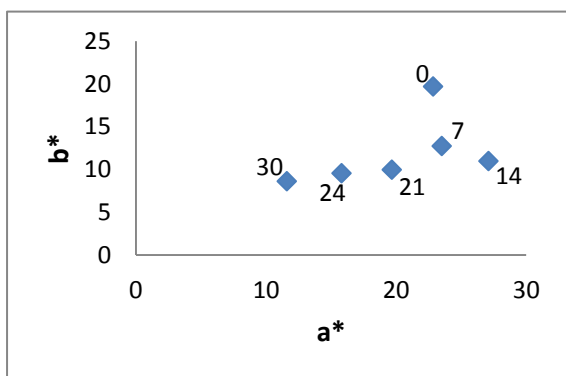
Quanto à cor, as amostras inicialmente apresentaram um tom mais escuro, mas com o decorrer do tempo evoluíram para tons mais claros. As amostras que estiveram sob a influência da luz, começaram a perder a cor, evoluindo de um rosa escuro, para um rosa mais claro, até ficarem incolores, enquanto que nas amostras que foram mantidas no escuro, notou-se um clareamento inicial, mas posteriormente a cor manteve-se bastante “equilibrada” (Tabelas 7 e 8). Pode verificar-se que o clareamento inicial é devido ao aumento do parâmetro **L** e da ligeira diminuição do **b\***. O parâmetro **a\*** sofreu um aumento inicial, nas primeiras 2 semanas (14 dias), seguindo-se uma diminuição, evidenciando a degradação da amostra. No caso das amostras que estiveram ao abrigo da luz o **a\*** voltou a tomar os valores iniciais, após os 30 dias, enquanto que nas amostras iluminadas o mesmo valor diminuiu para além do valor inicial (Figura 31).

**Tabela 8.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da centáurea a um pH 1, na presença de uma fonte luminosa

Luz	L	a*	b*
t0	61.82	22.84	19.70
t7	80.49	23.51	12.72
t14	85.07	27.11	10.97
t21	87.84	19.68	9.96
t24	89.61	15.81	9.55
t30	91.26	11.60	8.62

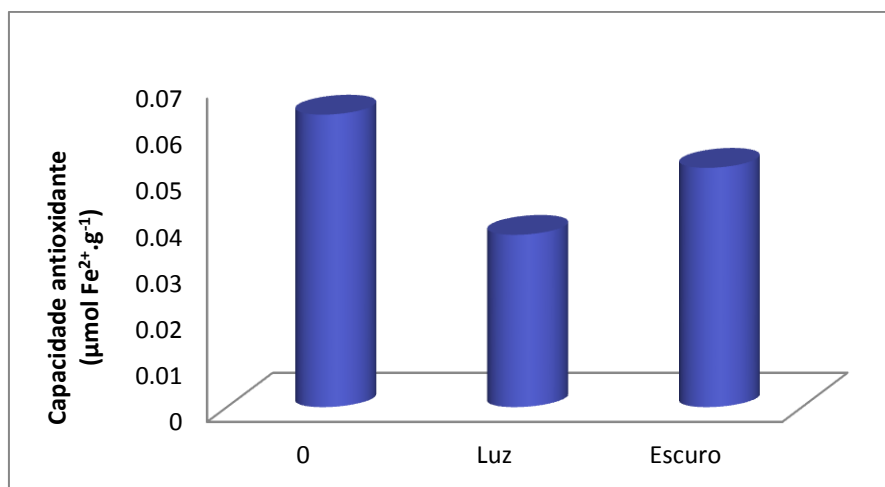
**Tabela 7.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da centáurea a um pH 1, na ausência de uma fonte luminosa

Escuro	L	a*	b*
t0	61.82	22.84	19.70
t7	80.35	25.29	13.45
t14	84.97	25.83	10.87
t21	84.95	24.44	10.93
t24	86.45	24.02	10.56
t30	86.32	22.89	10.96

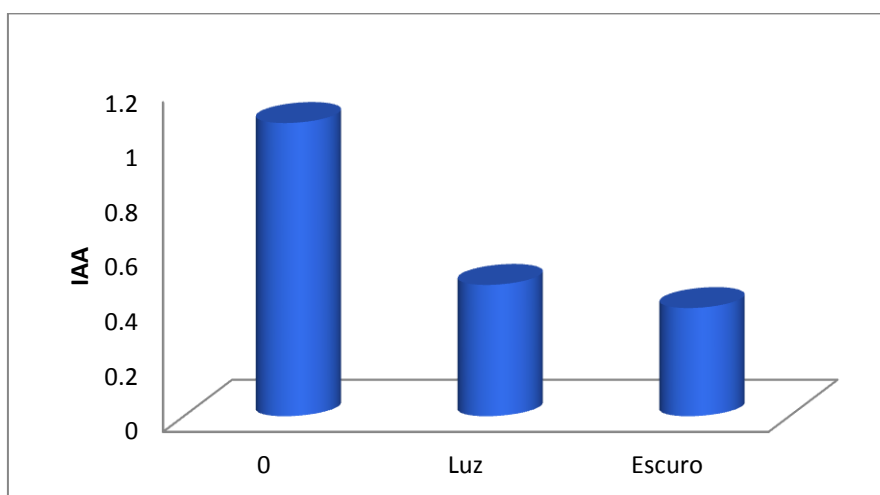


**Figura 31.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* das amostras da extração a pH 1 da centáurea, durante o ensaio da foto estabilidade

Quanto à capacidade antioxidante, observou-se a mesma tendência, do observado no teor de antocianinas totais, visto estes dois parâmetros estarem diretamente relacionados. Verificou-se uma diminuição dos valores de capacidade antioxidante determinado pelo método FRAP e DPPH. No entanto, a mesma tendência observada no ensaio de foto estabilidade na calêndula, foi também verificada na centáurea. As amostras que estiveram ao abrigo da luz, pelo método FRAP (Figura 32; Tabelas 31 e 33, Anexo III), sofreram uma menor degradação do que as que estiveram na presença de luz. No entanto, pelo método do DPPH (Figura 33; Tabelas 31 e 33, Anexo III), foi verificado o oposto.

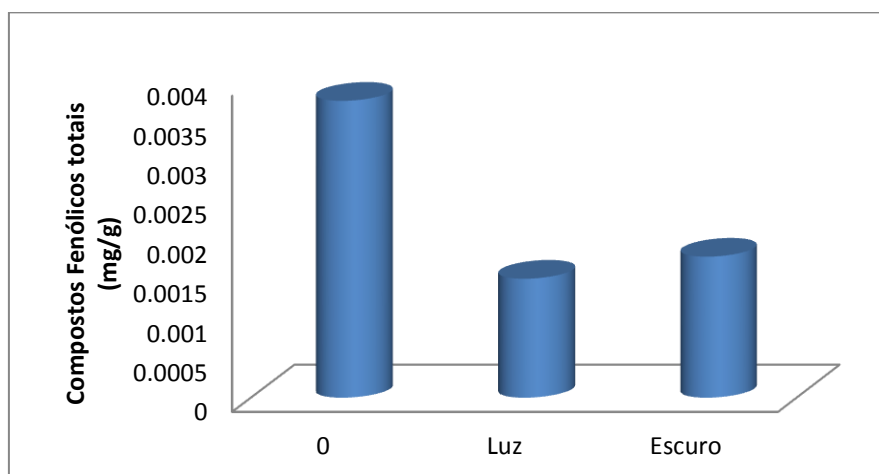


**Figura 32.-** Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centáurea na presença e ausência da luz, pelo método do FRAP



**Figura 33.-** Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centáurea na presença e ausência da luz, pelo método do DPPH

O teor de compostos fenólicos totais, apresentaram a mesma tendência do que os parâmetros anteriores, diminuindo ao longo deste estudo, tendo sido verificado uma maior diminuição nas amostras que se encontravam na presença da luz, em comparação às amostras que estiveram no escuro (Figura 34; Tabelas 31 e 33, Anexo III). Apesar de a diferença não ser grande,  $1.5 \times 10^{-3}$  e  $1.7 \times 10^{-3}$ , respetivamente, verifica-se que estes corantes se apresentam mais estáveis ao abrigo da luz.



**Figura 34.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centaurea na presença e ausência da luz

## Estudo da termo estabilidade

Tal como no estudo da foto estabilidade, escolheu-se para estes ensaios o solvente que proporcionou o melhor rendimento, no caso da calêndula optou-se pelo metanol com um aquecimento a temperatura de 65 °C em banho maria; e para a centáurea foram selecionados dois solventes, etanol:água acidificada com HCl (60:40) a pH=1 e a pH=3.

Também neste estudo foram analisados os diferentes parâmetros de avaliação: carotenóides totais, antocianinas totais, cor, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos, sendo que os primeiros três foram analisados a cada momento de tiragem de amostras, enquanto que os últimos três foram analisados apenas no início e no fim do estudo.

Primeiramente irá ser apresentado o estudo a temperaturas de refrigeração (4 °C), e seguidamente o estudo em que foram utilizadas temperaturas mais elevadas. Esta separação deve-se ao facto de que o primeiro estudo tem um método de execução igual ao

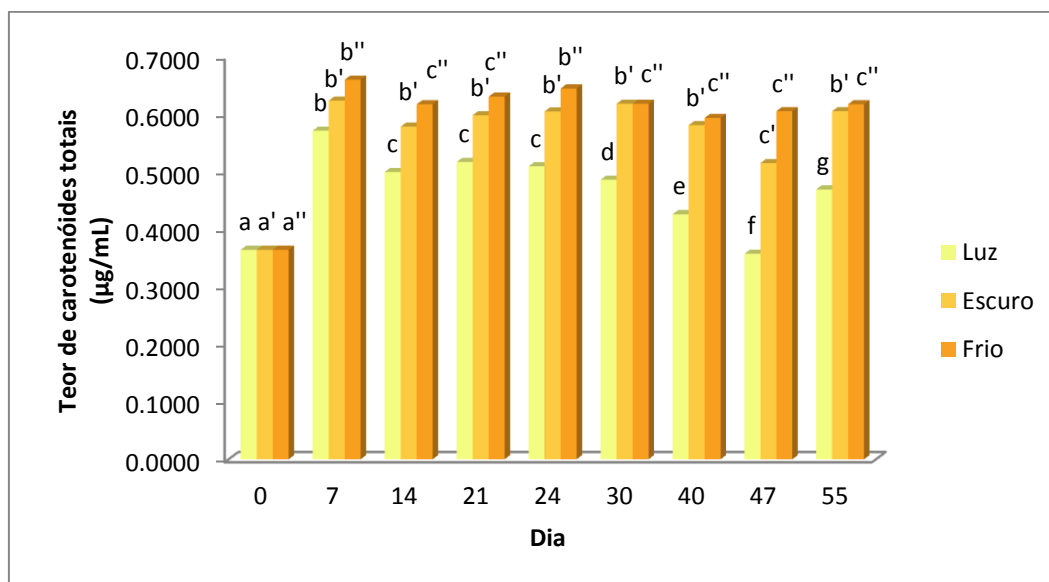
estudo da foto estabilidade, enquanto que o segundo tem um método próprio (ver materiais e métodos).

Sendo assim, os resultados do estudo com temperaturas de refrigeração será comparado com os resultados do estudo da foto estabilidade, para uma melhor visualização do efeito da temperatura.

## A temperatura de refrigeração

### Calêndula

O teor de carotenóides totais não sofreu grandes alterações no decorrer do estudo. Apresentando a mesma tendência que se verificou no estudo da foto estabilidade, também aqui houve um aumento inicial do teor após a primeira semana, mas posteriormente verificou-se um equilíbrio dos valores. Pode-se verificar ainda que, comparando as amostras que estiveram no frigorífico (4 °C), obtiveram resultados ligeiramente superiores, demonstrando que a temperaturas baixas existe uma maior estabilidade dos compostos em estudo (Figura 35; Tabela 20, Anexo II).

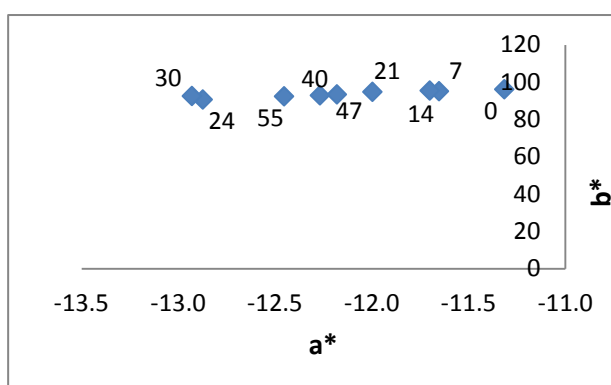


**Figura 35.-** Evolução do teor de carotenóides de extratos de calêndula na presença e ausência de luz e em câmara frigorífica, ao longo do tempo

A cor das amostras não sofreu alterações visuais, e os parâmetros L a\* b\* variaram da mesma forma: o L aumentou ligeiramente, enquanto que o a\* e b\* diminuíram ao longo do tempo, no entanto, as diferenças não foram significativas (Tabela 9, Figura 36).

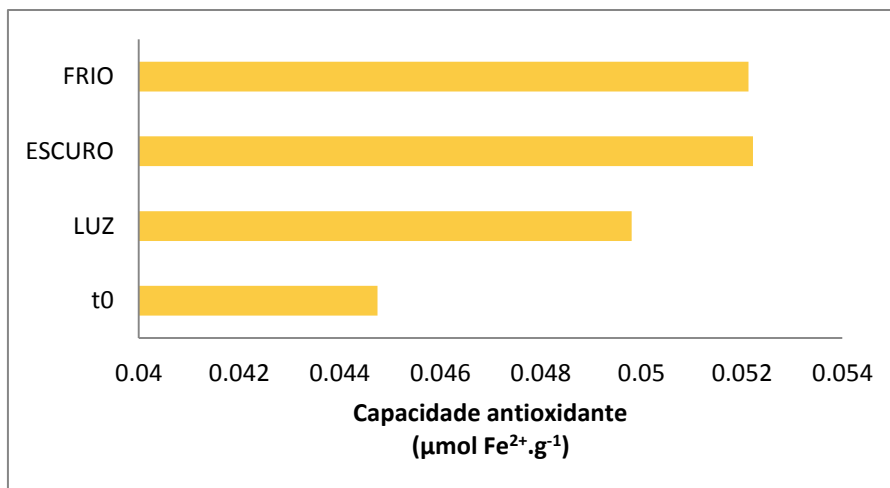
**Tabela 9.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da calêndula, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C)

Frio	L	a*	b*	
0	94.15	-11.31	95.92	
7	94.20	-11.65	95.04	
14	94.37	-11.70	95.24	
21	94.52	-12.00	94.61	
24	94.93	-12.87	90.49	
30	95.04	-12.93	92.33	
40	94.66	-12.18	93.29	
47	94.72	-12.27	92.80	
55	94.73	-12.45	92.16	



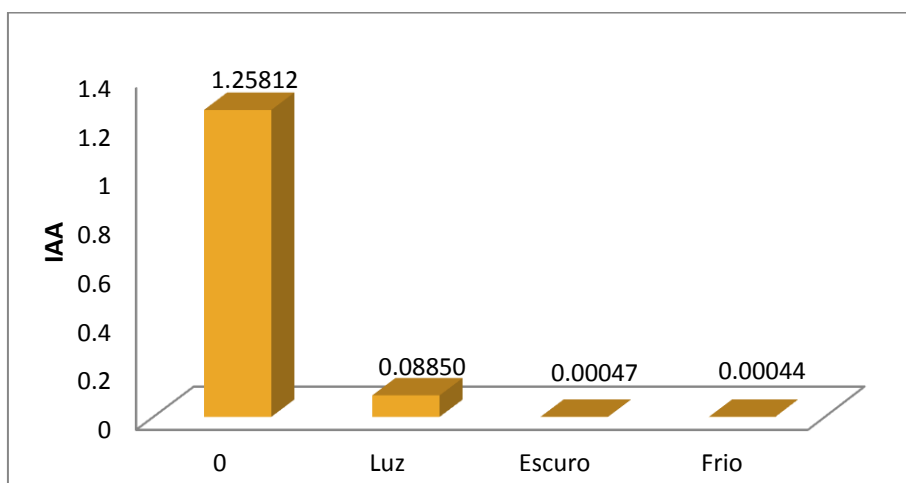
**Figura 36.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* das amostras da calêndula, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C)

A capacidade antioxidante obtida pelos métodos FRAP e DPPH, não apresentaram variações significativas. No caso do método FRAP, houve um aumento da capacidade antioxidante, em comparação com a inicial. Nos dois métodos para determinar a capacidade antioxidante observou-se a mesma tendência para as amostras que se encontram no escuro e as que foram armazenadas no frio, e este resultado foi ligeiramente superior às amostras iniciais (Figura 37; Tabela 21, Anexo II).



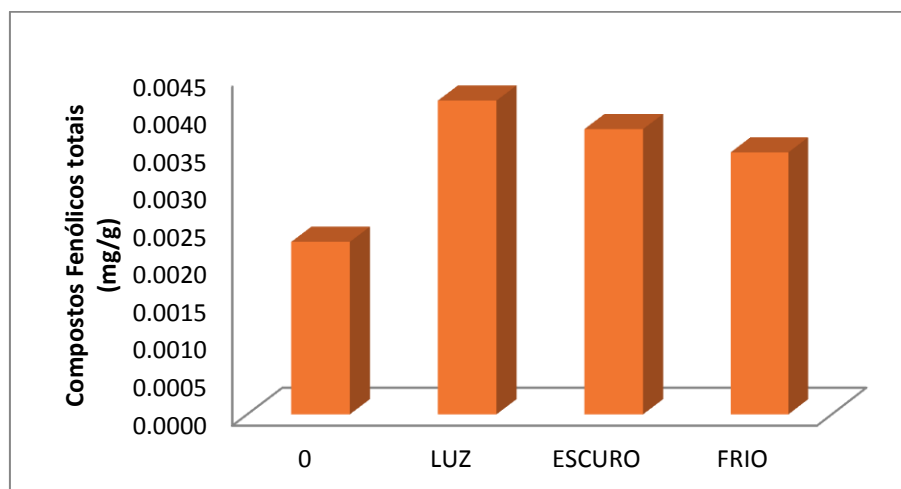
**Figura 37.-** Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz e no frio (4 °C), pelo método FRAP

No caso do método para a determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, obteve-se um valor mais elevado para as amostras que foram sujeitas à luz comparativamente com as amostras que se encontravam no escuro e no frio (Figura 38).



**Figura 38.-** Capacidade antioxidante inicial e final (55 dias) de extratos de calêndula na presença e ausência da luz e no frio (4 °C), pelo método DPPH

Quanto ao teor de compostos fenólicos totais, verificou-se a tendência inversa aos resultados obtidos pela capacidade antioxidante, onde o teor de compostos fenólicos foi inferior nas amostras iniciais, comparativamente ao detetado nas amostras que foram sujeitas à exposição da luz e às amostras que se encontraram no escuro e frio (Figura 39; Tabela 21, Anexo II).



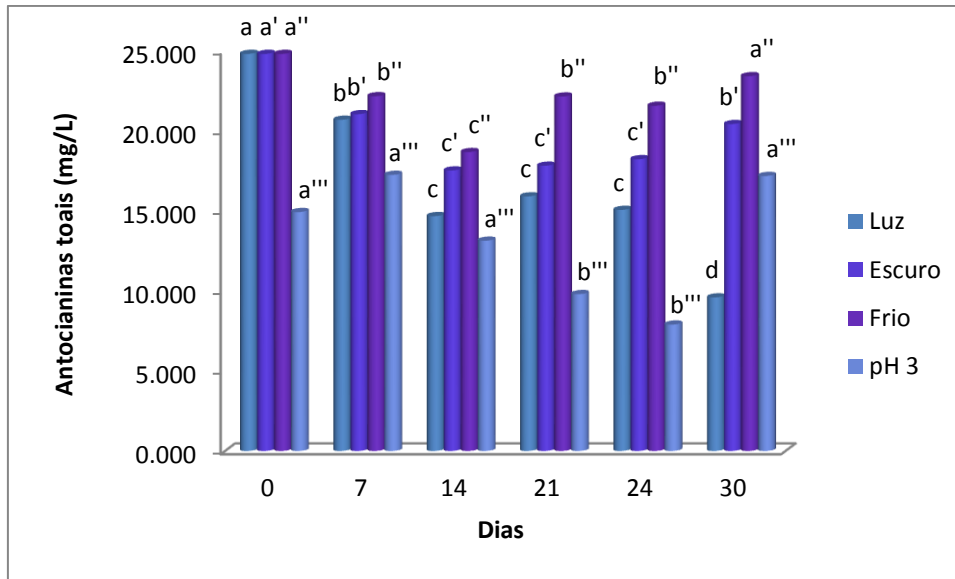
**Figura 39.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (55 dias) nos extratos de calêndula, na presença e ausência de luz e no frio (4 °C)

### ***Centáurea***

Neste estudo da termo estabilidade, apresenta-se os dados das duas extrações realizadas, tanto com o solvente a um pH=1, como com o solvente a um pH=3.

Relativamente ao teor de antocianinas totais (Figura 40, Tabelas 34 e 36, Anexo III), obteve-se resultados ligeiramente diferentes entre as duas extrações realizadas. No caso da extração com o solvente (etanol:água acidificada) a pH 1, houve uma diminuição significativa, em comparação com as amostras iniciais, durante a primeira semana, notando-se a partir do dia 7 uma estabilização no teor de antocianinas. Relativamente ao dia 14, foi verificado uma diminuição significativa, no entanto, havendo uma posterior subida dos valores, considerou-se este ponto como um possível erro, não se considerando esta diferença significativa para os resultados. Para a extração com solvente (etanol:água acidificada) a pH 3 só foi verificado uma diminuição a partir da terceira semana (dia 21), em comparação com as amostras iniciais. Nesta extração deve ter ocorrido algum erro relativamente ao último dia de análise (dia 30), não se considerando a subida como certa,

mas sim como uma estabilização. Verifica-se que o teor de antocianinas totais se mantem constante, em temperaturas mais baixas e com uma maior acidez.

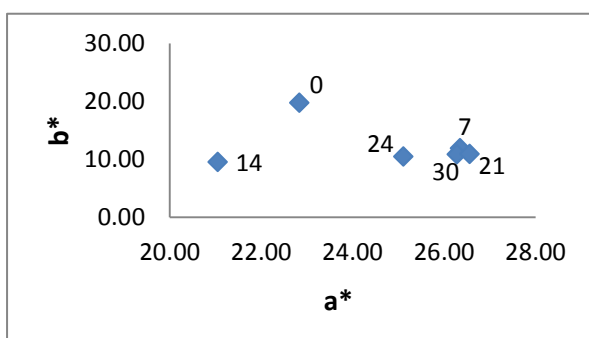


**Figura 40.-** Evolução do teor de antocianinas totais de extratos de centáurea a um pH=1, na presença e ausência de luz, e em câmara frigorífica (4 °C) de extratos a um pH=1 e pH=3, ao longo do tempo

Quanto à cor, visualmente as amostras tinham cores bastante diferentes, sendo que as amostras de pH 1 tinham uma coloração vermelha, mais escura e intensa, enquanto que as amostras de pH 3 apresentavam uma cor rosa, mais clara e translúcida. Relativamente à determinação dos parâmetros de cor, L, a\* e b\*, verificou-se que para os dois valores de pH, o valor médio de L teve um ligeiro aumento, mantendo-se estáveis os valores de a\* e b\* (Tabelas 10 e 11, Figura 41).

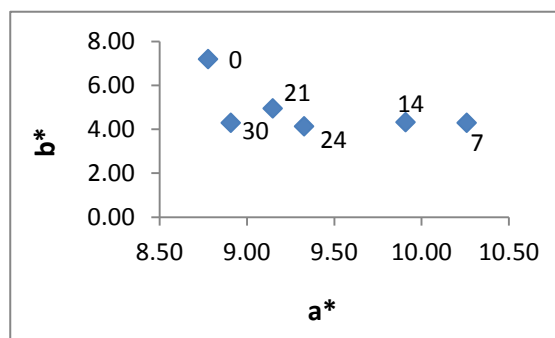
**Tabela 11.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da centáurea a um pH=1, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C)

Dias	L	a*	b*	
0	61.82	22.84	19.70	
7	85.16	26.36	11.86	
14	87.12	21.05	9.50	
21	85.61	26.28	10.81	
4	85.79	25.11	10.46	
30	85.60	26.56	10.90	



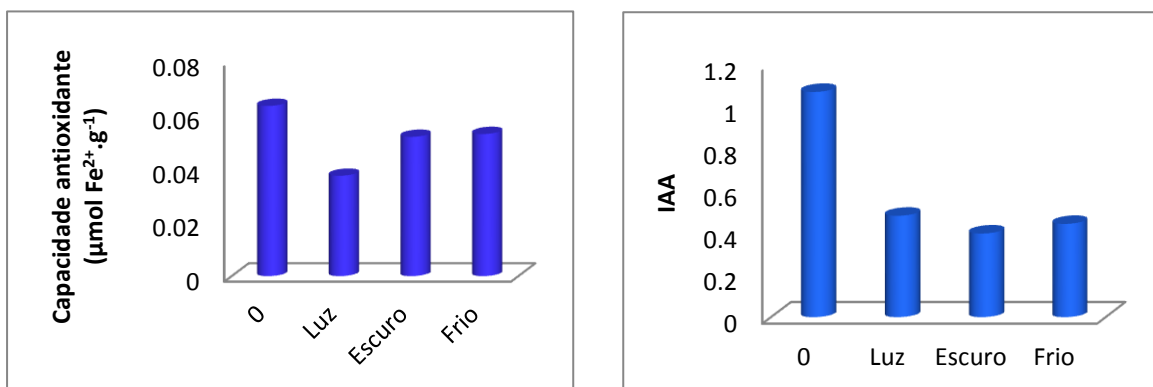
**Tabela 10.-** Parâmetros L a\* b\* da cor das amostras da centáurea a um pH=3, durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C)

Dias	L	a*	b*	
0	85.94	8.78	7.19	
7	93.64	10.26	4.29	
14	93.59	9.91	4.32	
21	94.21	9.15	4.94	
24	94.04	9.33	4.13	
30	94.37	8.91	4.29	

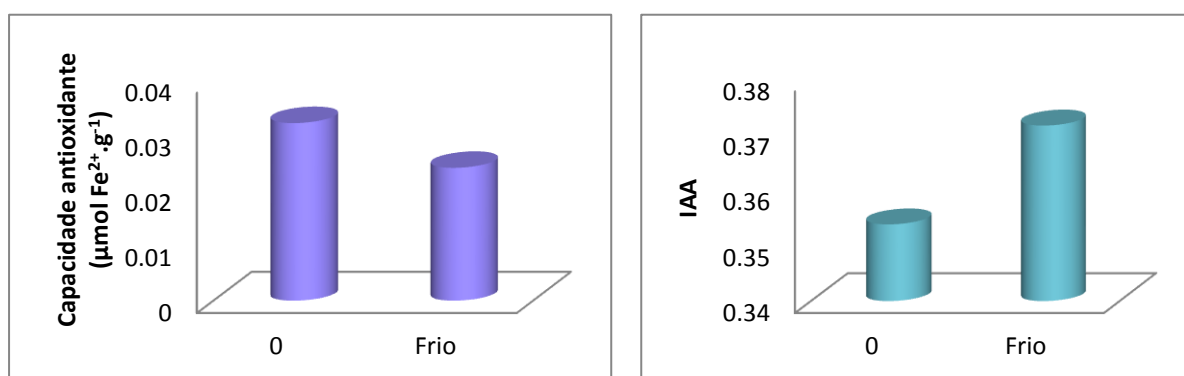


**Figura 41.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* das amostras da centáurea a um pH=1 (esquerda) e a um pH=3 (direita), durante o ensaio da termo estabilidade no frio (4 °C)

Quanto à determinação da capacidade antioxidante verificou-se que, nas amostras da extração a pH 1, que estiveram em condições de baixas temperaturas, ocorreu uma diminuição ao longo do estudo, em comparação com as amostras iniciais, obtendo valores muito próximos das amostras que foram mantidas no escuro. Este comportamento verificou-se através de ambos os métodos (FRAP e DPPH)(Figura 42; Tabela 35, Anexo III). No caso das amostras da extração a pH 3, não se verificou uma coerência entre os dois métodos de quantificação da capacidade antioxidante total, tendo-se verificado uma diminuição nos valores pelo teste do FRAP, e uma subida pelo método do DPPH, em comparação com as amostras iniciais (Figura 43; Tabela 37, Anexo III).

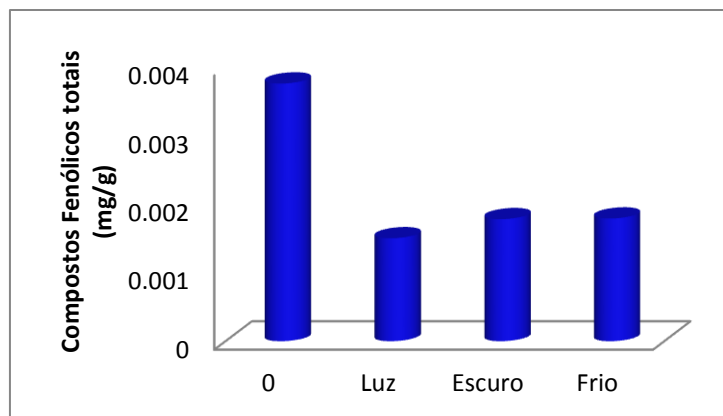


**Figura 42.-** Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 1 da centaurea na presença e ausência da luz e no frio (4 °C), pelo método do FRAP (esquerda) e DPPH (direita)

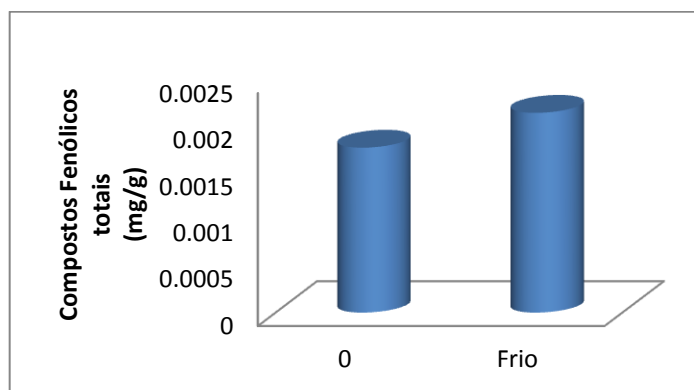


**Figura 43.-** Capacidade antioxidante inicial e final (30 dias) das amostras da extração a pH 3 da centaurea no frio (4 °C), pelo método do FRAP (esquerda) e DPPH (direita)

Relativamente ao teor de compostos fenólicos totais, mais uma vez os resultados da extração a pH 1 mantiveram-se bastante próximos dos das amostras no escuro, ou seja, ocorreu uma diminuição, em comparação com o teor inicial, bastante acentuada após os 30 dias (Figura 44; Tabela 35, Anexo III), enquanto que para as amostras de pH 3, houve uma ligeira subida do teor, provavelmente causado pelo decréscimo da densidade, ou seja, devido a uma possível concentração dos compostos (Figura 45; Tabela 37, Anexo III).



**Figura 44.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (30 dias) das amostras da extração a um pH=1 da centáurea, na presença e ausência da luz e no frio (4 °C)



**Figura 45.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial e final (30 dias) das amostras da extração a um pH=3 da centáurea, no frio (4 °C)

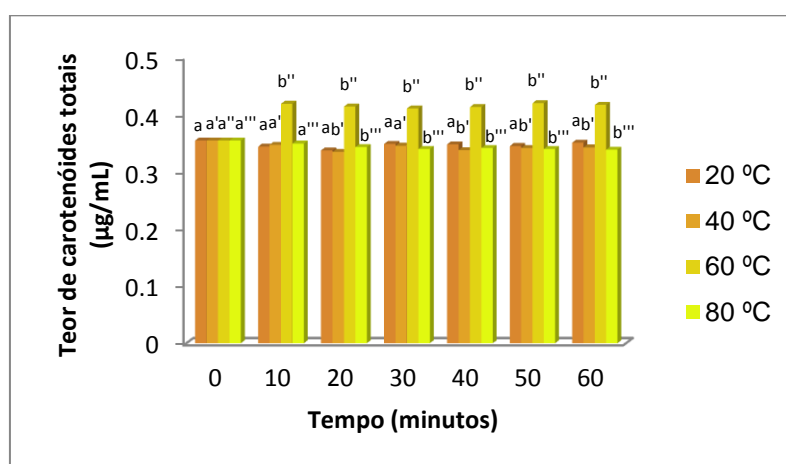
### A temperatura médio/altas

Nos ensaios para determinar a termo estabilidade dos compostos em estudo e tendo em conta que as extrações realizadas a partir da calêndula foram solubilizadas em etanol, a temperatura máxima estudada foi os 80 °C, uma vez que a temperatura de evaporação do etanol ser de 78 °C.

Por outro lado, as extrações da centáurea, utilizou-se a temperatura máxima de 100 °C, pois as amostras encontravam-se solubilizadas em água destilada.

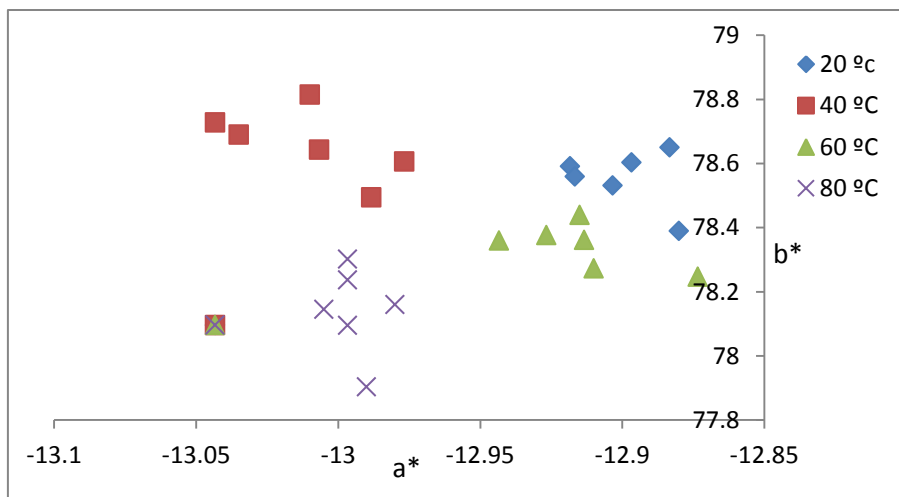
## Calêndula

O teor de carotenóides totais, independentemente da temperatura, não sofreu uma grande variação, ou seja, as amostras mostraram-se bastante resistentes. Excetuando à temperatura de 60 °C, houve sempre uma ligeira diminuição dos valores, sendo que aos 80 °C os valores passaram de 0,355  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para 0,339  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , num tempo de 60 minutos, sendo esta a maior diminuição registada. Aos 60 °C, ocorreu um ligeiro aumento do teor, passando-se dos 0,355  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para 0,417  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , sendo esta a maior diferença registada (Figura 46; Tabelas 22, 24, 26 e 28, Anexo II).



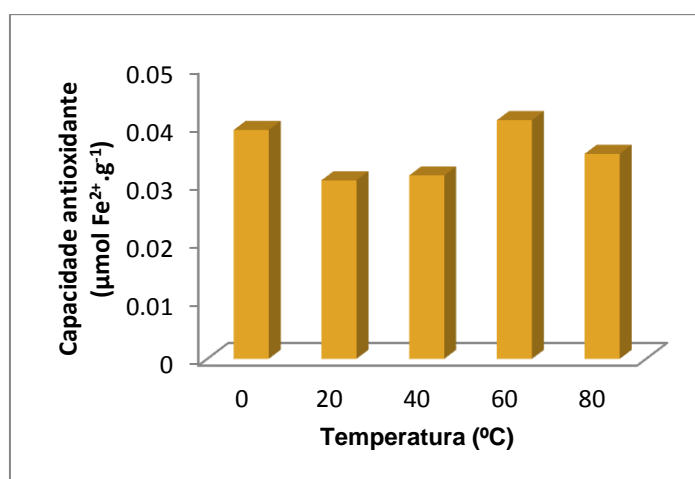
**Figura 46.-** Evolução do teor de carotenóides de extratos de calêndula, quando aplicadas diferentes temperaturas (20, 40, 60, e 80 °C), ao longo de 60 minutos

Relativamente à cor visual, os extratos da calêndula são bastante resistentes, não se tendo observado uma mudança na cor dos extratos com o aumento da temperatura. Mais uma vez, independentemente da temperatura, os parâmetros de L,  $a^*$  e  $b^*$  não sofreram variações significantes, sendo que visualmente a cor permaneceu a mesma. Não serão apresentados os valores em tabela, mas sim a dispersão dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  das diferentes amostras. Quanto ao parâmetro L, este não sofreu modificações, variando sempre à volta dos mesmos valores (próximo dos 95). Pela figura 47 é possível verificar uma distinção dos pontos, no entanto, o intervalo em que os valores variam não é significativo.

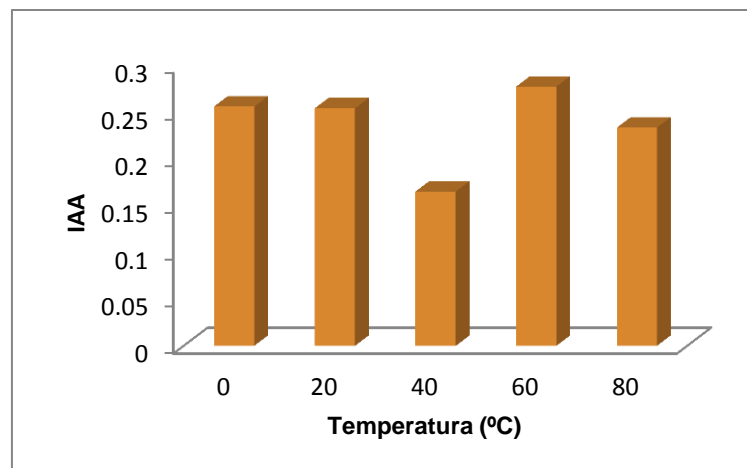


**Figura 47.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* das amostras da calêndula, durante o ensaio da termo estabilidade, quando aplicadas diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C)

Dada pelos valores dos métodos FRAP e DPPH, verificámos que os resultados obtidos tiveram um comportamento idêntico, isto é, observou-se a mesma tendência nos dois métodos. De forma geral a capacidade antioxidante decresce, no entanto, a uma temperatura de 60 °C houve um ligeiro aumento. Este facto deve estar relacionado com o facto de ter ocorrido também um aumento no teor de carotenóides totais (Figuras 48 e 49; Tabelas 23, 25, 27 e 29, Anexo II).

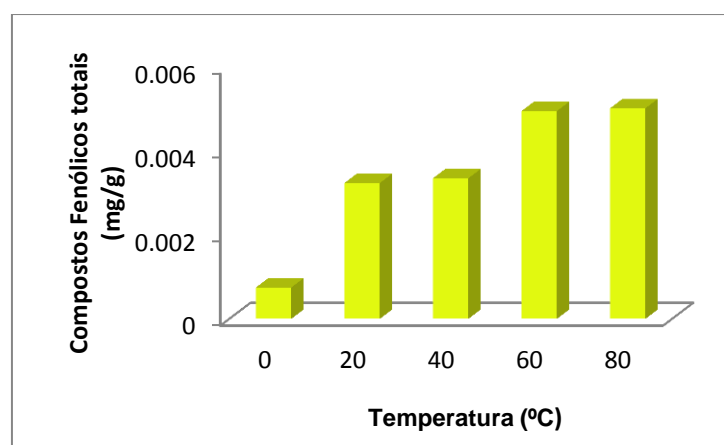


**Figura 48.-** Capacidade antioxidante inicial e final (60 minutos) de extratos de calêndula, após tratamento térmico a diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C), pelo método FRAP



**Figura 49.-** Capacidade antioxidante inicial e final (60 minutos) de extratos de calêndula, após tratamento térmico a diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C), pelo método DPPH

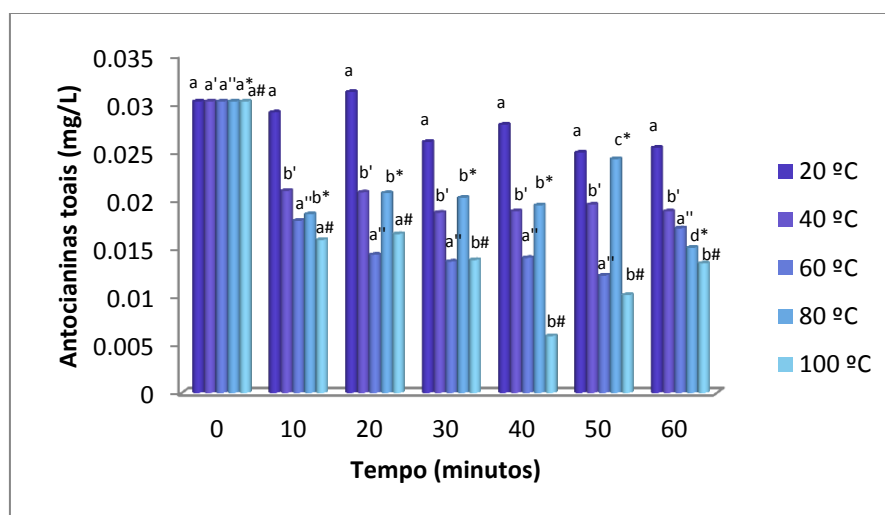
Quanto ao teor de compostos fenólicos totais, verificou-se um aumento dos compostos fenólicos com o aumento da temperatura. Este resultado deve-se provavelmente à degradação dos compostos presentes que origina um maior número de espécies moleculares em solução que contribuem para reagir com o reagente Folin (Figura 50; Tabelas 23, 25, 27 e 29, Anexo II).



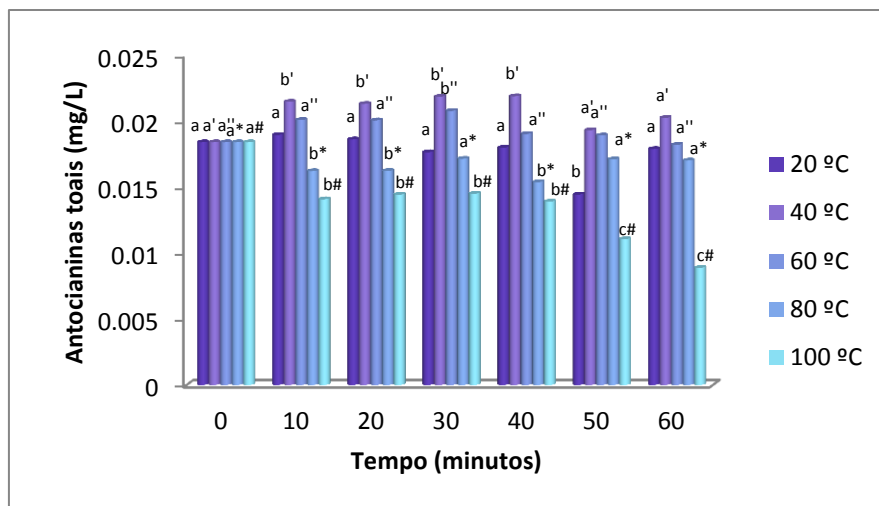
**Figura 50.-** Teor de compostos fenólicos de extratos de calêndula em função de tratamento térmico a diferentes temperaturas

## ***Centáurea***

O teor de antocianinas totais, independentemente do tipo de extração ou da temperatura, diminui ao longo do tempo. Na extração a pH 1 (Figura 51; Tabelas 38, 40, 42, 44 e 46, Anexo III), o decréscimo no teor foi progressivamente maior, consoante o aumento da temperatura. Na extração a pH 3 (Figura 52; Tabelas 48, 50, 52, 54 e 56, Anexo III) os decréscimos não seguem a mesma ordem, havendo uma oscilação nos mesmos. No entanto, é possível verificar que com um tratamento de 20 °C não houve alterações quase nenhuma, e que utilizando temperaturas de 40 e 60 °C houve um aumento devido a um aumento da concentração. A partir dos 60 °C é notável uma diminuição dos valores.

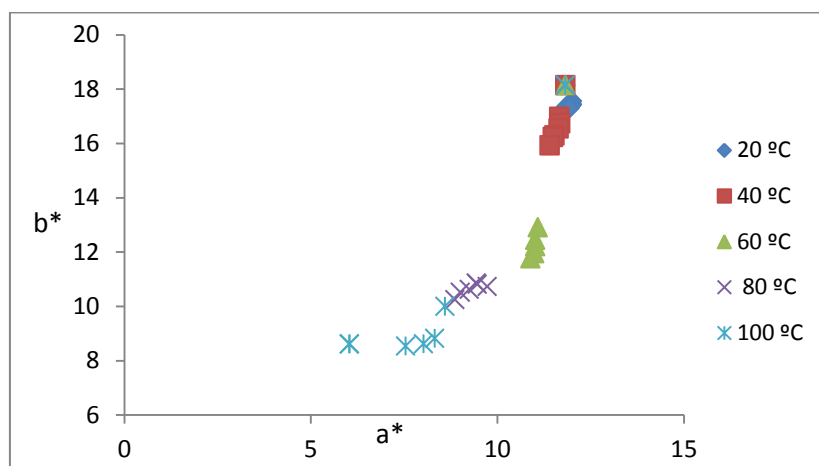


**Figura 51.-** Evolução do teor de antocianinas totais das amostras da centáurea a um pH 1, ao longo do tempo (60 minutos), quando aplicadas temperaturas diferentes (20, 40, 60, 80 e 100 °C)

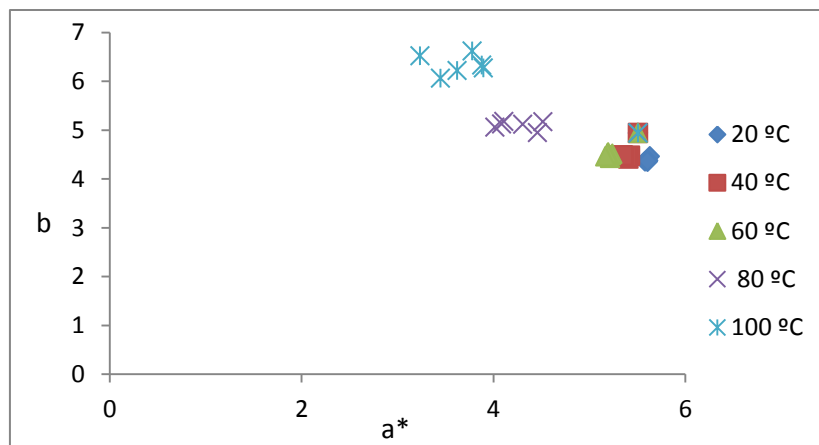


**Figura 52.-** Evolução do teor de antocianinas totais das amostras da centáurea a um pH 3, ao longo do tempo (60 minutos), quando aplicadas temperaturas diferentes (20, 40, 60, 80 e 100 °C)

A cor visual das amostras sofreu alterações, comparando as que foram submetidas a temperaturas de 20 e 100 °C. Quanto aos valores dos parâmetros de avaliação, verificou-se que, de uma forma geral, enquanto que o parâmetro  $a^*$  diminui, independentemente do pH do solvente de extração utilizado, o parâmetro  $b^*$  tem comportamentos diferentes. Nas amostras com pH 1 verificou-se um decréscimo do parâmetro  $b^*$ , enquanto que nas amostras com pH 3, verificou-se um aumento. Mais uma vez, só vão ser apresentadas as dispersões dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  (Figuras 53 e 54).



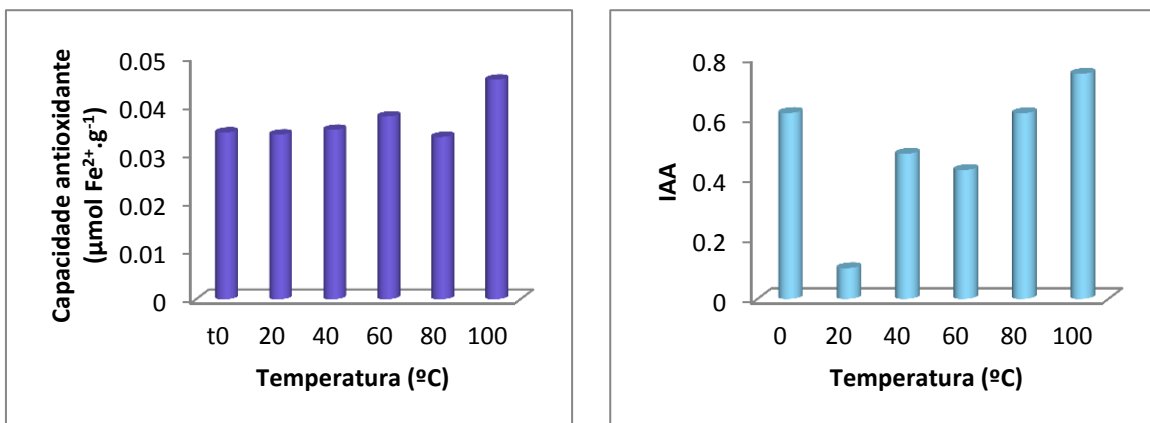
**Figura 53.-** Exposição gráfica dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  da cor das amostras em que foi utilizado um solvente de extração a pH 1, ao longo do tempo (60 minutos) a diferentes temperaturas



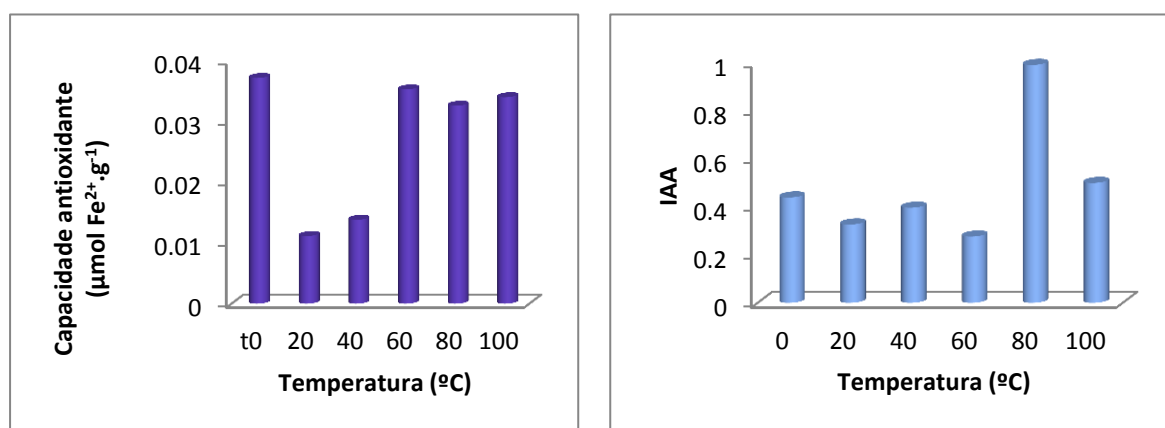
**Figura 54.-** Exposição gráfica dos parâmetros a\* e b\* da cor das amostras em que foi utilizado um solvente de extração a pH 3, ao longo do tempo (60 minutos) a diferentes temperaturas

A capacidade antioxidante nas amostras da extração a pH 1 obteve variações diferentes, quando comparados os dois métodos de quantificação. Pelo método FRAP verificou-se uma oscilação dos resultados, visto que, nas temperaturas de 40, 60 e 100 °C, ter ocorrido um aumento da capacidade antioxidante, em comparação com a capacidade antioxidante inicial, enquanto que nas restantes houve uma diminuição. Pelo método do DPPH, exceptuando à temperatura de 100 °C, verificou-se uma diminuição da capacidade antioxidante inicial, ao longo do estudo, sendo que quanto mais baixas as temperaturas utilizadas, mais acentuado é o decréscimo (Figura 55; Tabelas 39, 41, 43, 45 e 47, Anexo III).

Nas amostras da extração a pH 3, verificou-se que, independentemente da temperatura, mas principalmente a 20 e 40 °C, ocorreu uma descida da capacidade antioxidante, pelo método FRAP. Pelo método do DPPH, até aos 60 °C verificou-se uma diminuição da capacidade antioxidante, quando comparada com as amostras iniciais, enquanto que nas restantes duas temperaturas estudadas houve um aumento (Figura 56; Tabelas 49, 51, 53, 55 e 57, Anexo III).

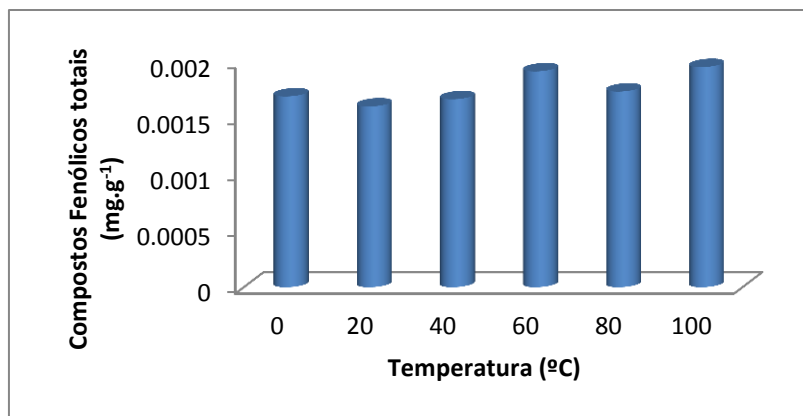


**Figura 55.-** Capacidade antioxidante inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método FRAP (esquerda) e DPPH (direita), nas amostras da centáurea a um pH 1

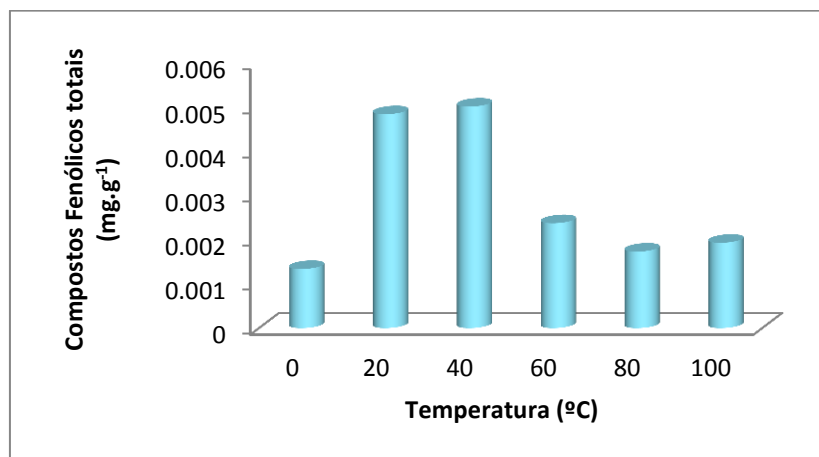


**Figura 56.-** Capacidade antioxidante inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método FRAP (esquerda) e DPPH (direita), nas amostras da centáurea a um pH 3

Por fim, o teor de compostos fenólicos totais, em ambas as extrações, sofreu uma subida, em comparação com as amostras iniciais. Na extração a pH 3 obteve-se valores bastante elevados, quando submetidas temperaturas de 20 e 40 °C (Figura 58; Tabelas 39, 41, 43, 45 e 47, Anexo III). Na extração a pH 1, não foram verificados aumentos significativos, em comparação com os valores iniciais, no entanto, as diferenças são mais notáveis a partir dos 60 °C (Figura 57; Tabelas 49, 51, 53, 55 e 57, Anexo III).



**Figura 57.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método de Folin-Ciocalteu, nas amostras da centáurea a um pH 1



**Figura 58.-** Teor de compostos fenólicos totais inicial (0) e final, das diferentes temperaturas utilizadas, pelo método de Folin-Ciocalteu, nas amostras da centáurea a um pH 3

## V. Conclusão

No presente estudo verificou-se que existem diferentes processos extrativos possíveis para obter a fração corante das plantas. A utilização de diferentes solventes tem que ter em conta os compostos que se pretende extrair. No caso da calêndula, o melhor rendimento foi proporcionado quando se utilizou como solvente de extração o metanol, visto os carotenóides não serem hidrosolúveis. Enquanto que no caso da centáurea, foram as soluções que incorporaram água e um baixo pH que proporcionaram o melhor rendimento de extração.

Como anteriormente, serão primeiro apresentadas as conclusões relativamente aos extratos que tiveram como material vegetal a calêndula, e posteriormente as conclusões dos extratos que tiveram a centáurea como material vegetal.

Durante a otimização da extração da calêndula, de uma forma geral, foi a extração na qual se utilizou como solvente de extração o metanol (a quente) que obteve os melhores resultados. Apesar de as diferenças não serem muito grandes em comparação com outras extrações, foi nesta que se obteve um valor superior em termos de carotenóides totais (cerca de  $1.45 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de solução) e de compostos fenólicos totais ( $3.17 \text{mg.g}^{-1}$  de extrato seco), tendo os parâmetros de cor fornecido a cor mais amarelada, neste extrato. O único teste em que não se obteve os melhores resultados, foi na determinação da capacidade antioxidante pelo método do FRAP (obteve-se os resultados mais baixos, com  $83 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ). Apesar deste resultado, concluiu-se que esta é a melhor extração estudada para a obtenção extratos de corantes, obtida a partir da calêndula como material vegetal.

Quanto ao estudo da foto estabilidade, foi verificada uma certa perda, em termos de carotenóides totais, quando comparada com as amostras que foram mantidas ao abrigo da luz, no entanto, pode-se considerar que estes extratos são resistentes à fotodegradação, visto que foi necessário prolongar o estudo para quase o dobro do tempo. Quanto aos outros parâmetros houve diferenças entre as amostras que estiveram em condições diferentes, mas estas nunca tomaram valores grandes, contribuindo para a estabilidade destes extratos.

Relativamente ao estudo da termo estabilidade, obtiveram-se resultados bastante positivos para as amostras que estiveram em condições de refrigeração,  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . Não foi verificada perda considerável em qualquer dos aspetos analisados. Quanto às amostras que foram submetidas a temperaturas mais elevadas, não foram verificadas perdas significativas em termos de carotenóides totais, e a capacidade antioxidante destes extratos, apesar de

variar um bocado, considerou-se estável. O único resultado que variou mais foram os compostos fenólicos totais, que aumentaram ao longo do estudo. No entanto, em termos de cor, as amostras não demonstraram qualquer modificação.

De uma forma geral concluiu-se que estes extratos são bastante resistentes, tanto por influências térmicas como pela luz, sendo por isso considerados uns possíveis substituintes de corantes sintéticos, para a utilização na indústria alimentar, sendo a calêndula uma boa fonte destes possíveis corantes.

Para a otimização dos extratos da centáurea, como já referido anteriormente, foram as extrações em que foi incorporada água nas soluções as que obtiveram melhores rendimentos, e destas foram as com o pH inferior que apresentaram melhores resultados. Esta conclusão também foi possível obter relativamente ao teor de antocianinas totais, e foi nestas soluções que se obteve uma cor mais atrativa. Relativamente aos testes da capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos totais, não foram verificados os melhores resultados nestas extrações, principalmente pelo método de Folin-Ciocalteu, mas visto a cor ser um factor muito importante neste trabalho, foram escolhidas as extrações com um pH = 1 e 3.

Nos ensaios da foto estabilidade, foi verificado uma diminuição significativa nas primeiras duas semanas, em relação ao teor de antocianinas totais, tanto nas amostras mantidas ao abrigo da luz, como nas amostras que estiveram na presença de luz, demonstrando uma certa degradação natural destes compostos. Pode-se concluir assim, apesar de ser preferível manter estes extratos ao abrigo da luz, que os mesmos têm uma certa estabilidade à luz. Em termos de cor, foi bastante visível a perda da mesma, tendo-se obtido amostras muito claras após os 30 dias de ensaio. Relativamente à capacidade antioxidante e ao teor de compostos fenólicos totais, concluiu-se que existe uma perda notável, principalmente pelo método FRAP, nas amostras expostas a uma fonte luminosa, realçando a preferência de manter estes extratos ao abrigo da luz.

Quanto ao estudo da termo estabilidade, mais uma vez concluiu-se que as amostras colocadas em ambientes a baixas temperaturas obtiveram resultados positivos. Tal como no estudo da foto estabilidade, também aqui foi verificada uma degradação “natural” do teor de antocianinas totais, no entanto, aceitando-se este facto, concluiu-se que um meio a baixas temperaturas é o mais vantajoso para aumentar a estabilidade dos extratos.

Em meios com temperaturas superiores, foram verificados comportamentos diferentes, consoante o pH do meio. Enquanto que nas amostras a um pH = 1 se observou

uma perda no teor de antocianinas totais a partir dos 40 °C, esta mesma perda só foi verificada, nas amostras a um pH = 3, a partir dos 80 °C, e à medida que a temperatura aumentava a perda era mais acentuada. Em ambos os casos, a cor das amostras sofreu modificações, consoante as perdas do teor de antocininas, concluindo-se uma directa relação entre estes dois aspetos. Quanto à capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nas amostras de pH 1 foi verificado um constante equilíbrio (pelo método FRAP), notando-se uma harmonia entre estas duas análises. Nas amostras a um pH = 3 também foi verificada a uma harmonia entre a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais, exceptuando nas temperaturas de 20 e 40 °C.

De uma forma geral, pode-se concluir que os extratos da centáurea podem ser usados como matéria corante mas devem ser preferencialmente mantidos ao abrigo da luz e num meio de baixas temperaturas, e se aplicados a alimentos que poderão sofrer algum tipo de tratamento térmico este deve ser o mais breve possível.

Por outro lado, os extratos da calêndula apresentaram ser mais estáveis nas condições estudadas, podendo a calêndula ser usada como matéria prima para obtenção de corantes alimentares.

Para uma melhor compreensão e um desenvolvimento mais aprofundado deste trabalho, poderá-se estudar a toxicidade destes extratos, analisando assim a sua aplicabilidade segura em alimentos. Posteriormente, poderá-se refazer este estudo, em que os extratos são aplicados em alimentos, para uma visão mais realista do comportamento destes mesmos.

## VI. Bibliografia

- Bailoni, M. A., Bobbio, P. A., & Bobbio, F. O., (1998).** Preparação e estabilidade do extrato antocianico das folhas da *Acalypha hispida*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 18
- Bakó, E., Deli, J., & Tóth, G., (2001).** HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of biochemical and biophysical methods*, nº 53, p. 241-250.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J., (1996).** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, nº 239 (0292), p. 70-76.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B. e Holden, J. M. (2011).** *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3*. U. S. Department of Agriculture. p.156.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. P. (2013).** Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.
- Chiru, T., (2009).** Phytochemical study of *Centaurea cyanus* L.. *Scientific Papers*, vol.LII (1222-5339), p. 293-297.
- Dannehl, D., Huyskens-keil, S., Eichholz, I., Ulrichs, C., & Schmidt, U., (2010).** Effects of direct-electric-current on secondary plant compounds and antioxidant activity in harvested tomato fruits (*Solanum lycopersicon* L.). *Food Chemistry*, nº 126, p. 157-165.
- Dias, M. C. G. B., (1989).** Aditivos alimentares problemática da sua utilização. *Revista Portuguesa de Nutrição*, vol. 1 nº 1, 45-60.
- Downham, A., & Collins, P., (2000).** Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 5-22.
- Efstratiou, E., Hussain, A. I., Nigam, P. S., Moore, J. E., Ayub, M. A., & Rao, J. R., (2012).** Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, nº 18, 173-176.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., Freitas, V., & Mateus, N., (2013).** Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.010>)
- Hamad, M. N., Mohammed, H. J., & Merdaw, M. A., (2011).** Antibacterial Activity of *Calendula Officinalis* Flowers In Vitro. *IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI.*,vol.24 nº 3.
- Kalvatchev, Z., Walder, R., & Garzaro, D., (1997).** Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed & Pharmacother*, nº 51, p. 176-180.
- Kemper, K. J., (1999).** *Calendula (Calendula officinalis)*. *The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research*.
- Khan, P. M. A., & Farooqui, M., (2011).** Analytical Applications of Plant Extract as Natural pH Indicator: A Review. *Journal of Advanced Scientific Research*, nº 2 (0976-9595), p. 20-27.
- Kishimoto, S., Maoka, T., Sumitomo, K., & Ohmiya, A., (2005).** Analysis of Carotenoid Composition in Petals of *Calendula (Calendula officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem*, vol.69 nº 11, p. 2122-2128.

**Knockaert, G., Puliserry, S. K., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., (2012).** Isomerisation of carrot  $\beta$ -carotene in presence of oil during thermal and combined thermal/high pressure processing. *Food Chemistry*, nº 138, p. 1515-1520.

**Konczak, I., & Zhang, W., (2004).** Anthocyanins – More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, nº 5, p. 239-240.

**Liu, G. L., Guo, H. H., & Sun, Y. M., (2012).** Optimization of the Extraction of Anthocyanins from the Fruit Skin of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk and Identification of Anthocyanins in the Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS). *International Journal of Molecular Sciences*, nº 13 (1422-0067), p. 6292-6302.

**MacDougall, D. B., (2002).** Color in food, England. *Woodhead Lda*, 1ª edição

**Magnuson, B., Munro, I., Abbot, P., Baldwin, N., Lopez-Garcia, R., Ly, K., McGirr, L., Roberts, A., & Socolovsky, S., (2013),** Review of the regulation and safety assessment of food substances in various countries and jurisdictions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 1147-1220

**Meggos, H. (1995).** Food colors-An international perspective. *MANUFACTURING CONFECTIONER*, 75, 59-59.

**Melo, M. J., Pina, F., Andary, C., (2009).** Handbook of Natural Colourants. *John Wiley & Sons, Ltd.*(Capítulo 9 – Anthocyanins: Nature's Glamorous Palette), p.135-150.

**Naidu, M. M., & Sowbhagya, H. B., (2012).** Technological Advances in Food Colours. *Chemical Industry Digest*, p. 79-88.

**Netto, R. C. M., (2009).** Dossiê Corantes. *Food Ingredients Brasil*, nº 9, 40-59.

**Ohmiya, A., (2010).** Diversity of Carotenoid Composition in Flower Petals. *Japan Agricultural Research Quarterly*, nº 45 (2), p. 163-171.

**Oliveira, I., & Guimarães, M. C., (1991).** Aditivos Alimentares: sua importância nos produtos comercializados entre nós. *Revista Portuguesa de Nutrição*, vol.3 nº1, 29-38

**Patrick, K. F. M., Kumar, S., Edwardson, P. A. D., & Hutchinson, J. J., (1996).** Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. *Phytomedicine*, vol.3 nº 1, p. 11-18.

**Piggott, J. R., (1988).** Sensory analysis of food. *London Elsevier applied science*, 2ª edição

**Pintea, A., Bele, C., Andrei, S., & Socaciu, C., (2003).** HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, vol.47 nº 1-4, p. 37-40.

**Quer, P. F., (1999).** Plantas Medicinales: El Dioscorides Renovado. Editorial Labor, S.A., p. 132-133.

**Quian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J., (2011).** Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene-enriched nanoemulsions: Influence. *Food Chemistry*, nº 132, p. 1221-1229.

**Quirós, A. R., & Costa, H. S., (2004).** Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, nº 19, p. 97-111.

**Rein, M., (2005).** Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins

**Ribeiro, J. N., Oliveira, T. T., Nagem, T. J., & Flores, A. V., (2004).** Avaliação da toxicidade da antocianina de uva, através da quantificação espectrofotométrica de constituintes do sangue, e medida de massa corporal de coelhos saudáveis. *Revista Analytica*, nº 12, p. 50-55.

**Rodriguez-Amaya, D. B., & Kimura, M., (2004).** HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus, p. 2-4.

**Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D., (2007).** Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico online*, nº 127 (1679-6535), p. 1-4.

**Schmidt-Dannert, C., (2000).** Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, nº 11, p. 255-261.

**Slinkard, K., & Singleton, V. L., (1977).** Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 28, nº 1, p. 49-55.

**Takeda, K., & Tominaga, S., (1983).** The Anthocyanin in Blue Flowers of *Centaurea Cyanus*. *The Botanical Magazine*, nº 96, p. 359-363.

**Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., & Oliveira, F. A. (2008).** Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, nº 55, p. 297-304.

**Wrolstad, R. E., (1993).** Color and Pigment Analyses in Food Products. *Agricultural Experiment Station*. Station Bulletin 624.

## **Anexo I**

## 1. Resumo dos dados da otimização do processo de extração da calêndula

Cal.1- Metanol a frio; Cal.2- Acetona; Cal.3- Éter etílico; Cal.4- Metanol a quente; Cal.5- Etanol/Água (60:40)

**Tabela 12.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais

Amostra	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
<b>Cal.1</b>	99,15 $\pm$ 0,010	-4,09 $\pm$ 0,015	13,54 $\pm$ 0,015	0,245 $\pm$ 0,0008
<b>Cal.2</b>	97,74 $\pm$ 0,020	-9,91 $\pm$ 0,006	42,52 $\pm$ 0,023	1,325 $\pm$ 0,000
<b>Cal.3</b>	97,15 $\pm$ 0,010	-12,04 $\pm$ 0,00	55,99 $\pm$ 0,021	1,340 $\pm$ 0,0017
<b>Cal.4</b>	96,32 $\pm$ 0,015	-10,66 $\pm$ 0,010	59,42 $\pm$ 0,010	1,452 $\pm$ 0,000
<b>Cal.5</b>	98,26 $\pm$ 0,032	-1,59 $\pm$ 0,006	6,48 $\pm$ 0,000	0,113 $\pm$ 0,0002

**Tabela 13.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais

Amostra	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ $\text{g}^{-1}$ resíduo)
<b>Cal.1</b>	1177 $\pm$ 60	2,86 $\pm$ 0,11
<b>Cal.2</b>	2025 $\pm$ 166	2,66 $\pm$ 0,22
<b>Cal.3</b>	1221 $\pm$ 218	2,97 $\pm$ 0,45
<b>Cal.4</b>	1263 $\pm$ 49	3,17 $\pm$ 0,25
<b>Cal.5</b>	2020 $\pm$ 85	0,95 $\pm$ 0,04

**2. Resumo dos dados da otimização do processo de extração da centáurea**  
**Cent.1- Etanol:HCl:Água (50:1:49) pH=1; Cent.2- Etanol:Água(60:40) pH=1 (HCl); Cent.3-**  
**Etanol:Água(60:40) pH=4(HCl); Cent.4- Etanol:Água(60:40) pH=4 (Ác. cítrico); Cent.5-**  
**Etanol:Água(60:40) pH=6; Cent.6- Etanol:Água(60:40) pH=8 (NaOH); Cent.7-**  
**Etanol:Água(60:40) pH=10 (NaOH)**

**Tabela 14.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais

Amostra	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
<b>Cent.1</b>	80,96 $\pm$ 0,106	8,44 $\pm$ 0,029	6,93 $\pm$ 0,035	6,843
<b>Cent.2</b>	83,20 $\pm$ 0,165	8,80 $\pm$ 0,046	6,85 $\pm$ 0,087	7,502
<b>Cent.3</b>	87,75 $\pm$ 0,618	1,67 $\pm$ 0,268	11,32 $\pm$ 0,214	4,982
<b>Cent.4</b>	77,17 $\pm$ 0,168	2,26 $\pm$ 0,012	12,74 $\pm$ 0,025	5,201
<b>Cent.5</b>	85,28 $\pm$ 0,112	1,41 $\pm$ 0,030	10,20 $\pm$ 0,026	5,026
<b>Cent.6</b>	71,24 $\pm$ 0,309	2,74 $\pm$ 0,093	14,02 $\pm$ 0,025	5,052
<b>Cent.7</b>	61,78 $\pm$ 0,166	3,58 $\pm$ 0,015	16,45 $\pm$ 0,038	5,362

**Tabela 15.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais

Amostra	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE . $\text{g}^{-1}$ resíduo)
<b>Cent.1</b>	259,85 $\pm$ 7,12	1,068 $\pm$ 0,042
<b>Cent.2</b>	277,28 $\pm$ 2,42	1,083 $\pm$ 0,092
<b>Cent.3</b>	415,24 $\pm$ 60,91	2,853 $\pm$ 0,135
<b>Cent.4</b>	377,83 $\pm$ 10,17	10,216 $\pm$ 0,292
<b>Cent.5</b>	380,02 $\pm$ 2,92	3,102 $\pm$ 0,096
<b>Cent.6</b>	360,56 $\pm$ 5,17	9,734 $\pm$ 0,364
<b>Cent.7</b>	296,69 $\pm$ 15,19	8,301 $\pm$ 0,085

## **Anexo II**

## 1. Resumo dos dados do estudo da foto estabilidade dos extratos da calêndula

**Tabela 16.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais, nos extratos que estiveram sob o efeito da luz

Dias	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	94,15 $\pm$ 0,010	-11,31 $\pm$ 0,055	95,92 $\pm$ 0,219	0,365 $\pm$ 0,002
7	94,68 $\pm$ 0,029	-11,28 $\pm$ 0,016	88,91 $\pm$ 0,222	0,572 $\pm$ 0,013
14	95,17 $\pm$ 0,220	-11,67 $\pm$ 0,081	84,33 $\pm$ 0,214	0,500 $\pm$ 0,006
21	95,32 $\pm$ 0,017	-11,78 $\pm$ 0,019	80,25 $\pm$ 0,118	0,517 $\pm$ 0,006
24	94,46 $\pm$ 0,046	-11,92 $\pm$ 0,029	94,34 $\pm$ 0,195	0,510 $\pm$ 0,010
30	94,65 $\pm$ 0,015	-12,18 $\pm$ 0,019	93,29 $\pm$ 0,073	0,487 $\pm$ 0,001
40	95,68 $\pm$ 0,024	-11,54 $\pm$ 0,070	71,19 $\pm$ 0,993	0,427 $\pm$ 0,001
47	96,16 $\pm$ 0,365	-11,47 $\pm$ 0,094	65,76 $\pm$ 0,499	0,358 $\pm$ 0,017
55	96,04 $\pm$ 0,024	-11,12 $\pm$ 0,103	68,69 $\pm$ 11,892	0,470 $\pm$ 0,001

**Tabela 17.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos que estiveram sob o efeito da luz

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0448 $\pm$ 0,0015	0,0023 $\pm$ 0,0001
55	0,0498 $\pm$ 0,0005	0,0042 $\pm$ 0,0002

**Tabela 18.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais, nos extratos que estiveram ao abrigo da luz

Dias	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	94,15 $\pm$ 0,010	-11,31 $\pm$ 0,055	95,92 $\pm$ 0,219	0,365 $\pm$ 0,002
7	94,41 $\pm$ 0,010	-12,12 $\pm$ 0,023	93,62 $\pm$ 0,034	0,624 $\pm$ 0,018
14	94,80 $\pm$ 0,054	-12,60 $\pm$ 0,021	92,77 $\pm$ 0,147	0,579 $\pm$ 0,011
21	94,91 $\pm$ 0,026	-12,71 $\pm$ 0,034	91,43 $\pm$ 0,417	0,599 $\pm$ 0,006
24	95,28 $\pm$ 0,033	-11,74 $\pm$ 0,019	79,21 $\pm$ 0,177	0,605 $\pm$ 0,027
30	95,58 $\pm$ 0,020	-11,99 $\pm$ 0,159	76,62 $\pm$ 0,402	0,619 $\pm$ 0,021
40	95,04 $\pm$ 0,051	-12,97 $\pm$ 0,176	91,02 $\pm$ 1,853	0,581 $\pm$ 0,023
47	94,87 $\pm$ 0,198	-13,04 $\pm$ 0,378	89,60 $\pm$ 1,861	0,515 $\pm$ 0,092
55	95,22 $\pm$ 0,017	-13,39 $\pm$ 0,083	87,62 $\pm$ 0,033	0,606 $\pm$ 0,021

**Tabela 19.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos que estiveram ao abrigo da luz

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0448 $\pm$ 0,002	0,0023 $\pm$ 0,0001
55	0,0522 $\pm$ 0,001	0,0038 $\pm$ 0,0003

2. Resumo dos dados do estudo da termo estabilidade, dos extratos da calêndula que estiveram no frio (4 °C)

Tabela 20.- Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais

Dias	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	94,15 $\pm$ 0,010	-11,31 $\pm$ 0,055	95,92 $\pm$ 0,219	0,365 $\pm$ 0,002
7	94,20 $\pm$ 0,123	-11,65 $\pm$ 0,075	95,04 $\pm$ 0,324	0,660 $\pm$ 0,004
14	94,37 $\pm$ 0,035	-11,70 $\pm$ 0,324	95,24 $\pm$ 0,728	0,617 $\pm$ 0,012
21	94,52 $\pm$ 0,075	-12,00 $\pm$ 0,090	94,61 $\pm$ 0,205	0,631 $\pm$ 0,014
24	94,93 $\pm$ 0,044	-12,87 $\pm$ 0,036	90,49 $\pm$ 0,408	0,645 $\pm$ 0,021
30	95,04 $\pm$ 0,093	-12,93 $\pm$ 0,088	92,33 $\pm$ 0,982	0,618 $\pm$ 0,014
40	94,66 $\pm$ 0,037	-12,18 $\pm$ 0,040	93,29 $\pm$ 0,238	0,594 $\pm$ 0,019
47	94,72 $\pm$ 0,021	-12,27 $\pm$ 0,100	92,80 $\pm$ 0,447	0,605 $\pm$ 0,009
55	94,73 $\pm$ 0,090	-12,45 $\pm$ 0,128	92,16 $\pm$ 0,529	0,618 $\pm$ 0,014

Tabela 21.- Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ $\text{g}^{-1}$ resíduo)
0	0,0448 $\pm$ 0,0015	0,0023 $\pm$ 0,0001
55	0,0521 $\pm$ 0,0007	0,0035 $\pm$ 0,0001

### 3. Resumo dos dados do estudo da termo estabilidade dos extratos da calêndula, a temperaturas médio/altas

**Tabela 22.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 20 °C

tempo (minutos)	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	95,69 $\pm$ 0,006	-13,04 $\pm$ 0,012	78,10 $\pm$ 0,067	0,423 $\pm$ 0,0004
10	95,60 $\pm$ 0,010	-12,88 $\pm$ 0,018	78,39 $\pm$ 0,214	0,407 $\pm$ 0,0076
20	95,55 $\pm$ 0,018	-12,88 $\pm$ 0,029	78,65 $\pm$ 0,148	0,414 $\pm$ 0,0126
30	95,56 $\pm$ 0,028	-12,90 $\pm$ 0,027	78,60 $\pm$ 0,037	0,426 $\pm$ 0,0022
40	95,53 $\pm$ 0,024	-12,90 $\pm$ 0,019	78,53 $\pm$ 0,034	0,426 $\pm$ 0,0031
50	95,58 $\pm$ 0,150	-12,92 $\pm$ 0,085	78,59 $\pm$ 0,133	0,423 $\pm$ 0,0037
60	95,59 $\pm$ 0,187	-12,92 $\pm$ 0,077	78,56 $\pm$ 0,208	0,430 $\pm$ 0,0092

**Tabela 23.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 20 °C

tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ $\text{g}^{-1}$ resíduo)
0	0,039 $\pm$ 0,0013	0,3020	0,00074 $\pm$ 0,00003
60	0,031 $\pm$ 0,0015	0,2538	0,00323 $\pm$ 0,00012

**Tabela 24.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 40 °C

tempo (minutos)	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	95,69 $\pm$ 0,006	-13,04 $\pm$ 0,012	78,10 $\pm$ 0,067	0,423 $\pm$ 0,0004
10	95,55 $\pm$ 0,188	-13,04 $\pm$ 0,055	78,69 $\pm$ 0,141	0,413 $\pm$ 0,0026
20	95,51 $\pm$ 0,254	-13,04 $\pm$ 0,090	78,73 $\pm$ 0,156	0,421 $\pm$ 0,0046
30	95,37 $\pm$ 0,092	-13,01 $\pm$ 0,039	78,82 $\pm$ 0,068	0,428 $\pm$ 0,0051
40	95,30 $\pm$ 0,015	-13,01 $\pm$ 0,012	78,64 $\pm$ 0,021	0,420 $\pm$ 0,0068
50	95,33 $\pm$ 0,034	-12,98 $\pm$ 0,036	78,61 $\pm$ 0,049	0,422 $\pm$ 0,0012
60	95,32 $\pm$ 0,023	-12,99 $\pm$ 0,012	78,50 $\pm$ 0,059	0,423 $\pm$ 0,0008

**Tabela 25.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 40 °C

tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ $\text{g}^{-1}$ resíduo)
0	0,039 $\pm$ 0,0013	0,3020	0,00074 $\pm$ 0,00003
60	0,0314 $\pm$ 0,0003	0,1650	0,00335 $\pm$ 0,00021

**Tabela 26.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 60 °C

tempo (minutos)	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	95,69 $\pm$ 0,006	-13,04 $\pm$ 0,012	78,10 $\pm$ 0,067	0,423 $\pm$ 0,0004
10	95,76 $\pm$ 0,060	-12,87 $\pm$ 0,029	78,25 $\pm$ 0,074	0,411 $\pm$ 0,0024
20	95,76 $\pm$ 0,008	-12,91 $\pm$ 0,016	78,36 $\pm$ 0,032	0,416 $\pm$ 0,0021
30	95,78 $\pm$ 0,010	-12,92 $\pm$ 0,014	78,44 $\pm$ 0,098	0,415 $\pm$ 0,0017
40	95,79 $\pm$ 0,019	-12,93 $\pm$ 0,016	78,38 $\pm$ 0,116	0,414 $\pm$ 0,0022
50	95,76 $\pm$ 0,025	-12,91 $\pm$ 0,009	78,27 $\pm$ 0,138	0,417 $\pm$ 0,0029
60	95,75 $\pm$ 0,066	-12,94 $\pm$ 0,064	78,36 $\pm$ 0,049	0,416 $\pm$ 0,0041

**Tabela 27.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 60 °C

tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,039 $\pm$ 0,0013	0,3020	0,00074 $\pm$ 0,00003
60	0,0409 $\pm$ 0,0005	0,2771	0,00495 $\pm$ 0,00005

**Tabela 28.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de carotenóides totais do ensaio a 80 °C

tempo (minutos)	Cor			Teor de Carotenóides Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	95,69 $\pm$ 0,006	-13,04 $\pm$ 0,012	78,10 $\pm$ 0,067	0,423 $\pm$ 0,0004
10	95,75 $\pm$ 0,017	-12,99 $\pm$ 0,014	77,90 $\pm$ 0,437	0,416 $\pm$ 0,0051
20	95,74 $\pm$ 0,016	-12,98 $\pm$ 0,021	78,16 $\pm$ 0,242	0,416 $\pm$ 0,0019
30	95,78 $\pm$ 0,142	-13,00 $\pm$ 0,068	78,10 $\pm$ 0,345	0,414 $\pm$ 0,0030
40	95,83 $\pm$ 0,189	-13,00 $\pm$ 0,086	78,30 $\pm$ 0,276	0,412 $\pm$ 0,0005
50	95,71 $\pm$ 0,066	-13,01 $\pm$ 0,019	78,15 $\pm$ 0,273	0,409 $\pm$ 0,0034
60	95,71 $\pm$ 0,015	-13,00 $\pm$ 0,018	78,24 $\pm$ 0,016	0,410 $\pm$ 0,0049

**Tabela 29.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 80 °C

tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,039 $\pm$ 0,0013	0,3020	0,00074 $\pm$ 0,00003
60	0,0351 $\pm$ 0,0008	0,2332	0,0050 $\pm$ 0,0006

## **Anexo III**

## 1. Resumo dos dados do estudo da foto estabilidade dos extratos da centáurea

**Tabela 30.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram sob o efeito da luz

Dias	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,82	22,84	19,7	24,819
7	80,49 $\pm$ 2,239	23,51 $\pm$ 0,953	12,72 $\pm$ 0,713	20,703
14	85,07 $\pm$ 0,097	27,11 $\pm$ 0,091	10,97 $\pm$ 0,020	14,680
21	87,84 $\pm$ 0,008	19,68 $\pm$ 1,331	9,96 $\pm$ 0,167	15,913
24	89,61 $\pm$ 0,427	15,81 $\pm$ 1,753	9,55 $\pm$ 0,559	15,069
30	91,26 $\pm$ 0,758	11,60 $\pm$ 1,893	8,62 $\pm$ 0,107	9,596

**Tabela 31.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram sob o efeito da luz

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,063 $\pm$ 0,006	1,0674	0,0038 $\pm$ 0,0001
30	0,037 $\pm$ 0,002	0,4803	0,0015 $\pm$ 0,0002

**Tabela 32.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram ao abrigo da luz

Dias	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,82	22,84	19,7	24,819
7	80,35 $\pm$ 3,728	25,29 $\pm$ 0,566	13,45 $\pm$ 1,402	21,052
14	84,97 $\pm$ 0,110	25,83 $\pm$ 0,132	10,87 $\pm$ 0,079	17,532
21	84,95 $\pm$ 0,621	24,44 $\pm$ 1,062	10,93 $\pm$ 0,153	17,828
24	86,45 $\pm$ 0,205	24,02 $\pm$ 0,025	10,56 $\pm$ 0,148	18,238
30	86,32 $\pm$ 0,255	22,89 $\pm$ 0,171	10,96 $\pm$ 0,126	20,435

**Tabela 33.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 1 que estiveram ao abrigo da luz

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0633 $\pm$ 0,006	1,0674	0,0038 $\pm$ 0,0001
30	0,0519 $\pm$ 0,0004	0,3963	0,0018 $\pm$ 0,00002

**2. Resumo dos dados do estudo da termo estabilidade dos extratos da centáurea que estiveram no frio (4 °C)**

**Tabela 34.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 1

Dias	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,82	22,84	19,7	24,819
7	85,16 $\pm$ 0,164	26,36 $\pm$ 0,150	11,86 $\pm$ 0,080	22,175
14	87,12 $\pm$ 0,397	21,05 $\pm$ 0,837	9,50 $\pm$ 0,110	18,681
21	85,61 $\pm$ 0,145	26,28 $\pm$ 0,290	10,81 $\pm$ 0,055	22,155
24	85,79 $\pm$ 0,211	25,11 $\pm$ 1,216	10,46 $\pm$ 0,033	21,576
30	85,60 $\pm$ 0,074	26,56 $\pm$ 0,096	10,90 $\pm$ 0,410	23,426

**Tabela 35.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 1

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0633 $\pm$ 0,006	1,0674	0,0038 $\pm$ 0,0001
30	0,0529 $\pm$ 0,002	0,4417	0,0018 $\pm$ 0,0001

**Tabela 36.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais, nos extratos a um pH 3

Dias	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	85,94	8,78	7,19	14,934
7	93,64 $\pm$ 0,131	10,26 $\pm$ 0,172	4,29 $\pm$ 0,045	17,255
14	93,59 $\pm$ 0,071	9,91 $\pm$ 0,050	4,32 $\pm$ 0,010	13,142
21	94,21 $\pm$ 0,395	9,15 $\pm$ 1,313	4,94 $\pm$ 0,375	9,804
24	94,04 $\pm$ 0,274	9,33 $\pm$ 0,062	4,13 $\pm$ 0,025	7,899
30	94,37 $\pm$ 0,557	8,91 $\pm$ 1,220	4,29 $\pm$ 0,389	17,188

**Tabela 37.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, nos extratos a um pH 3

Dias	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0323 $\pm$ 0,0004	0,3539	0,00177 $\pm$ 0,00001
30	0,0241 $\pm$ 0,0040	0,3717	0,214 $\pm$ 0,00017

**3. Resumo dos dados do estudo da termo estabilidade dos extratos da centáurea a um pH 1, a temperaturas médio/altas**

**Tabela 38.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 20 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,58 $\pm$ 0,006	11,82 $\pm$ 0,031	18,14 $\pm$ 0,047	0,0308
10	65,00 $\pm$ 0,581	11,85 $\pm$ 0,222	17,34 $\pm$ 0,264	0,0292
20	64,85 $\pm$ 0,260	12,00 $\pm$ 0,034	17,56 $\pm$ 0,109	0,0325
30	65,43 $\pm$ 0,357	12,00 $\pm$ 0,023	17,43 $\pm$ 0,086	0,0267
40	65,30 $\pm$ 0,399	11,97 $\pm$ 0,071	17,39 $\pm$ 0,134	0,0273
50	65,26 $\pm$ 0,284	11,98 $\pm$ 0,036	17,39 $\pm$ 0,097	0,0260
60	65,33 $\pm$ 0,412	11,93 $\pm$ 0,050	17,29 $\pm$ 0,031	0,0250

**Tabela 39.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 20 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0344 $\pm$ 0,0006	0,6161	0,0017 $\pm$ 0,00005
60	0,0339 $\pm$ 0,0008	0,1020	0,0016 $\pm$ 0,00003

**Tabela 40.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 40 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,58 $\pm$ 0,006	11,82 $\pm$ 0,031	18,14 $\pm$ 0,047	0,0308
10	64,63 $\pm$ 0,298	11,66 $\pm$ 0,085	16,97 $\pm$ 0,138	0,0218
20	65,18 $\pm$ 0,331	11,68 $\pm$ 0,063	16,73 $\pm$ 0,111	0,0208
30	65,41 $\pm$ 0,044	11,64 $\pm$ 0,058	16,55 $\pm$ 0,113	0,0186
40	66,01 $\pm$ 0,209	11,53 $\pm$ 0,049	16,29 $\pm$ 0,075	0,0194
50	66,39 $\pm$ 0,101	11,49 $\pm$ 0,082	16,23 $\pm$ 0,058	0,0199
60	66,99 $\pm$ 0,287	11,40 $\pm$ 0,153	15,92 $\pm$ 0,201	0,0190

**Tabela 41.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 40 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0344 $\pm$ 0,0006	0,6161	0,0017 $\pm$ 0,00005
60	0,0349 $\pm$ 0,0004	0,4810	0,00167 $\pm$ 0,00004

**Tabela 42.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 60 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,58 $\pm$ 0,006	11,82 $\pm$ 0,031	18,14 $\pm$ 0,047	0,0308
10	70,08 $\pm$ 0,171	11,00 $\pm$ 0,128	13,20 $\pm$ 0,087	0,0267
20	71,06 $\pm$ 0,427	11,09 $\pm$ 0,063	12,90 $\pm$ 0,193	0,0207
30	72,02 $\pm$ 0,155	11,01 $\pm$ 0,059	12,45 $\pm$ 0,077	0,0194
40	72,90 $\pm$ 0,252	11,01 $\pm$ 0,026	12,22 $\pm$ 0,082	0,0204
50	73,65 $\pm$ 0,566	10,99 $\pm$ 0,048	11,95 $\pm$ 0,122	0,0183
60	74,04 $\pm$ 0,272	10,89 $\pm$ 0,082	11,76 $\pm$ 0,216	0,0243

**Tabela 43.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 60 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0344 $\pm$ 0,0006	0,6161	0,0017 $\pm$ 0,0001
60	0,0377 $\pm$ 0,0009	0,4273	0,00192 $\pm$ 0,00002

**Tabela 44.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 80 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,58 $\pm$ 0,006	11,82 $\pm$ 0,031	18,14 $\pm$ 0,047	0,0308
10	69,76 $\pm$ 0,378	9,73 $\pm$ 0,040	10,73 $\pm$ 0,132	0,0189
20	70,40 $\pm$ 0,715	9,47 $\pm$ 0,041	10,81 $\pm$ 0,236	0,0206
30	70,81 $\pm$ 0,154	9,44 $\pm$ 0,082	10,86 $\pm$ 0,040	0,0203
40	72,22 $\pm$ 0,101	9,25 $\pm$ 0,039	10,61 $\pm$ 0,051	0,0194
50	73,18 $\pm$ 0,199	9,01 $\pm$ 0,064	10,51 $\pm$ 0,073	0,0242
60	74,50 $\pm$ 0,085	8,86 $\pm$ 0,044	10,24 $\pm$ 0,74	0,0150

**Tabela 45.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 80 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0344 $\pm$ 0,001	0,6161	0,0017 $\pm$ 0,0001
60	0,0335 $\pm$ 0,001	0,6155	0,0017 $\pm$ 0,00002

**Tabela 46.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 100 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	61,58 $\pm$ 0,006	11,82 $\pm$ 0,031	18,14 $\pm$ 0,047	0,0308
10	73,58 $\pm$ 0,575	8,59 $\pm$ 0,131	9,99 $\pm$ 0,096	0,0234
20	82,63 $\pm$ 0,137	8,32 $\pm$ 0,048	8,82 $\pm$ 0,151	0,0249
30	84,78 $\pm$ 0,351	8,02 $\pm$ 0,072	8,62 $\pm$ 0,120	0,0212
40	85,75 $\pm$ 0,702	7,54 $\pm$ 0,138	8,53 $\pm$ 0,102	0,0089
50	85,24 $\pm$ 0,075	6,03 $\pm$ 0,059	8,61 $\pm$ 0,045	0,0152
60	84,76 $\pm$ 2,275	6,04 $\pm$ 0,728	8,62 $\pm$ 0,354	0,0206

**Tabela 47.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 100 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0344 $\pm$ 0,0006	0,6161	0,0017 $\pm$ 0,00005
60	0,0453 $\pm$ 0,00125	0,7462	0,02 $\pm$ 0,00006

#### 4. Resumo dos dados do estudo da termo estabilidade dos extratos da centáurea a um pH 3, a temperaturas médio/altas

**Tabela 48.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 20 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	92,09 $\pm$ 0,020	5,51 $\pm$ 0,029	4,94 $\pm$ 0,006	0,0184
10	94,04 $\pm$ 0,201	5,58 $\pm$ 0,051	4,36 $\pm$ 0,012	0,0190
20	93,92 $\pm$ 0,118	5,60 $\pm$ 0,044	4,36 $\pm$ 0,018	0,0186
30	93,46 $\pm$ 0,338	5,63 $\pm$ 0,035	4,46 $\pm$ 0,077	0,0177
40	93,93 $\pm$ 0,100	5,61 $\pm$ 0,031	4,38 $\pm$ 0,014	0,0180
50	93,93 $\pm$ 0,086	5,61 $\pm$ 0,036	4,35 $\pm$ 0,010	0,0145
60	93,95 $\pm$ 0,041	5,61 $\pm$ 0,033	4,37 $\pm$ 0,015	0,0179

**Tabela 49.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 20 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0372 $\pm$ 0,0008	0,4392	0,0013 $\pm$ 0
60	0,0112 $\pm$ 0,0005	0,3266	0,0048 $\pm$ 0,00004

**Tabela 50.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 40 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	92,09 $\pm$ 0,020	5,51 $\pm$ 0,029	4,94 $\pm$ 0,006	0,0184
10	93,29 $\pm$ 0,211	5,41 $\pm$ 0,035	4,42 $\pm$ 0,056	0,0215
20	93,14 $\pm$ 0,087	5,42 $\pm$ 0,015	4,48 $\pm$ 0,029	0,0213
30	93,24 $\pm$ 0,043	5,40 $\pm$ 0,013	4,47 $\pm$ 0,016	0,0219
40	93,31 $\pm$ 0,160	5,39 $\pm$ 0,010	4,46 $\pm$ 0,045	0,0219
50	93,28 $\pm$ 0,087	5,36 $\pm$ 0,034	4,47 $\pm$ 0,014	0,0193
60	93,20 $\pm$ 0,087	5,35 $\pm$ 0,025	4,49 $\pm$ 0,016	0,0203

**Tabela 51.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 40 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0372 $\pm$ 0,0008	0,4392	0,0013 $\pm$ 0
60	0,0138 $\pm$ 0,0014	0,3964	0,005 $\pm$ 0

**Tabela 52.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 60 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	92,09 $\pm$ 0,020	5,51 $\pm$ 0,029	4,94 $\pm$ 0,006	0,0184
10	93,93 $\pm$ 0,073	5,22 $\pm$ 0,027	4,43 $\pm$ 0,015	0,0201
20	93,85 $\pm$ 0,018	5,23 $\pm$ 0,026	4,49 $\pm$ 0,018	0,0201
30	93,86 $\pm$ 0,066	5,24 $\pm$ 0,017	4,52 $\pm$ 0,012	0,0208
40	93,81 $\pm$ 0,076	5,20 $\pm$ 0,016	4,54 $\pm$ 0,008	0,0190
50	93,85 $\pm$ 0,073	5,19 $\pm$ 0,015	4,53 $\pm$ 0,021	0,0189
60	93,86 $\pm$ 0,088	5,17 $\pm$ 0,005	4,47 $\pm$ 0,036	0,0182

**Tabela 53.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 60 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0372 $\pm$ 0,0008	0,4392	0,0013 $\pm$ 0
60	0,0353 $\pm$ 0,0022	0,2762	0,00238 $\pm$ 0

**Tabela 54.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 80 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	92,09 $\pm$ 0,020	5,51 $\pm$ 0,029	4,94 $\pm$ 0,006	0,0184
10	93,33 $\pm$ 0,198	4,52 $\pm$ 0,059	5,17 $\pm$ 0,188	0,0162
20	93,72 $\pm$ 0,372	4,46 $\pm$ 0,015	4,95 $\pm$ 0,081	0,0162
30	93,83 $\pm$ 0,180	4,31 $\pm$ 0,015	5,12 $\pm$ 0,146	0,0172
40	94,01 $\pm$ 0,182	4,09 $\pm$ 0,219	5,13 $\pm$ 0,262	0,0154
50	93,94 $\pm$ 0,233	4,11 $\pm$ 0,073	5,18 $\pm$ 0,075	0,0171
60	94,21 $\pm$ 0,154	4,02 $\pm$ 0,063	5,06 $\pm$ 0,118	0,0170

**Tabela 55.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 80 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0372 $\pm$ 0,0008	0,4392	0,0013 $\pm$ 0
60	0,0326 $\pm$ 0,0008	0,9914	0,0017 $\pm$ 0

**Tabela 56.-** Parâmetros colorimétricos (L, a\*, b\*) e teor de antocianinas totais do ensaio a 100 °C

Tempo (minutos)	Cor			Teor de Antocianinas Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
	L	a*	b*	
0	92,09 $\pm$ 0,020	5,51 $\pm$ 0,029	4,94 $\pm$ 0,006	0,0184
10	91,57 $\pm$ 0,238	3,90 $\pm$ 0,066	6,27 $\pm$ 0,149	0,0141
20	91,45 $\pm$ 0,197	3,88 $\pm$ 0,044	6,34 $\pm$ 0,142	0,0144
30	91,37 $\pm$ 1,228	3,78 $\pm$ 0,078	6,62 $\pm$ 0,874	0,0145
40	92,26 $\pm$ 0,297	3,62 $\pm$ 0,053	6,22 $\pm$ 0,168	0,0139
50	92,62 $\pm$ 0,049	3,45 $\pm$ 0,025	6,07 $\pm$ 0,029	0,0111
60	92,20 $\pm$ 0,945	3,23 $\pm$ 0,028	6,53 $\pm$ 0,717	0,0089

**Tabela 57.-** Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais do ensaio a 100 °C

Tempo (minutos)	Capacidade Antioxidante (FRAP) ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Capacidade Antioxidante (DPPH) (IAA)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (mg GAE $\cdot$ g <sup>-1</sup> resíduo)
0	0,0372 $\pm$ 0,0008	0,4392	0,0013 $\pm$ 0
60	0,0340 $\pm$ 0,0007	0,4998	0,0019 $\pm$ 0

## **Anexo IV**

# 1. Resultados espectralométricos dos diferentes ensaios, das extrações da calêndula

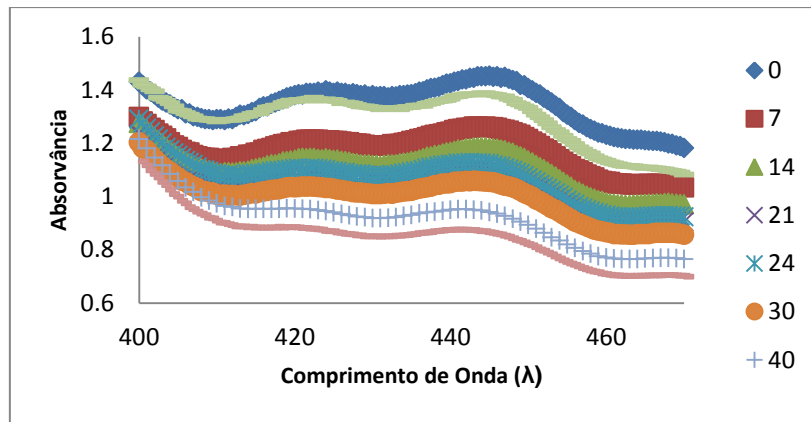


Figura 59.- Evolução espectralométrica durante o ensaio da foto estabilidade, quando presente uma fonte luminosa

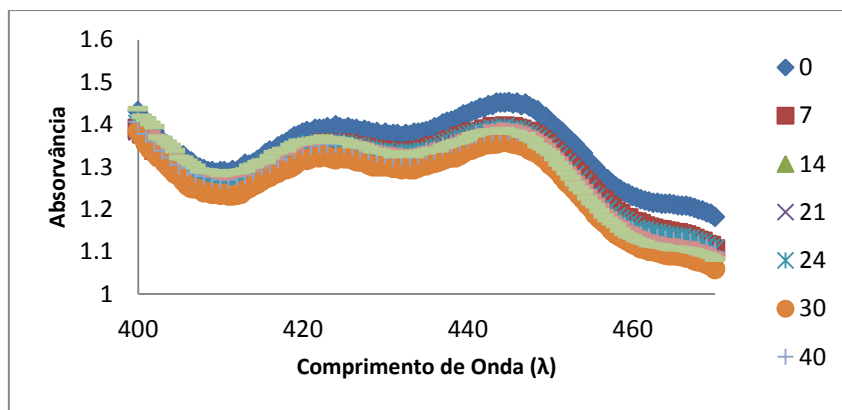


Figura 60.- Evolução espectralométrica durante o ensaio da foto estabilidade, quando as amostras estiveram ao abrigo da luz

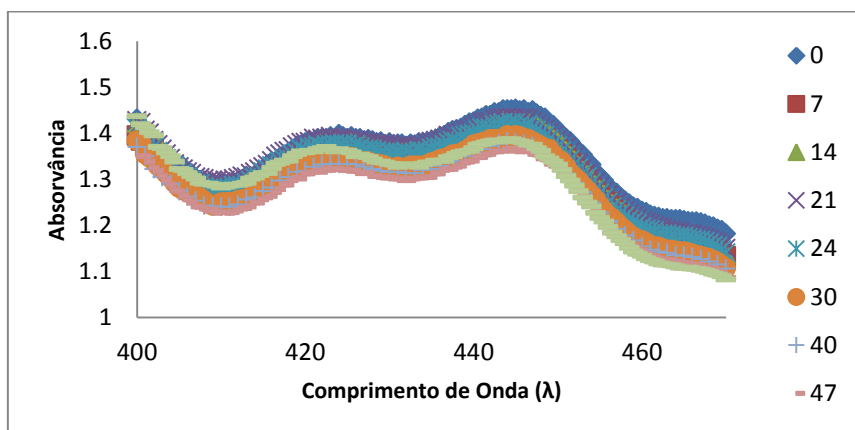
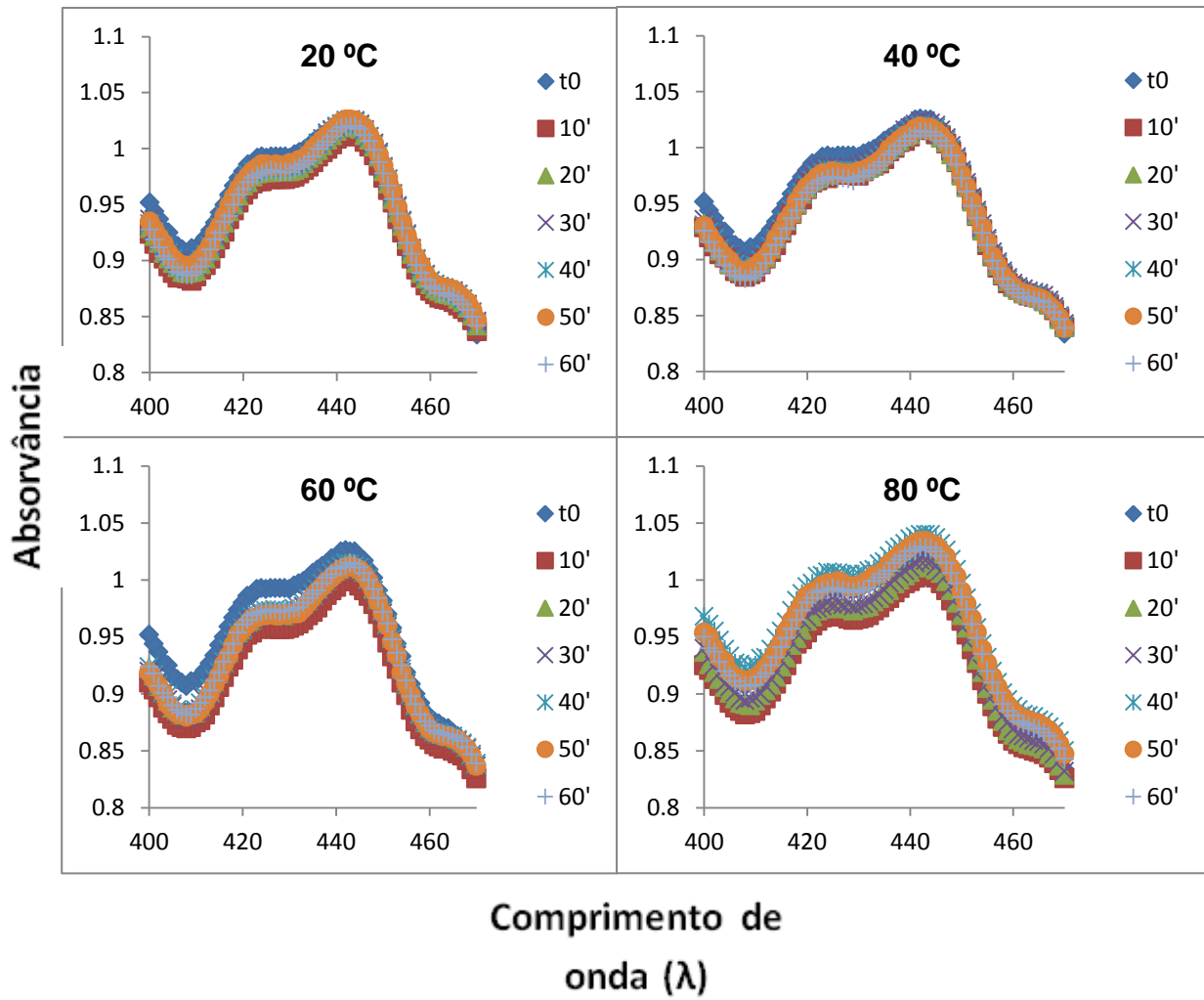
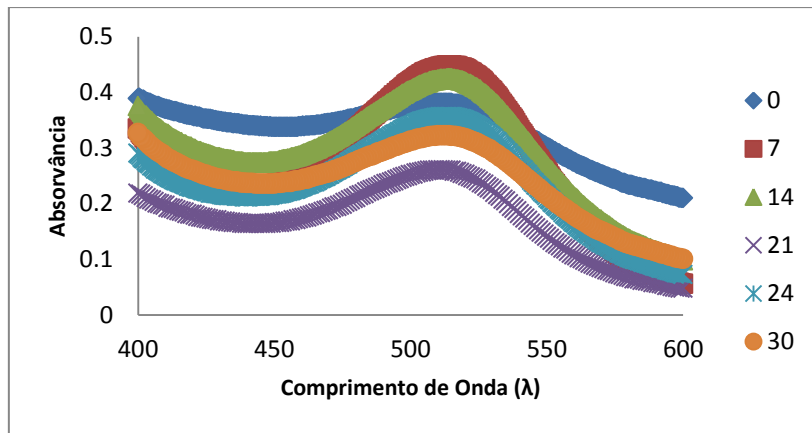


Figura 61.- Evolução espectralométrica durante o ensaio da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas baixas (4 °C)

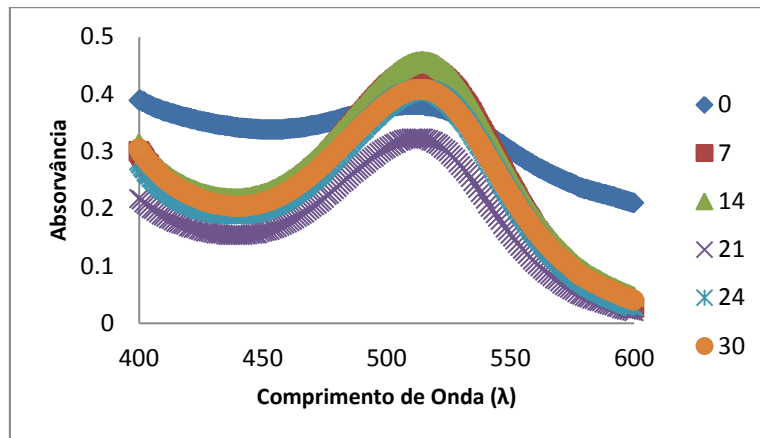


**Figura 62.-** Evolução espectral durante o estudo da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas médio/altas (20, 40, 60 e 80 °C)

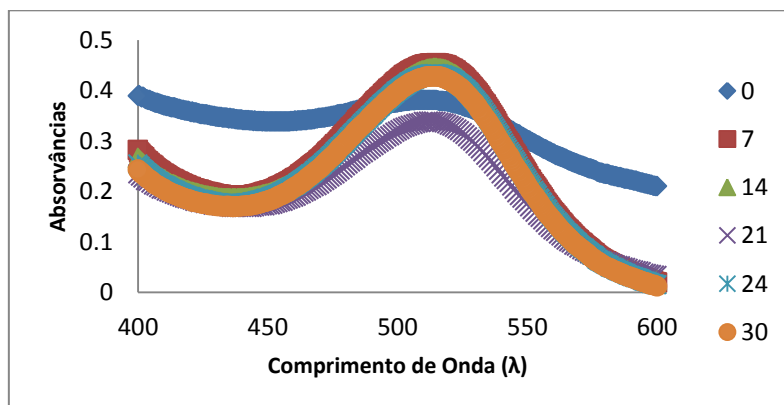
## 2. Resultados espectofotométricos dos diferentes ensaios, das extrações da centáurea a pH 1



**Figura 63.-** Evolução espectofotométrica durante o ensaio da foto estabilidade, quando presente uma fonte luminosa



**Figura 64.-** Evolução espectofotométrica durante o ensaio da foto estabilidade, quando as amostras estiveram ao abrigo da luz



**Figura 65.-** Evolução espectofotométrica durante o ensaio da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas baixas (4 °C)

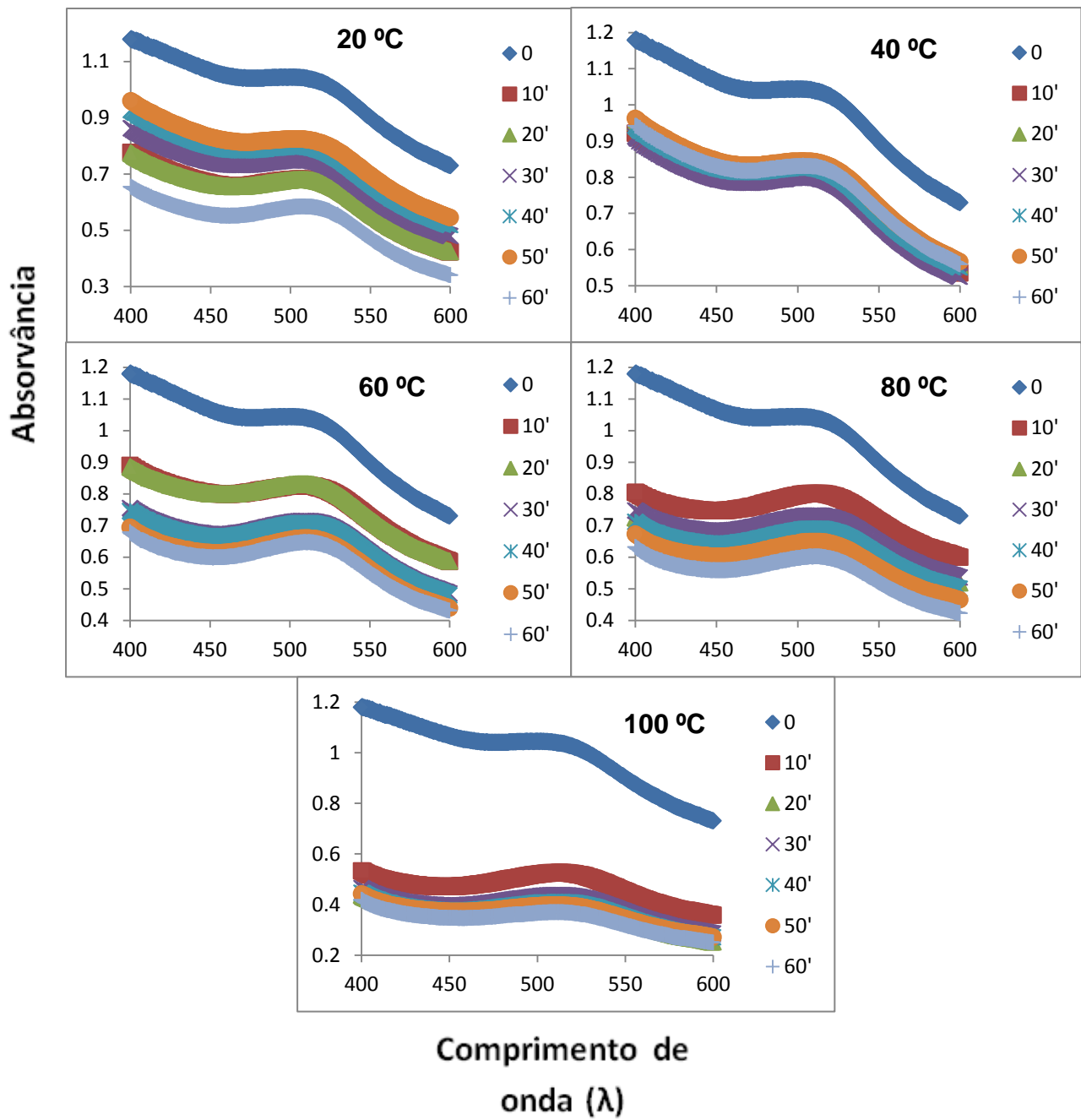


Figura 66.- Evolução espectral durante o estudo da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas médio/altas (20, 40, 60, 80 e 100 °C)

3. Resultados espectralfotométricos dos ensaios da termo estabilidade, das extrações da centáurea a pH 3

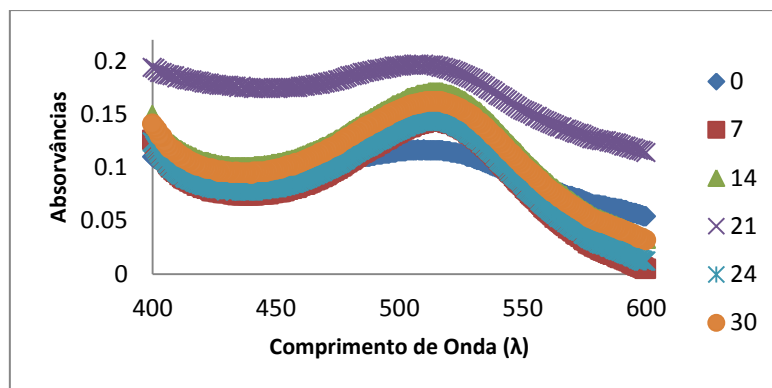
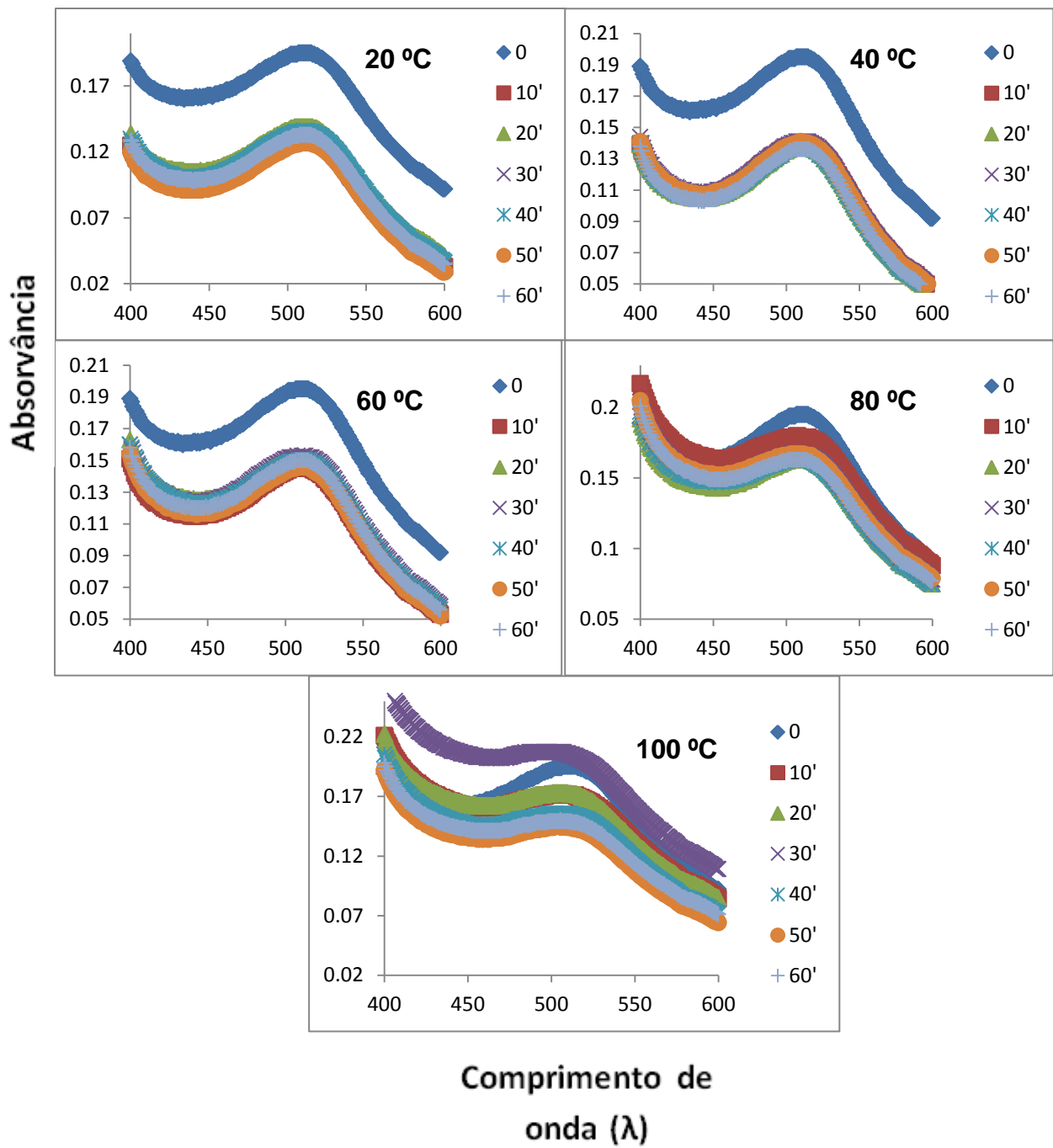


Figura 67.- Evolução espectralfotométrica durante o ensaio da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas baixas (4 °C)



**Figura 68.-** Evolução espectral durante o estudo da termo estabilidade, quando utilizadas temperaturas médio/altas (20, 40, 60, 80 e 100 °C)