



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**ÁDRIA DE SOUSA BENTES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OBTENÇÃO DE  
PIGMENTO AZUL A PARTIR DE FRUTOS DE  
JENIPAPO (*Genipa americana* L.) VERDES**

**BELÉM - PA  
2010**

**ÁDRIA DE SOUSA BENTES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OBTENÇÃO DE  
PIGMENTO AZUL A PARTIR DE FRUTOS DE JENIPAPO  
(*Genipa americana* L.) VERDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador:

Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria

Co-orientadora:

Profa. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Santos Lopes

**BELÉM - PA  
2010**

**ÁDRIA DE SOUSA BENTES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OBTENÇÃO DE  
PIGMENTO AZUL A PARTIR DE FRUTOS DE JENIPAPO  
(*Genipa americana* L.) VERDES**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria**  
(Universidade Federal do Pará – Orientador)

---

**Profa. Dra. Alessandra Santos Lopes**  
(Universidade Federal do Pará – Co-Orientador)

---

**Prof. Dr. Eder Augusto Furtado Araújo**  
(Universidade Federal do Pará – Membro)

---

**Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil**  
(Universidade Federal do Pará – Membro)

**BELÉM - PA  
2010**

À minha mãe Rosângela, ao meu  
irmão Kauê e ao meu grande amor Hugo,  
com muito carinho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde e perseverança para enfrentar os desafios e tornar possível a concretização desta etapa de minha vida.

À minha mãe Rosângela por acreditar em mim e me incentivar em minhas escolhas e projetos de vida.

Ao meu irmão Kauê pelos momentos de descontração e companheirismo.

Ao Prof. Lênio e à Profa. Alessandra pelo apoio e suporte neste trabalho difícil e por confiarem que eu poderia realizá-lo.

Ao Hugo pela paciência, dedicação, incentivo e companheirismo em todos os momentos deste trabalho os quais foram muitos e difíceis.

Aos Professores Evaldo Martins e Hervé Rogez, pelo auxílio.

Ao Professor Jaime Farfán, pela colaboração na análise de aminoácidos.

Aos amigos conquistados no Mestrado, Marco, Carol, Bárbara, pela troca de experiências, incentivo e pelos momentos de descontração.

Às “ajudantes” de laboratório, em especial, Tayana, Mayara e Flávia pela colaboração e auxílio.

À Universidade Federal do Pará pela estrutura e suporte financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

Muito obrigada!

## RESUMO

### **Avaliação do potencial de obtenção de pigmento azul a partir de frutos de jenipapo (*Genipa americana* L.) verdes**

O aumento da exigência do mercado pela substituição dos corantes artificiais, incentiva a busca por novas fontes de corantes naturais. Diante deste contexto, destaca-se o jenipapo (*Genipa americana* L.), a partir do qual é possível extrair o pigmento azul, substância de coloração peculiar ainda pouco pesquisada. O objetivo do presente estudo foi caracterizar física e físico-quimicamente os frutos de jenipapo verdes; avaliar, por meio de um experimento estatisticamente planejado, o potencial de obtenção de pigmento azul e de genipina, seu precursor, a partir do endocarpo do referido fruto e avaliar ainda a estabilidade do pigmento e do precursor frente a diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C) e intensidades luminosas (975, 3050 e 8200 lux). Com relação às características físicas, os frutos apresentaram peso médio de 140,10 g e diâmetros longitudinal e transversal de 73,10 e 63,22 mm, respectivamente. O mesocarpo do fruto apresentou os maiores teores de água (80,87%), sólidos solúveis (10,36 °brix), açúcares totais (10,69%) e redutores (3,20%), em relação ao endocarpo, e este apresentou os teores mais elevados de proteínas (3,19%), lipídios (0,54%), fibras totais (16,76%) e insolúveis (14,73%), pH (5,21) e acidez total titulável (0,63 meq NaOH/100g). O aminoácido predominante no mesocarpo foi o ácido aspártico e no endocarpo foi o ácido glutâmico, este foi escolhido para produzir o padrão de pigmento azul utilizado como referência para as análises quantitativas de pigmento azul. No planejamento experimental, as variáveis independentes, concentração de etanol (linear), tempo (quadrático), pH (linear) e a interação entre concentração de etanol e pH, mostraram influenciar a obtenção de pigmento azul ( $\alpha = 0,01$ ). Para a extração de genipina, as variáveis, concentração de etanol (linear), temperatura (linear), pH (linear e quadrático) e a interação entre tempo e pH, apresentaram influência significativa sobre a extração ( $\alpha = 0,05$ ). O ponto ótimo estimado através da desejabilidade global, para a maximização da extração dos dois compostos é dado pelas seguintes condições: 0% de etanol, 53 °C, 75 minutos e pH 7,0. Em relação à estabilidade, observou-se inicialmente, a síntese de pigmento azul sob todas as condições de luz e temperatura avaliadas,

seguida por uma fase de estabilização e então por um declínio, mais acentuado a 8200 lux e a 40 °C. Na cinética de degradação da genipina, o modelo de segunda ordem apresentou melhor ajuste para todas as condições e observou-se que o tempo de meia-vida decresce com o aumento da temperatura e da intensidade luminosa. A energia de ativação estimada para a genipina foi de 69,951 KJ/mol.

Palavras-chave: jenipapo, pigmento azul, genipina, estabilidade

## ABSTRACT

### Potential evaluation of blue pigment obtainment from unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit

The increase of market exigencies about the artificial colorants substitution, stimulate the search for new sources of natural colorants. In this context, the genipap (*Genipa americana* L.) fruit stands out, because from it on is possible to extract the blue pigment, substance with uncommon coloration still few researched. This research purpose was to characterize physically and physicochemically the unripe genipap fruits; to evaluate through experimental design the potential of blue pigment obtainment and genipin, the colorant precursor, from genipap endocarp and to evaluate the pigment and genipin stability under different temperatures (20, 30 e 40 °C) and luminosity (975, 3050 e 8200 lux). With regard to the physical characteristics, the fruits showed weight mean of 140,10 g and longitudinal and transversal diameters of 73,10 mm and 63,22 mm, respectively. The fruit mesocarp showed higher levels of moisture (80,87%), soluble solids (10,36 °brix), total sugars (10,69%) and reduction sugars (3,20%) than endocarp. And the endocarp showed higher proteins (3,19%), lipids (0,54%), total fibers (16,76%), insoluble fibers (14,73%), pH (5,21) and titulable total acidity (0,63 meq NaOH/100g). The predominant amino acid in the mesocarp was aspartic acid and in the endocarp was the glutamic acid. The glutamic acid was chosen to make part of blue pigment standard utilized as reference to blue pigment quantitative analysis. The variables ethanol concentration (linear), time (quadratic), pH (linear) and the interaction between pH and ethanol concentration in the experimental design, showed influence in the blue pigment obtainment ( $\alpha = 0,01$ ). To the genipin extraction, the variables ethanol concentration (linear), temperature (linear), pH (linear and quadratic) and the interaction between time and pH showed significant influence over the extraction ( $\alpha = 0,05$ ). The optimal point was estimated through global desirability, and its composed by the following conditions: 0% of ethanol, 75 minutes and pH 7,0. With regard the stability, the blue pigment synthesis has occurred initially under all of luminosity and temperature conditions evaluated, this situation was followed by a stability phase and then by a decline phase, it was stronger in 8200 lux and 40 °C than in the other situations. In the degradation genipin kinetic, the second order model showed the best adjustment



to all of evaluated conditions. The genipin half-life decrease when luminosity and temperature increase and its activation energy was 69,951 KJ/mol.

Key-words: genipap, blue pigment, genipin, stability

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Jenipapeiro.....	18
<b>Figura 2</b> – Frutos de jenipapo maduros.....	19
<b>Figura 3</b> – Fruto de jenipapo verde.....	20
<b>Figura 4</b> – Fruto de jenipapo oxidado.....	20
<b>Figura 5</b> – Divisão percentual do mercado de corantes no mundo (Total US\$940milhões).....	28
<b>Figura 6</b> – Reação de formação do pigmento azul a partir do geniposídeo.....	30
<b>Figura 7</b> – Reação de formação do pigmento azul a partir de genipina e ácido glutâmico.....	40
<b>Figura 8</b> – Sistema de extração.....	44
<b>Figura 9</b> – Fluxograma de extração do pigmento azul de jenipapo.....	45
<b>Figura 10</b> – Câmara de fotodegradação.....	49
<b>Figura 11</b> – Histograma de distribuição normalizada dos frutos por peso (g).....	52
<b>Figura 12</b> – Gráfico da regressão linear para os parâmetros físicos avaliados (peso, diâmetros longitudinal e transversal).....	54
<b>Figura 13</b> – Espectro de varredura da solução de pigmento azul a 36,945 mg/L.....	60
<b>Figura 14</b> – Regressão linear das soluções de pigmento azul a 605 nm.....	61
<b>Figura 15</b> – Espectro de varredura da solução de genipina a 5,998 mg/L.....	63
<b>Figura 16</b> – Regressão linear das soluções de genipina.....	63
<b>Figura 17</b> – Regressão linear das soluções de pigmento azul a 286 nm.....	64
<b>Figura 18</b> – Influência do pigmento azul na absorbância da genipina.....	65
<b>Figura 19</b> – Curva de correção da absorbância da genipina.....	66
<b>Figura 20</b> – Histograma dos resíduos estudentizados para correção da absorbância da genipina.....	67
<b>Figura 21</b> – Diagrama de Pareto para a extração de pigmento azul.....	70
<b>Figura 22</b> – Distribuição de resíduos para o rendimento de pigmento azul.....	73
<b>Figura 23</b> – Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de nível (à direita) para PA em função de pH e t.....	73
<b>Figura 24</b> – Diagrama de Pareto para a extração de genipina.....	76
<b>Figura 25</b> – Distribuição de resíduos para o rendimento de genipina.....	79
<b>Figura 26</b> – Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de nível (à direita) para genipina em função de pH e t.....	79

<b>Figura 27</b> – Gráficos da função desejabilidade.....	80
<b>Figura 28</b> – Gráficos da função desejabilidade, para $s = t = 10$ .....	82
<b>Figura 29</b> – Superfícies de resposta para a desejabilidade global (D).....	83
<b>Figura 30</b> – Curvas de nível para a desejabilidade global (D) .....	84
<b>Figura 31</b> – Efeito de diferentes intensidades luminosas sobre o pigmento azul .....	85
<b>Figura 32</b> – Efeito de diferentes temperaturas sobre o pigmento azul .....	87
<b>Figura 33</b> – Degradação de genipina em diferentes intensidades luminosas.....	89
<b>Figura 34</b> – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 975 lux.....	90
<b>Figura 35</b> – Ajuste do modelo de segunda ordem para 975 lux .....	90
<b>Figura 36</b> – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 3050 lux.....	91
<b>Figura 37</b> – Ajuste do modelo de segunda ordem para 3050 lux .....	92
<b>Figura 38</b> – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 8200 lux.....	92
<b>Figura 39</b> – Ajuste do modelo de segunda ordem para 8200 lux .....	93
<b>Figura 40</b> – Degradação de genipina em diferentes temperaturas.....	94
<b>Figura 41</b> – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 20 °C .....	95
<b>Figura 42</b> – Ajuste do modelo de segunda ordem para 20 °C .....	96
<b>Figura 43</b> – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 30 °C .....	96
<b>Figura 44</b> – Ajuste do modelo de segunda ordem para 30 °C .....	97
<b>Figura 45</b> – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 40 °C .....	98
<b>Figura 46</b> – Ajuste do modelo de segunda ordem para 40 °C .....	98
<b>Figura 47</b> – Relação entre degradação de genipina e temperatura.....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Codificações equivalentes entre FDA, UE e JMLHW para corantes alimentícios <sup>1</sup> .....	23
<b>Tabela 2</b> – Classificação dos pigmentos naturais em função da estrutura química ..	27
<b>Tabela 3</b> – Absortividade molar do pigmento azul a partir de cada aminoácido e iminoácido (prolina) .....	31
<b>Tabela 4</b> – Modelos para predição dos dados de degradação do pigmento .....	34
<b>Tabela 5</b> – Tempo de meia-vida segundo a ordem aparente de reação.....	35
<b>Tabela 6</b> – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional.....	42
<b>Tabela 7</b> – Variáveis e seus respectivos níveis do planejamento experimental.....	43
<b>Tabela 8</b> – Tabela de soluções tampão .....	43
<b>Tabela 9</b> – Características das câmaras de fotodegradação .....	48
<b>Tabela 10</b> – Distribuição de frequências por peso (g) dos frutos de jenipapo <sup>1</sup> .....	52
<b>Tabela 11</b> – Características físicas médias do fruto de jenipapo .....	53
<b>Tabela 12</b> – Distribuição de frequências em relação ao peso dos frutos .....	55
<b>Tabela 13</b> – Características físico-químicas do mesocarpo e endocarpo de jenipapo .....	56
<b>Tabela 14</b> – Perfil de aminoácidos totais do mesocarpo e do endocarpo (frescos e oxidados) de jenipapo .....	59
<b>Tabela 15</b> – Concentrações e absorbâncias médias das soluções de pigmento azul (605 nm) da curva de calibração .....	61
<b>Tabela 16</b> – Concentrações e absorbâncias médias das soluções de genipina da curva de calibração .....	63
<b>Tabela 17</b> – Concentrações e absorbâncias médias das soluções de pigmento azul (286 nm) da curva de calibração .....	64
<b>Tabela 18</b> – ANOVA de correção da absorbância de genipina.....	67
<b>Tabela 19</b> – Matriz do experimento.....	68
<b>Tabela 20</b> – Efeitos principais e de resposta para o rendimento de pigmento azul ..	69
<b>Tabela 21</b> – ANOVA para o rendimento de pigmento azul .....	71
<b>Tabela 22</b> – Coeficientes de regressão para o modelo proposto para o pigmento azul .....	72
<b>Tabela 23</b> – Efeitos principais e de resposta para o rendimento de genipina .....	75
<b>Tabela 24</b> – ANOVA para o rendimento de genipina .....	77

<b>Tabela 25</b> – Coeficientes de regressão do modelo proposto para o rendimento de genipina.....	78
<b>Tabela 26</b> – Equações de conversão dos níveis das variáveis de entrada para valores reais.....	81
<b>Tabela 27</b> – Variação na concentração de pigmento azul (g/L) exposto a diferentes intensidades luminosas em relação ao tempo.....	85
<b>Tabela 28</b> – Variação na concentração de pigmento azul (g/L) exposto a diferentes temperaturas em relação ao tempo.....	87
<b>Tabela 29</b> – Variação na concentração de genipina (g/L) exposta a diferentes intensidades luminosas em relação ao tempo.....	88
<b>Tabela 30</b> – Parâmetros dos modelos testados para as reações de fotodegradação da genipina.....	89
<b>Tabela 31</b> – Variação na concentração de genipina (g/L) exposta a diferentes temperaturas em relação ao tempo.....	93
<b>Tabela 32</b> – Parâmetros dos modelos testados para as reações de termodegradação da genipina.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- a – Absortividade específica ( $L\ g^{-1}\ cm^{-1}$ )
- ADI – Acceptable Dietary Intake
- $A_{GC}$  – Absorbância da genipina corrigida
- $A_{GPA}$  – Absorbância da genipina em solução contendo pigmento azul
- ANOVA – Análise de variância
- $A_{PA}$  – Absorbância do pigmento azul (286 nm) em solução
- $A_w$  – Atividade de água
- CE – Concentração de etanol (%)
- D – Desejabilidade global
- DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional
- $DL_{50}$  – Dose letal para 50% dos animais em estudo
- $E_a$  – Energia de ativação (KJ/mol)
- EtOH – Álcool etílico
- EU – Europe Union
- EUA – Estados Unidos da América
- $F_{calc}$  – F calculado
- FDA – Food and Drug Administration
- $F_{tab}$  – F tabelado
- G – Genipina
- JECFA – Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives
- JMHLW – Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare
- MeOH – Álcool metílico
- $mg_G/g_E$  – Miligramas de genipina por grama de endocarpo
- $mg_{PA-GLU}/g_E$  – Miligramas de pigmento azul de ácido glutâmico por grama de endocarpo
- PA – Pigmento azul
- pH – Potencial hidrogeniônico
- PVC – Policloreto de vinila
- R – Constante universal dos gases ( $8,31\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$ )
- RMF – Resíduo mineral fixo
- SCF – Scientific Committee for Food
- T – Temperatura ( $^{\circ}C$ )

t – Tempo

UV – Ultravioleta

$\epsilon$  – Absortividade molar

$\lambda_{\text{máx}}$  – Comprimento de onda máximo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 JENIPAPO.....	18
2.1.1 Descrição botânica.....	18
2.1.2 Origem e ocorrência.....	19
2.1.3 Utilização.....	20
2.2 HISTÓRIA DOS CORANTES ALIMENTÍCIOS.....	21
2.3 CORANTES EM ALIMENTOS .....	21
2.3.1 Corantes Sintéticos.....	25
2.3.2 Corantes Naturais.....	26
2.4 PIGMENTO AZUL .....	29
2.5 VIDA DE PRATELEIRA.....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	36
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO FRUTO DE JENIPAPO.....	36
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MESOCARPO E DO ENDOCARPO DO JENIPAPO .....	36
3.3.1 Umidade .....	37
3.3.2 Resíduo Mineral Fixo (RMF) .....	37
3.3.3 Proteínas .....	37
3.3.4 Lipídeos Totais .....	37
3.3.5 Fibra dietética .....	37
3.3.6 Acidez Total Titulável.....	38
3.3.7 Atividade de Água (Aw) .....	38
3.3.8 Potencial hidrogeniônico (pH).....	38
3.3.9 Sólidos solúveis .....	38
3.3.10 Perfil de Aminoácidos Livres e Totais .....	38
3.4 PADRÃO DE PIGMENTO AZUL .....	39
3.5 DOSAGEM DA GENIPINA RESIDUAL .....	41
3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	41
3.6.1 Processo de extração .....	44
3.6.2 Determinação do ponto ótimo do planejamento experimental .....	46
3.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PIGMENTO AZUL E DA GENIPINA.....	47



<b>3.7.1 Luz</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7.2 Temperatura</b> .....	<b>49</b>
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	49
<b>3.8.1 Caracterização física</b> .....	<b>49</b>
<b>3.8.2 Caracterização físico-química</b> .....	<b>50</b>
<b>3.8.3 Curvas de calibração (pigmento azul e genipina)</b> .....	<b>50</b>
<b>3.8.4 Avaliação da estabilidade do pigmento azul e da genipina</b> .....	<b>51</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>52</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO FRUTO DE JENIPAPO .....	52
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MESOCARPO E DO ENDOCARPO DO JENIPAPO .....	55
4.3 PERFIL DE AMINOÁCIDOS DO MESOCARPO E ENDOCARPO FRESCOS E OXIDADOS .....	58
4.4 PADRÃO DE PIGMENTO AZUL .....	60
4.5 DOSAGEM DE GENIPINA RESIDUAL .....	62
4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	67
<b>4.6.1 Influência das variáveis de entrada no rendimento de pigmento azul</b> .....	<b>69</b>
4.6.1.1 Modelo proposto e análise da qualidade .....	71
4.6.1.2 Superfície de resposta e curvas de nível para o pigmento azul .....	73
<b>4.6.2 Influência das variáveis de entrada no rendimento de genipina</b> .....	<b>74</b>
4.6.2.1 Modelo proposto e análise da qualidade .....	77
4.6.2.2 Superfície de resposta e curvas de nível para a genipina .....	79
<b>4.6.3 Determinação do ponto ótimo do planejamento experimental</b> .....	<b>80</b>
4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PIGMENTO AZUL E DA GENIPINA .....	84
<b>4.7.1 Pigmento azul</b> .....	<b>84</b>
4.7.1.1 Efeito da luz .....	84
4.7.1.2 Efeito da temperatura .....	86
<b>4.7.2 Genipina</b> .....	<b>88</b>
4.7.2.1 Efeito da luz .....	88
4.7.2.2 Efeito da temperatura .....	93
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>102</b>
<b>APÊNDICE A – Estrutura química de compostos corantes sintéticos</b> .....	<b>109</b>
<b>APÊNDICE B – Estruturas dos principais pigmentos naturais</b> .....	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cor é um dos principais atributos dos alimentos, pois está ligada ao grau de aceitabilidade daquele alimento pelo consumidor. Tendo em vista a importância do caráter visual do alimento, o homem desde tempos remotos, adiciona substâncias ou combina alimentos para tornar a cor final do alimento mais atrativa (MULTON, 1999; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007).

Com a revolução industrial, diversas substâncias corantes sintetizadas em laboratório foram desenvolvidas, principalmente a partir de derivados do petróleo e de metais pesados, o que resultou em diversos casos de problemas de saúde e até mortes. A partir deste momento surgiram os primeiros órgãos e políticas de controle dos tipos e quantidades de corantes empregados em alimentos (DOWNHAM; COLLINS, 2000; FREEMAN; PETERS, 2000).

Como alternativa aos produtos sintéticos ressurgiu o uso dos corantes naturais, extraídos de fontes vegetais ou animais, e que não só apresentam baixíssima toxicidade em relação aos sintéticos, como também têm demonstrado benefícios à saúde de quem os consome (MACDOUGALL, 2002; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007; SOCACIU, 2007).

Para atender esta demanda de mercado, que tem crescido mais expressivamente que o mercado de corantes sintéticos, novas matérias-primas fontes de corantes naturais têm sido pesquisadas (MACDOUGALL, 2002; SOCACIU, 2007). Neste contexto, pode-se destacar o fruto de jenipapo (*Genipa americana* L.), o qual quando em estágio verde de maturação apresenta uma substância denominada genipina que ao reagir com aminas primárias, tais como aminoácidos e proteínas, em presença de oxigênio, origina um pigmento de coloração azul (DJERASSI; GRAY; KINCL, 1960; PARK et al., 2002; LEE et al., 2003).

Apesar de este pigmento ter sido reportado na literatura pela primeira vez em 1963, existem poucos estudos sobre o assunto e muitas divergências com relação à metodologia de extração. Assim, este trabalho tem por objetivo caracterizar física e físico-quimicamente os frutos de jenipapo verdes; avaliar, o potencial de obtenção de pigmento azul e de genipina, seu precursor, a partir do endocarpo do referido fruto e avaliar ainda a estabilidade do pigmento e do precursor frente a diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C) e intensidades luminosas (975, 3050 e 8200 lux).

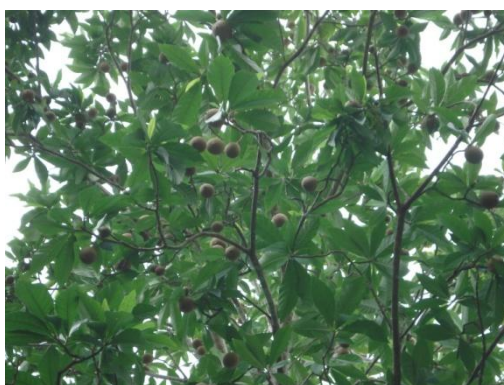
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 JENIPAPO

#### 2.1.1 Descrição botânica

O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) pertence à divisão Magnoliophyta (Angiospermae), à classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), à ordem Rubiales e à família Rubiaceae (SILVA et al., 2001).

A árvore (Figura 1) possui altura média de 6 a 8 m e 4 a 6 m de diâmetro de copa (SILVA et al, 1994). Tronco geralmente reto; casca pouco espessa, lisa, verde-acinzentada; ramificação verticilada, abundante, ramos inferiores geralmente horizontais. Folhas simples, opostas, decussadas, adensadas nas extremidades dos ramos, com estípulas interpeciolares largamente triangulares; limbo cartáceo, obovado ou oblongo-obovado de 10 a 35 cm de comprimento, base cuneada, face superior verde-escura brilhosa. Flores com corola branca ou amarelada, ligeiramente perfumada, cerca de 2 a 4 cm de altura (CAVALCANTE, 1991; MARTINS et al., 2002; SILVA; TASSARA, 2005).



**Figura 1 – Jenipapeiro**

Fonte: Autora.

O fruto (Figura 2) é do tipo baga subglobosa ou ovóide e quando maduro apresenta tamanho variando de 10 a 12 cm por 7 a 9 cm, peso entre 200-400 g, conservando no ápice, restos do tubo do cálice; casca fina que se torna engelhada; mesocarpo pardo-amarelado, esponjoso, cerca de 1,5 cm de espessura, com sabor

ácido-adocicado, e com aroma bastante característico (CAVALCANTE, 1991; ALMEIDA, 1998; MARTINS et al., 2002); a cavidade central contém em média  $295,8 \pm 75,7$  sementes envolvidas por uma membrana (CARVALHO; NASCIMENTO; MÜLLER, 1998).



**Figura 2 – Frutos de jenipapo maduros**

Fonte: PICSEARCH, 2008.

A frutificação ocorre entre os meses de setembro a dezembro e cada planta é capaz de produzir de 400 a 1000 frutos (SILVA et al., 1994). O fruto está apto para o consumo quando desprende da árvore e cai ao solo (SILVA; TASSARA, 2005).

### **2.1.2 Origem e ocorrência**

A árvore é originária da Amazônia, onde cresce naturalmente, especialmente em áreas de várzea, mas pode se estender para floresta aberta e zona de transição com a savana. Também é comum em florestas secundárias ou zonas abandonadas que foram utilizadas para a agricultura; tem preferência por solos levemente ácidos e com índice pluviométrico anual por volta de 1200 e 4000 mm (UNCTAD, 2005).

Esta planta é amplamente distribuída principalmente por áreas tropicais e subtropicais da América Latina, havendo registros de ocorrência de árvores de jenipapo na Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Equador, Estados Unidos, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Porto Rico, República Dominicana, Suriname e Venezuela (FRANCIS, 1993; GBIF, 2008). No Brasil, é encontrada nas regiões Norte, Centro-oeste, Nordeste e Sudeste (IPEF, 2008).

### 2.1.3 Utilização

O jenipapo é bastante consumido na forma de licor, mas também pode ser utilizado para fabricação de: compotas, refrescos, vinhos, xaropes e doces cristalizados. Apesar da facilidade de coleta e das diversas possibilidades de utilização do jenipapo, este não é produzido em escala comercial (CAVALCANTE, 1991; SILVA; TASSARA, 2005).

Quando em estágio verde de maturação (Figura 3), o fruto em contato com o ar escurece gradativamente, adquirindo uma coloração azul intensa (Figura 4), que é bastante utilizado pelos índios em pinturas corporais e de cerâmicas (CAVALCANTE, 1991). O nome jenipapo originou-se desta qualidade tintorial, derivando do tupi-guarani “nhandipab” ou “jandipab”, que significa “fruto que serve para pintar” (SILVA; TASSARA, 2005).



**Figura 3 – Fruto de jenipapo verde**  
Fonte: Autora.



**Figura 4 – Fruto de jenipapo oxidado**  
Fonte: Autora.

## 2.2 HISTÓRIA DOS CORANTES ALIMENTÍCIOS

Em tempos remotos, a maneira de colorir produtos alimentícios era através da mistura de produtos alimentícios ou incorporação de especiarias. Antes de 1850, todos os corantes adicionados a alimentos eram de origem natural (açafraão, cochonilha, caramelo e vermelho de beterraba) (MULTON, 1999).

Acompanhando a tendência da revolução industrial, a indústria alimentícia desenvolveu-se rapidamente, conjuntamente com a de aditivos. Em 1856 foi elaborado o primeiro corante sintético (mauvine) que deu impulso para desenvolvimento de outros (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

O uso de aditivos corantes sintéticos nos Estados Unidos foi regulamentado pela primeira vez através do “Ato do Congresso” em 2 de agosto de 1886, o qual permitia a adição de corantes em manteiga. A indústria de alimentos começou então a utilizar corantes a base de metais e minerais para camuflar a baixa qualidade e as adulterações nos alimentos, resultando em diversos problemas de saúde e até mortes (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Em maio de 1900, o Departamento de Agricultura americano lança o “Ato de apropriações (adequações)”, que reconhecia a possibilidade da ingestão de corantes utilizados em alimentos causar danos à saúde humana. A partir deste documento, a Secretaria de Agricultura do país foi designada para avaliar a relação entre ingestão de corantes e saúde e estabelecer normas para a utilização destes compostos (FREEMAN; PETERS, 2000).

Nas décadas de 1960 e 1970 surgiram, nos Estados Unidos, movimentos ativistas voltados contra a utilização de aditivos em alimentos. Estes movimentos se disseminaram pelo mundo e forçaram a indústria a tomar um novo foco: investir massivamente em alimentos mais saudáveis e na divulgação do valor nutricional destes (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002).

## 2.3 CORANTES EM ALIMENTOS

A cor é um dos atributos mais importantes no alimento, pois está associada a padrões de qualidade, como segurança, valor nutritivo e grau de maturidade. A percepção de sabores também é influenciada pela cor, uma vez que determinados tons de cor são associados a sabores específicos, por exemplo, uma bebida de

coloração verde é normalmente associada ao limão e à acidez elevada (MULTON, 1999; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007).

Os corantes são substâncias químicas, de origem natural ou sintética, que conferem cor (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). Estes produtos tinham inicialmente a função de melhorar a cor dos alimentos, perdida durante a industrialização, mas com o tempo verificou-se que a cor era uma característica valorizada pelos consumidores, o que levou a indústria a atuar neste campo colorindo os mais diferentes tipos de produtos alimentícios, melhorando por consequência, suas vendas (CALIL; AGUIAR, 1999).

Entre os objetivos da utilização de corantes em alimentos pode-se ressaltar: melhoria da aparência do alimento e sua associação a características visuais de qualidade; restauração e intensificação da cor original, buscando maior uniformidade da cor no alimento; adição de valor nutritivo ao alimento; e atuação como antioxidante durante o armazenamento, protegendo sabores e vitaminas contra outros compostos (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002; SOCACIU, 2007).

A tecnologia busca obter um corante seguro, estável, reprodutível e eficaz. É de grande interesse a possibilidade de utilização da menor dose possível de corante, assim como a sua capacidade de fixar-se às moléculas do alimento. A adição de corantes não deve ser feita para dissimular alterações ou para fazer supor a presença de outro constituinte, por exemplo, a adição de um corante amarelo em biscoitos para dar a impressão de presença de manteiga no produto (MULTON, 1999).

A escolha de determinado corante a ser aplicado em um alimento deve levar em consideração: coloração desejada; estado físico do corante (depende da matriz alimentícia a ser colorida); e estabilidade do pigmento. Este último item deve ser avaliado minuciosamente, uma vez que fatores, como composição físico-química (nutrientes, pH, atividade de água e presença de agentes óxido-redutores); condições de processamento (especialmente se houver aplicação de calor), embalagem e armazenamento, podem alterar de forma indesejada e irreversível o pigmento. Outros fatores, como legislação vigente e custo também são influentes e determinantes nesta seleção (MACDOUGALL, 2002; DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002).

A adição de corantes aos alimentos ocorre no mundo inteiro, porém a legislação que regulamenta os tipos e as formas de aplicação dos corantes alimentícios varia amplamente entre os países (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002). Entretanto, três órgãos regulamentadores destacam-se pela elaboração das normas que são utilizadas como referências por diversos países no mundo: *Food and Drug Administration* (FDA – EUA); União Européia (UE); e o *Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare* (JMHLW – Japão) (FREEMAN; PETERS, 2000).

Nos Estados Unidos, os corantes são classificados como certificados ou isentos de certificação, nos primeiros enquadram-se os sintéticos não encontrados na natureza e são assim classificados, devido a sua utilização só ser permitida após avaliação e aprovação da FDA, que verifica a adequação do produto aos padrões de qualidade estabelecidos pelo governo e o codifica por meio do número de certificação. A classe dos corantes isentos de certificação engloba os corantes naturais e sintéticos idênticos aos naturais. Nos Estado Unidos, para fins alimentícios, são permitidos 26 corantes isentos de certificação e 9 sujeitos à certificação (FDA, 2009; DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002; SOCACIU, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). Na Tabela 1 podem-se observar alguns corantes sintéticos permitidos pela FDA e os respectivos códigos na EU e no JMHLW.

**Tabela 1** – Codificações equivalentes entre FDA, UE e JMLHW para corantes alimentícios<sup>1</sup>

<b>NOMENCLATURA/CODIFICAÇÃO</b>			
<b>Popular</b>	<b>FDA</b>	<b>UE</b>	<b>JMHLW</b>
Azul brilhante FCF	FD&C Blue nº 1	E133	nº 184
Índigo Carmim	FD&C Blue nº 2	E132	nº 185
Verde rápido FCF	FD&C Green nº 3	E143 <sup>2</sup>	nº 183
Eritrosina	FD&C Red nº 3	E127	nº 175
Vermelho allura AC	FD&C Red nº 40	E129	nº 176
Tartrazina	FD&C Yellow nº 5	E102	nº 181
Amarelo crepúsculo FCF	FD&C Yellow nº 6	E110	nº 182

<sup>1</sup> Tomando-se por base os corantes permitidos pela FDA.

<sup>2</sup> Corante proibido na UE.

Fonte: PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO (1994); FDA, 2009; THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION (2009).



As diretrizes da União Européia são baseadas nas recomendações do *Scientific Committee for Food* (SCF); do *Codex Alimentarius Commission* e do *Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives* (JECFA). Atualmente a União Européia autoriza 43 corantes para alimentos, dentre os quais 17 são sintéticos e 26 são naturais ou idênticos aos naturais e a codificação é feita pelo “E número” (letra E seguida de um código numérico) (PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO, 1994; SOCACIU, 2007).

No Japão, os aditivos são divididos em duas listas, uma contendo os aditivos de origem natural, denominada “Lista de aditivos alimentares existentes” e a outra com substâncias sintéticas, denominada “Lista de aditivos designados”. O Japão permite 18 corantes sintéticos para alimentos, mas todos com restrições específicas de utilização (THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2009).

O JECFA é ligado ao *Codex Alimentarius* e trabalha em nível global avaliando a segurança dos aditivos para alimentos. O objetivo é tentar estabelecer níveis de utilização destes produtos que sejam aceitos e aplicados internacionalmente. Este órgão preconiza as “doses diárias aceitáveis” (ADI – acceptable dietary intake) de aditivos (incluindo corantes), que é expressa em “mg do aditivo/kg de peso corporal”, estes valores são determinados por meio de estudos de toxicidade crônica. Para a toxicidade aguda determina-se o valor DL<sub>50</sub> que representa a dose que provoca a morte de 50% dos animais em estudo em um dado período especificado pela pesquisa (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002; SOCACIU, 2007).

No Brasil, a legislação define corante como a “substância que confere ou intensifica a cor dos alimentos” (BRASIL, 1997). A lista de corantes permitidos, bem como a sua utilização é específica para cada classe de alimento e regulamentada por legislações diferentes, por exemplo, molhos e condimentos (BRASIL, 2007a); bebidas não alcoólicas, não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas (BRASIL, 2007b); geléias (BRASIL, 2007c); e petiscos (snacks) (BRASIL, 2008). A legislação admite a solicitação de inclusão e exclusão de aditivos, desde que sejam tomadas por base principalmente as recomendações do *Codex Alimentarius* e da União Européia e complementarmente o estabelecido pelo FDA (BRASIL, 1997).

O Ministério da Saúde, seguindo as normas do Codex, proíbe o uso dos seguintes corantes sintéticos: amarelo ácido ou amarelo sólido (13015), azul de indantreno ou azul de alizarina (69800), laranja GGN (15980) vermelho sólido E (16045) e escarlate GN (14815) (BRASIL, 1987).

### 2.3.1 Corantes Sintéticos

Os corantes sintéticos podem ser agrupados nas seguintes classes principais: azo, triarilmetano, quinolina, xanteno e indigóide (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). Os corantes do tipo azo fornecem cores nas faixas do amarelo, laranja, vermelho e marrom; os triarilmetanos são comumente, verde ou azul; a quinilona é amarela; os xantenos incluem uma faixa de vermelho e apresentam fluorescência e os indigóides apresentam-se na faixa do azul (NOLLET, 2000). As estruturas de alguns representantes de cada classe encontram-se no Apêndice A.

Dentre as vantagens dos corantes sintéticos pode-se citar o alto poder tintorial, o que leva à necessidade de utilização de pequenas quantidades para atingir a cor desejada; baixo custo; e elevada estabilidade ao processamento e ao armazenamento. Como desvantagem tem-se que os corantes sintéticos podem reagir com metais livres no alimento, levando à formação de sais e precipitados (UNTCAD, 2005).

Os corantes artificiais possuem ainda, maior poder de fixação do que os naturais, propiciando cores mais intensas, aumentando o número de tonalidades, com maior estabilidade e menor custo. Os naturais, em contrapartida, sofrem influência de variações de temperatura e umidade o que pode deixar a coloração irregular e o aspecto do produto pouco agradável (CALIL; AGUIAR, 1999).

Estudos têm comprovado a correlação entre a ingestão de corantes sintéticos artificiais e alguns efeitos colaterais. A tartrazina, por exemplo, tem sido associada a reações alérgicas, como urticária, asma e rinite. Corantes como ponceau 3R, amarelo manteiga, vermelho metil, laranja SS e criosidina têm demonstrado potencial carcinogênico (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). O verde S demonstrou efeito mutagênico em células somáticas de mamíferos (SABIR, 2006).

Outro motivo de preocupação com os corantes artificiais é o elevado conteúdo de metais pesados, que por vezes, extrapolam os limites estabelecidos pela legislação (LINDINO et al., 2008).

Em virtude destes fatores, os corantes sintéticos para alimentos estão entre os aditivos mais submetidos a extensas análises toxicológicas (HUNGER, 2003). Nos Estados Unidos, por exemplo, os corantes sintéticos permitidos enquadram-se na classe “certificados” e cada lote produzido deve ser submetido a análises nos laboratórios da FDA, para certificar as conformidades com a lei, de tal forma que

estes corantes apresentam normalmente pureza que varia de 86 a 96%, tendo como concentração média de substância corante no produto de 2 a 3% (FDA, 2009; UNTCAD, 2005).

Alguns países, como a Noruega, já proíbem a utilização de qualquer corante sintético na fabricação de alimentos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). E apesar das vantagens dos corantes sintéticos em relação aos naturais, o interesse por produtos artificiais tem diminuído (UNTCAD, 2005).

### **2.3.2 Corantes Naturais**

Os pigmentos naturais são substâncias que absorvem a luz na faixa do visível, esta absorção é proporcionada por uma estrutura (cromóforo) capaz de capturar energia de uma fonte radiante, entretanto uma parte desta energia é refletida e/ou refratada, a qual é então captada pelos olhos e gera um impulso nervoso, que é transmitido ao cérebro, onde a cor é interpretada (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002). O cromóforo é a molécula que absorve em um comprimento de onda específico na região do visível, atribuindo cor (KUEHNI, 2004). Nos corantes, a característica de absorção no espectro e o coeficiente de extinção são determinados pelo cromóforo e, mais raramente, pela cadeia lateral da molécula (SOCACIU, 2007).

Os pigmentos estão amplamente distribuídos na natureza em frutas, vegetais, sementes e raízes (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Substâncias coloridas podem ainda ser formadas durante o processamento ou armazenamento de alimentos, como os caramelos e os produtos da reação de Maillard (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

A diversidade de fontes propicia uma ampla variação de propriedades físicas e químicas, tais como solubilidade e grau de estabilidade a exposição à luz, variações de temperatura e pH (DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Os corantes naturais mais conhecidos representam uma ampla faixa de coloração que varia do verde ao vermelho, passando pelo amarelo e pelo laranja; podendo-se ainda encontrar tons, como marrom e preto. Tecnicamente, os corantes naturais são mais complexos que os artificiais, pois são normalmente mais sensíveis a influência da luz, pH, temperatura, umidade relativa e composição gasosa (MACDOUGALL, 2002).

Os pigmentos naturais podem ser agrupados em quatro classes principais de compostos: tetrapirrólicos, tetraterpenóides, heterocíclicos oxigenados (quinonas) e heterocíclicos nitrogenados (BOBBIO; BOBBIO, 2003), características de cada classe podem ser observados na Tabela 2. As estruturas dos principais corantes naturais encontram-se no Apêndice B.

**Tabela 2 – Classificação dos pigmentos naturais em função da estrutura química**

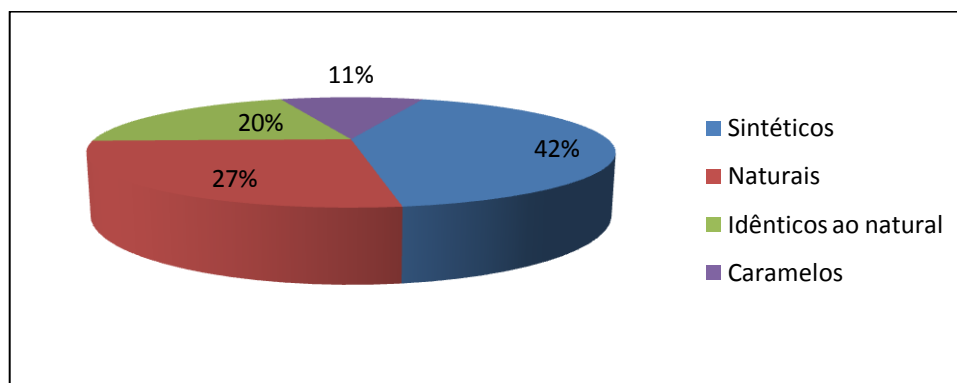
<b>Grupo</b>	<b>Pigmento</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Cor</b>	<b>Ocorrência</b>
<b>Tetrapirrólicos</b>	Compostos Heme	Oxi- hemoglobina	Vermelho	Carnes frescas
		Mioglobina	Púrpura/vermelho	
		Metimioglobina	Marrom	Carnes embaladas
	Clorofilas	Clorofila a	Azul-verde	Brócolis, alface,
Clorofila b		Verde	espinafre	
	Bilinas	Bilirrubina	Amarelo	Fígado
<b>Tetraterpenóides</b>	Carotenóides	Carotenos	Amarelo-laranja	Cenoura, laranja, pêssego, pimenta
		Licopeno	Laranja-vermelho	Tomate
<b>O-heterocíclicos (quinonas)</b>	Flavonóides	Antocianinas	Laranja/vermelho/azul	Uva, repolho roxo, rabanete
		Flavonoides	Branco-amarelo	Cebola, couve-flor
		Taninos	Vermelho-marrom	Vinho envelhecido
<b>N-heterocíclicos</b>	Betalaínas	Betanina	Púrpura/vermelho	Beterraba
		Betaxantina	Amarelo	Acelga, pêra

Fonte: Adaptado de BOBBIO; BOBBIO (2003); DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA (2007).

O conhecimento sobre os processos bioquímicos e fisiológicos de biossíntese e catabolismo dos pigmentos vegetais é fundamental para compreender os mecanismos responsáveis pela formação dos diferentes pigmentos em frutos. Onde se deve avaliar possíveis relações entre o estágio de maturação e a formação do pigmento; a influência dos tratamentos pós-colheita na retenção/degradação do corante; além dos principais fatores interferentes na estabilidade e principais alterações relacionadas ao tipo de processamento (MACDOUGALL, 2002).

Dados estatísticos a cerca do mercado de corantes são escassos, pois em geral são pesquisas particulares financiadas pelas próprias indústrias de corantes,

mas Downham e Collins (2000) estimaram que em nível mundial atinja por volta de 940 milhões de dólares.



**Figura 5** – Divisão percentual do mercado de corantes no mundo (Total US\$940 milhões)

Fonte: Adaptado de DOWNHAM; COLLINS (2000).

Apesar de a fatia de mercado pertinente aos corantes sintéticos ainda ser a maior, observa-se que o mercado de corantes naturais tem crescido duas vezes mais rápido que o de corantes sintéticos em virtude da demanda por produtos naturais, uma vez que muitos benefícios à saúde têm sido associados ao consumo destas substâncias, o que está estimulando o interesse do consumidor por estes produtos e a substituição dos corantes artificiais (MACDOUGALL, 2002; SOCACIU, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007). Em virtude desta tendência, acredita-se que gradualmente os corantes naturais substituirão grande parte dos sintéticos, já que os preços dos pigmentos naturais estão se tornando cada vez mais estáveis (UNCTAD, 2005).

Mesmo com a alta demanda por novas fontes de corantes naturais, alguns empecilhos dificultam a rápida emergência de novos pigmentos: o tempo e o custo de testes de segurança e o lento processo de aprovação legal. Para que os pigmentos naturais possam competir igualmente com os sintéticos, são necessários maiores investimentos em pesquisas com novas fontes e métodos de extração mais eficientes de corantes naturais (MACDOUGALL, 2002; SOCACIU, 2007).

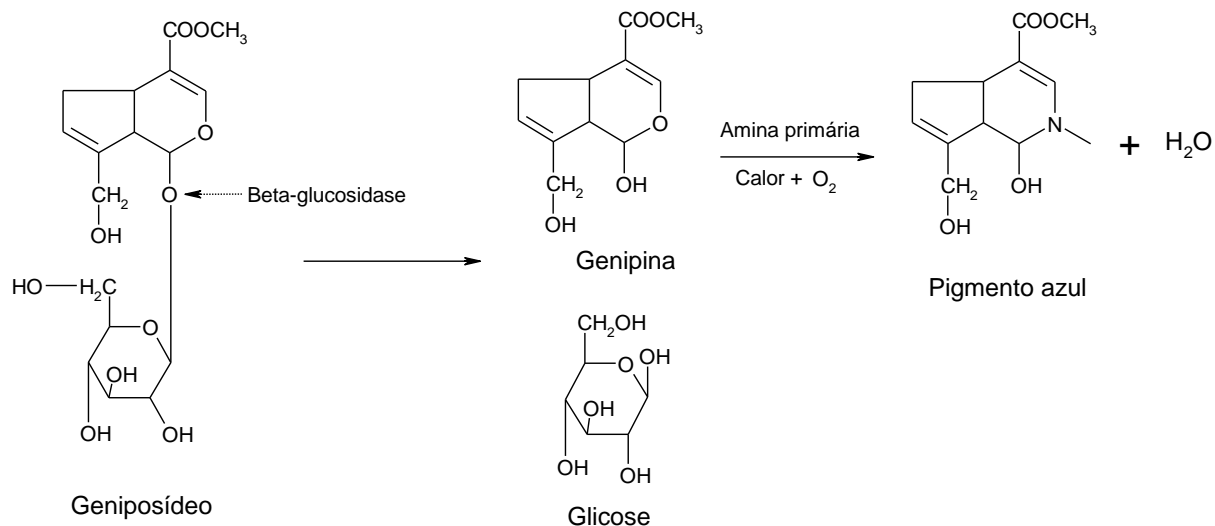
## 2.4 PIGMENTO AZUL

Os iridóides constituem um grupo de monoterpenóides que apresentam esqueletos metilciclopentanos, podendo ser aldeídos, álcoois, lactonas, ésteres, e alcalóides. Estes compostos existem na forma livre e glicosilada e têm chamado a atenção da comunidade científica por sua capacidade de reagir com aminas primárias e formar compostos coloridos que variam entre o verde e o amarelo, podendo ainda produzir compostos de cor vermelha e azul (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002; MACDOUGALL, 2002; SOCACIU, 2007).

Os compostos iridóides são encontrados em plantas dicotiledôneas avançadas, tais como o açafrão (*Crocus sativus L.*) e os frutos do jasmim do cabo (*Gardenia jasminoides*), que são as mais conhecidas fontes destes compostos; porém outras fontes de iridóides têm sido identificadas (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002), dentre as quais se podem destacar a *Genipa americana L.* que pertence à mesma família da *Gardenia jasminoides* (família *Rubiaceae*) e apresenta em seus frutos (jenipapo), um iridóide glicosídeo incolor denominado geniposídeo ( $C_{17}H_{24}O_{10}$ ), o qual possui as seguintes propriedades: ponto de fusão (163 a 164 °C); UV  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (EtOH) 236,5 nm e  $\log \epsilon$  4,08. O geniposídeo ao ser hidrolisado pela  $\beta$ -glucosidase libera sua respectiva aglicona, denominada genipina ( $C_{11}H_{14}O_5$ ), também incolor (DJERASSI; GRAY; KINCL, 1960; ENDO; TAGUCHI, 1973).

A genipina foi extraída e isolada pela primeira vez de frutos de jenipapo por Djerassi, Gray e Kincl (1960), a partir da porção central destes frutos, onde se localizam as sementes envolvidas por um tecido conectivo que as mantêm unidas. Neste estudo foram determinadas algumas propriedades da genipina, como ponto de fusão (120 a 121 °C), UV  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (MeOH) 240 nm e  $\log \epsilon$  4,12.

A reação da genipina com aminas primárias, tais como aminoácidos e proteínas, origina um pigmento de coloração azul. O mesmo não acontece quando a genipina reage com aminas secundárias e terciárias (DJERASSI; GRAY; KINCL, 1960; PARK et al., 2002; LEE et al., 2003). A reação de formação do pigmento azul, simplificada, pode ser observada na Figura 6.



**Figura 6** – Reação de formação do pigmento azul a partir do geniposídeo

Fonte: Adaptado de CHO et al. (2006).

O pigmento azul tem sido descrito como uma mistura de polímeros de alto peso molecular, que seria formada a partir da desidrogenação de vários pigmentos intermediários (com cores que variam do vermelho ao marrom) e da polimerização radical induzida pelo oxigênio (TOUYAMA et al., 1994). O mecanismo detalhado de formação do pigmento azul ainda não é conhecido (PARK et al., 2002). No entanto, algumas propriedades do corante já foram descritas como peso molecular médio de  $8970 \pm 600$ ; UV  $\lambda_{\text{máx}}$  (MeOH) 283 e 599 nm e  $\log \epsilon$  4,14 e 4,73 (pigmento produzido a partir da reação da genipina com metilamina). O polímero apresenta, em média, 40 a 44 unidades monoméricas (TOUYAMA et al., 1994).

Lee et al. (2003) observaram que a reação da genipina com cada aminoácido, isoladamente, em solução etanólica, produz o pigmento azul com absorvidade molar específica (Tabela 3).

**Tabela 3** – Absortividade molar do pigmento azul a partir de cada aminoácido e iminoácido (prolina)

<b>Aminoácidos</b>	<b>Absortividade molar (cm mM)<sup>-1</sup></b>
Lisina	11090 ± 39,4
Glicina	10272 ± 10,8
Alanina	7087 ± 8,5
Tirosina	6761 ± 13,6
Fenilalanina	6374 ± 8,0
Arginina	5977 ± 6,3
Asparagina	5879 ± 5,3
Metionina	5692 ± 5,4
Triptofano	5155 ± 1,3
Glutamina	4823 ± 3,6
Leucina	4795 ± 5,0
Histidina	3555 ± 2,5
Isoleucina	3377 ± 2,2
Valina	3058 ± 1,9
Serina	2562 ± 1,4
Ácido Glutâmico	2343 ± 1,4
Ácido Aspártico	1996 ± 1,2
Treonina	1915 ± 1,3
Prolina	1721 ± 0,8
Cisteína	1081 ± 0,8

Fonte: Adaptado de LEE et al. (2003).

Para extração do geniposídeo objetivando a produção de pigmento azul, a metodologia proposta por Endo e Taguchi (1973) é a mais empregada, entretanto, algumas pesquisas divergem quanto às condições ótimas de obtenção do corante. Para Lee et al. (2003), pH 7,0 e utilização dos aminoácidos lisina, glicina e fenilalanina são as mais adequadas para o pigmento azul de *Gardenia jasminoides*, no entanto, em relação à temperatura estes pesquisadores observaram que o aumento da temperatura eleva a produção de corante, onde a maior temperatura testada (90 °C) apresentou maior rendimento.

Para o mesmo pigmento, Cho et al. (2006), obtiveram como condições ótimas, pH entre 4,5 – 6,0; temperatura de 55°C e utilização dos aminoácidos glicina, tirosina e alanina, acrescentando ainda que a proporção ideal entre genipina



e aminoácido deve ser de 1:1 e que a isolase e a  $\beta$ -glucosidade foram as enzimas mais efetivas na liberação da aglicona (genipina).

Ensaio preliminares feitos por Nazaré et al. (1996) no jenipapo ressaltam que o extrato do fruto de jenipapo verde obtido com hidróxido de sódio a 0,1% apresenta coloração azul-anil, e que frutos maduros submetidos à extração com diferentes solventes fornecem um extrato amarelo cristalino. Penalber et al. (1996) utilizaram em seu estudo, também com jenipapo verde, água e etanol separadamente como solventes, obtendo corantes de coloração azul intensa que passaram a negro gradativamente, observando-se que esta mudança foi acelerada por temperaturas superiores a 80°C.

O pigmento azul é solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos (apolares), como hexano, no entanto, é solúvel em soluções hidroalcoólicas, como de etanol e de metanol, onde a sua solubilidade aumenta, obviamente, proporcionalmente com o aumento na concentração de água na solução (TOUYAMA et al., 1994; MORITOME; KISHI; FUJII, 1999). Diferentemente da maioria dos corantes naturais, o pigmento azul destaca-se por sua elevada estabilidade a variações de pH, temperatura e intensidade luminosa (MORITOME; KISHI; FUJII, 1999; PAIK et al., 2001; CHO et al., 2006). Paik et al. (2001) em estudo sobre a estabilidade do pigmento azul observaram que o pigmento não parece seguir uma cinética de primeira ordem.

Com relação à toxicidade, Youshizumi et al (apud IMAZAWA et al., 2000) não observaram efeitos tóxicos em ratos DDY de ambos os sexos alimentados durante 5 meses com dieta contendo 0,5%; 1,5%; e 4,5% de corante azul de *Gardenia jasminoides*. Tem sido reportado em literatura sobre a toxicidade aguda e subaguda do corante azul de *Gardenia jasminoides* os valores de DL<sub>50</sub> > 16,7g/kg para ratos machos DDY e de 10 g/kg para ratos SD de ambos os sexos (YOUSHIZUMI et al., 1980 apud IMAZAWA et al., 2000).

Imazawa et al. (2000) avaliaram o potencial carcinogênico do pigmento azul obtido de *Gardenia jasminoides* em ratos F344, de ambos os sexos, com dieta contendo concentrações de 2,5% e 5,0% por 104 semanas. Os pesquisadores não observaram diferenças significativas na mortalidade, nos sinais clínicos e hematológicos dos ratos que receberam pigmento na dieta em relação aos controles.

O corante azul de *Gardenia jasminoides* já é reconhecido pelo governo japonês e pertence à lista de aditivos de origem natural, e é definido como: “substância obtida pela adição de  $\beta$ -glucosidase à mistura de iridóides glicosídeos, obtidos de frutos da *Gardenia* e substâncias protéicas decompostas” (THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2009).

Este corante é utilizado pela indústria alimentícia no leste asiático e no Japão, em balas, condimentos, licores, etc. (PARK et al., 2002; MACDOUGALL, 2002), em doses que variam em média de 0,01% a 0,1% (IMAZAWA et al., 2000); mas ainda não é reconhecido pelo FDA, nem pela União Européia (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2002).

## 2.5 VIDA DE PRATELEIRA

Os alimentos são compostos de origem biológica e, por isso, determinadas transformações químicas e bioquímicas são inevitáveis, e excetuando-se as relacionadas à maturação de vegetais, queijos e vinhos, provocam modificações indesejáveis que limitam a vida de prateleira do alimento, como oxidação, hidrólise, escurecimento enzimático e não-enzimático (MAN, 2002).

A vida de prateleira de um produto pode ser definida como o período em que o produto permanece seguro; e retém características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas. Os modelos cinéticos de aproximação são bastante utilizados para teste de aceleração da vida de prateleira e estão baseados nos seguintes fatores: seleção do fator cinético do processo de deterioração; avaliação dos parâmetros do modelo cinético, extrapolando os resultados para condições normais de estocagem; e utilização do modelo cinético de degradação para prever a vida de prateleira sob condições de estocagem específicas (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000).

O modelo de ordem aparente zero, expressa a concentração por unidade de tempo. No modelo de primeira ordem, a taxa de degradação é proporcional a concentração em determinado tempo “t”. O modelo de segunda ordem descreve a degradação (a uma taxa constante) pelo inverso da concentração. A Tabela 4 apresenta os três modelos comentados anteriormente (CHOW, 2007).

**Tabela 4 – Modelos para predição dos dados de degradação do pigmento**

<b>Ordem da reação</b>	<b>Modelos</b>
Ordem Zero	$C = C_o - kt$
Primeira Ordem	$C = C_o e^{-kt}$
Segunda Ordem	$C = \frac{1}{kt + \frac{1}{C_o}}$

C = concentração final; C<sub>o</sub> = concentração inicial; k = constante; t = tempo.

A taxa das reações químicas, com raras exceções, aumenta rapidamente com a elevação da temperatura. Avante Arrhenius propôs pela primeira vez, em 1889, a relação entre a taxa constante  $k$  e a temperatura, expressa pela Equação 1 (MAN, 2002):

$$k = A e^{\left(\frac{-E_a}{RK}\right)} \quad (1)$$

onde:

A = fator freqüência ou fator pré-exponencial;

E<sub>a</sub> = energia de ativação;

R = constante universal dos gases (8,31 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>);

K = temperatura absoluta em Kelvin.

O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) é aquele necessário para degradação de 50% da concentração inicial da espécie avaliada. Segundo Taoukis, Labuza e Saguy (1997) é possível estabelecer uma relação entre a ordem aparente da reação e o tempo de meia-vida da espécie. As relações estão descritas na Tabela 5:

**Tabela 5 – Tempo de meia-vida segundo a ordem aparente de reação**

<b>Ordem aparente da reação</b>	<b>Tempo de meia-vida (<math>t_{1/2}</math>)<sup>1</sup></b>
Ordem Zero	$t_{1/2} = \frac{C_o}{2k}$
Primeira Ordem	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$
Segunda Ordem	$t_{1/2} = \frac{1}{kC_o}$

$C_o$  = concentração inicial;  $k$  = constante de velocidade de degradação.

<sup>1</sup> Segundo Taoukis; Labuza; Saguy (1997).

Freqüentemente e erroneamente admite-se que a deterioração acelerada pode ser alcançada pela elevação da temperatura de estocagem, usando o modelo de Arrhenius, o qual é adequado somente para sistemas químicos simples e falha com freqüência em sistemas alimentícios complexos, pois alguns processos podem ocorrer em temperaturas elevadas e mudar o processo de deterioração, tais como: mudança de fase provocada pela fusão das gorduras; cristalização de carboidratos amorfos; mudança na taxa relativa da reação química com alteração da energia de ativação; aumento da atividade de água; desnaturação protéica; e redução da solubilidade de gases. É importante avaliar as condições aceleradas em relação às características de deterioração conhecidas e estabelecer limites de reprodutibilidade para a relação encontrada (KILCAST; SUBRAMANIAM, 2000).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

Para a extração do pigmento azul, foram utilizados frutos de jenipapo (*Genipa americana* L.) no estágio verde de maturação, os quais foram adquiridos no mercado do Ver-o-peso, provenientes da Ilha das Onças, zona do distrito de Belém (PA), em janeiro de 2009.

Os frutos foram lavados com escova para remoção de sujidades superficiais; em seguida foram submetidos à sanitização com água clorada (180 mg de cloro ativo por litro de água), por 15 minutos; e por fim embalados em sacos plásticos de polietileno e submetidos ao congelamento a -18 °C até o momento das análises.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO FRUTO DE JENIPAPO

A caracterização física foi realizada no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), da Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

Avaliou-se 50 (cinquenta) frutos frescos (não-congelados), em relação aos seguintes parâmetros: peso do fruto e medida dos diâmetros transversal e longitudinal, por meio de paquímetro mecânico, da marca Mitutoyo, série 530-104BR. Avaliou-se ainda o rendimento (%) de endocarpo por fruto.

#### 3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MESOCARPO E DO ENDOCARPO DO JENIPAPO

Todas as análises deste item foram realizadas para o mesocarpo (polpa) e para o endocarpo (porção central do fruto constituída de sementes unidas por tecido conectivo) do fruto. As análises foram efetuadas em triplicata, excetuando-se a análise de fibra dietética que foi realizada em quadruplicata, e a análise de determinação do perfil de aminoácidos que foi realizada em duplicata.

### **3.3.1 Umidade**

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C, até peso constante, de acordo com a AOAC (1997), método nº 925.10.

### **3.3.2 Resíduo Mineral Fixo (RMF)**

O resíduo mineral fixo ou cinzas foi determinado pelo método gravimétrico, por incineração em forno mufla a 550°C, até peso constante, de acordo com a AOAC (1997), método nº 940.26.

### **3.3.3 Proteínas**

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, com fator de correspondência nitrogênio-proteína de 6,25; de acordo com a AOAC (1997), método nº 920.152.

### **3.3.4 Lipídeos Totais**

O teor de lipídeos totais foi determinado por extração com mistura de solventes (água, metanol e clorofórmio) a frio, conforme descrito por Bligh e Dyer (1959).

### **3.3.5 Fibra dietética**

As fibras dietéticas totais e insolúveis foram determinadas pelos métodos enzimático-gravimétrico, nº 985.29 e nº 991.42, respectivamente, utilizando as enzimas alfa-amilase termo-resistente, protease, amiloglucosidase, de acordo com AOAC (1997). As fibras solúveis foram determinadas por diferença entre as fibras totais e as insolúveis.

### **3.3.6 Acidez Total Titulável**

A acidez total titulável foi determinada por titulação com NaOH, de acordo com a AOAC, método nº 942.15 (1997).

### **3.3.7 Atividade de Água (Aw)**

A atividade de água foi determinada por leitura direta em termohigrômetro digital, com controle interno de temperatura ( $\cong 25^{\circ}\text{C}$ ), da marca Decagon, Aqualab Séries 3TE modelo TE 8063.

### **3.3.8 Potencial hidrogeniônico (pH)**

O pH foi determinado por leitura direta em potenciômetro da marca Marconi, modelo PA 200, de acordo com a AOAC (1997), método nº 943.02.

### **3.3.9 Sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis totais (expressos como °Brix) foi determinado por leitura direta a  $20^{\circ}\text{C}$ , em refratômetro óptico da marca ATAGO CO. LTD modelo N1, de acordo com o método nº 932.12 da AOAC (1997).

### **3.3.10 Perfil de Aminoácidos Livres e Totais**

Foram quantificados no Laboratório de Fontes Protéicas da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da UNICAMP. O método consiste em uma hidrólise da amostra com ácido clorídrico a 6 N, durante 24 horas. Os aminoácidos liberados na hidrólise ácida são reagidos com fenilisotilcianato (PITC), separados por HPLC em fase reversa e detectados por UV a 254 nm. A quantificação é feita por calibração interna multinível, com auxílio do ácido  $\alpha$ -aminobutírico (AAAB) como padrão interno. Esta análise é baseada na metodologia descrita por White, Hart e Fry (1986) com as seguintes adaptações: utilização de uma coluna de baixo custo comercial em relação às colunas utilizadas neste tipo de análise; e aumento do diâmetro interno do tubo de 6 para 8 mm reduzindo o tempo de preparo da amostra.

Utilizou-se nas determinações, cromatógrafo líquido de alta eficiência TSP - *Thermo Separation Products*, com bomba quaternária degaseificadora, acoplado a um detector de UV, para leitura a 254 nm, modelo SPECTRO SYSTEM UV2000, operando com o software PC 1000 e a coluna LUNA C18 100 Å 5 µm 250x4,6 mm 00G-4252-EQ. A análise foi efetuada no mesocarpo e no endocarpo frescos e após serem submetidos a oxidação, por exposição direta ao ambiente durante duas horas.

### 3.4 PADRÃO DE PIGMENTO AZUL

Há diversas possibilidades de reação da genipina com aminas primárias, aminoácidos livres, peptídeos e proteínas presentes no fruto, além disso, a polimerização do pigmento é uma etapa natural, e que possibilita a formação de diversas estruturas com características de absorção da luz no visível semelhantes (DJERASSI; GRAY; KINCL, 1960; TOUYAMA et al., 1994; PARK et al., 2002; LEE et al., 2003).

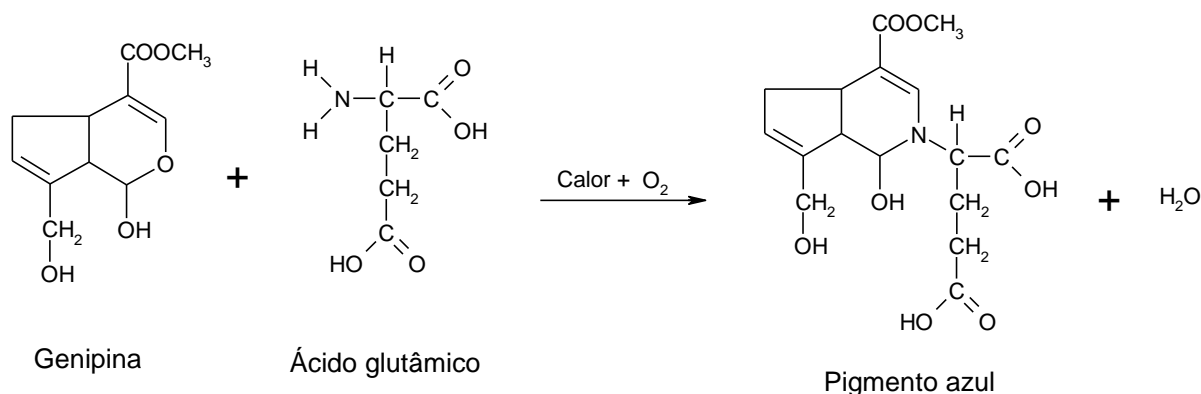
Devido à complexidade da matriz analisada, selecionou-se, a partir do perfil aminoacídico do endocarpo, determinado segundo descrito no item 3.3.10, o aminoácido em maior concentração nesta porção do fruto, para reação com genipina (Genipin G4796 ≥ 98% - SIGMA) e formação do pigmento azul, o qual foi utilizado como padrão para produzir a curva de calibração para quantificar a concentração de pigmento azul nos extratos.

A síntese do pigmento azul foi realizada segundo a metodologia descrita por Paik et al. (2001) e Cho et al. (2006), com adaptações. Consistindo na reação de volumes iguais de solução aquosa 3,6 mM de ácido glutâmico, em tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM, com solução etanólica de genipina 0,7 mM, em erlenmeyer vedado, a 70°C por 5 horas sob agitação em banho “dubnoff” da marca QUIMIS, modelo Q226M2, com correção do volume final, devido a evaporação.

Segundo Cho et al. (2006) a reação entre genipina e aminoácidos é equimolar, dessa forma, considerou-se que toda a genipina em solução reagiu, pois se utilizou uma concentração de aminoácido em excesso. Entretanto deve-se considerar que na formação de uma molécula simples de pigmento azul (genipina + ácido glutâmico), há liberação de uma molécula de água, assim, a massa de pigmento na solução corresponde ao somatório da massa de genipina contida na



solução e da massa de ácido glutâmico necessária para uma molaridade idêntica a da solução de genipina, menos a massa equivalente de água. Um esquema da reação pode ser visualizado na Figura 7:



**Figura 7** – Reação de formação do pigmento azul a partir de genipina e ácido glutâmico  
 Fonte: Autora.

A curva de calibração foi feita em espectrofotômetro da marca Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, por meio de varreduras de 200 a 800 nm, que abrange as regiões do ultravioleta, visível e infra-vermelho próximo (MARCZENKO; BALCERZAK, 2000), para determinação do comprimento de onda máximo do pigmento azul, a partir do qual pôde-se determinar a absorvância específica, através da lei de Lambert-Beer (Equação 2):

$$A = a l c \quad (2)$$

onde:

A = absorvância;

a = absorvância específica ( $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ );

*l* = caminho óptico (cm);

c = concentração da substância em solução (g/L).

A absorvância (A) pode ser definida como o logaritmo da intensidade do feixe incidente ( $I_0$ ) pela intensidade do feixe transmitido (I), como descrito na Equação 3 (NIELSEN, 1994):

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

### 3.5 DOSAGEM DA GENIPINA RESIDUAL

Ensaio preliminares indicaram que os extratos de jenipapo apresentam genipina residual, e para quantificá-la utilizou-se uma solução de genipina a 0,3 mM para produzir uma curva de calibração, como citado no item 3.4.

Em virtude de o pigmento apresentar, além da absorção no visível, também absorção no ultravioleta (o que poderia comprometer a quantificação real de genipina em solução), construiu-se uma curva de calibração para o pigmento no UV para determinar sua linearidade.

Uma vez comprovada a linearidade da absorção do pigmento azul no UV, avaliou-se o efeito da adição de soluções de diferentes concentrações de genipina a duas soluções de pigmento azul de concentrações distintas, observando-se o efeito direto da absorbância do pigmento azul no UV, na absorbância da genipina.

### 3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar o potencial de síntese de pigmento azul diretamente nos frutos de jenipapo verde, e também avaliar a extração de genipina que não reagiu, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^4$  (RODRIGUES; IEMMA, 2005; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007), constituído por dezesseis ensaios lineares nos níveis -1 e +1, oito ensaios axiais ( $\alpha = 2$ ) e três ensaios no ponto central (Tabela 6).

**Tabela 6 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional**

Ensaio	Variáveis de entrada			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Foram avaliados os efeitos das seguintes variáveis de entrada: concentração de etanol (CE) na solução extratora (hidroalcoólica), temperatura (T), tempo de extração (t) e pH da solução, nas variáveis de resposta: concentração de pigmento azul e de genipina por grama de endocarpo.

Os níveis das variáveis de entrada (Tabela 7) foram selecionados com base em informações da literatura (LEE et al., 1998; PAIK et al., 2001; PARK et al., 2002; LEE et al., 2003; CHO et al., 2006) e em ensaios preliminares.

**Tabela 7 – Variáveis e seus respectivos níveis do planejamento experimental**

Variáveis de entrada		Níveis				
Real (unidade)	Codificada	-2	-1	0	1	2
CE (%)	X <sub>1</sub>	0	20	40	60	80
T (°C)	X <sub>2</sub>	26	39,5	53	66,5	80
t (min.)	X <sub>3</sub>	15	30	45	60	75
pH (adimensional)	X <sub>4</sub>	3	5	7	9	11

CE: Concentração de etanol na solução; T: temperatura; t: tempo.

Foram mantidos fixos os seguintes fatores: temperatura da água de refrigeração (15°C), massa da amostra (30 g) e volume de solução extratora (300 mL). Com relação ao pH, foram utilizadas as soluções tampão contidas na Tabela 8, na concentração de 100 mM:

**Tabela 8 – Tabela de soluções tampão**

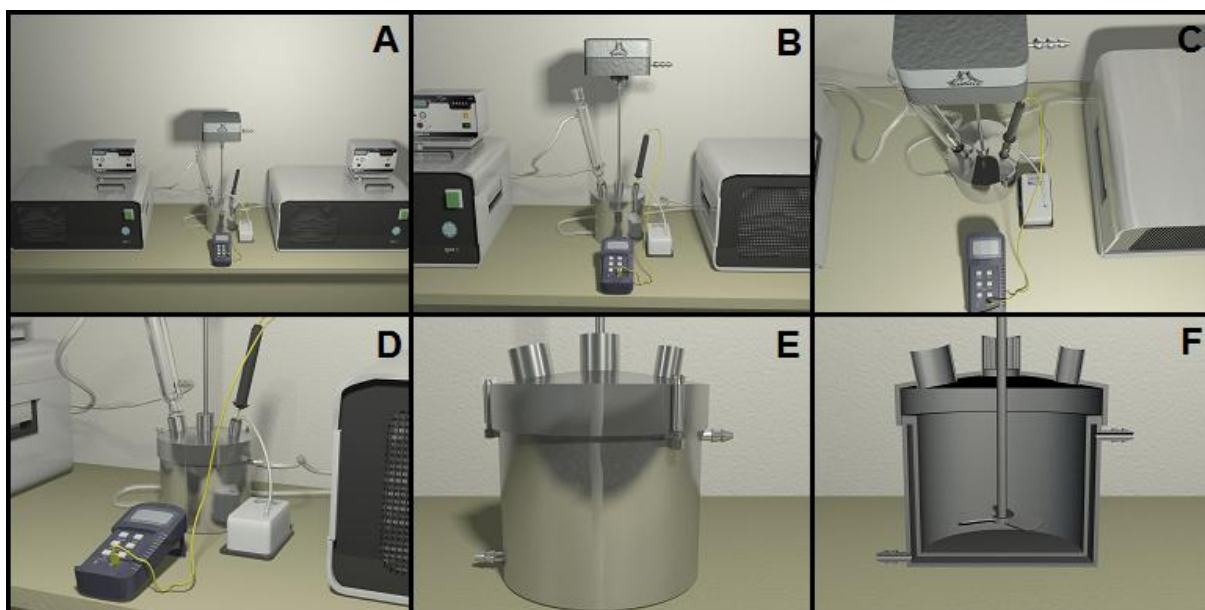
pH	Tampão	Composição
3,0	Acetato	CH <sub>3</sub> COOH e CH <sub>3</sub> COONa
5,0	Acetato	CH <sub>3</sub> COOH e CH <sub>3</sub> COONa
7,0	Fosfato	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
9,0	Carbonato	Na <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> e NaHCO <sub>3</sub>
11,0	Ringer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e NaOH

Fonte: MORITA; ASSUMPÇÃO (1972).

Para interpretação dos resultados do DCCR utilizou-se a metodologia de superfície de resposta, juntamente com a análise de variância em um intervalo de confiança de 99% para o pigmento azul e 95% para a genipina.

### 3.6.1 Processo de extração

O processo de extração consistiu na remoção do endocarpo dos frutos, seguida de redução de tamanho desta porção dos frutos através de moinho de facas, objetivando aumentar a superfície de contato deste e facilitar o arraste do pigmento pela solução extratora (hidroalcoólica). Foi utilizado um extrator sólido-encamisado, acoplado a um banho termostático de circulação da marca HAAKE, modelo F3, e a um sistema de resfriamento, que consiste em condensador ligado a um banho de circulação criostático das mesmas especificações do citado acima. Ao extrator também foram acoplados um termômetro digital para controle efetivo da temperatura de extração e uma bomba de ar comprimido, sob pressão constante, para oxigenar a solução, uma vez que a reação de formação do pigmento azul é induzida por oxigênio (TOUYAMA et al., 1994). A Figura 8 apresenta uma maquete digital do sistema de extração.



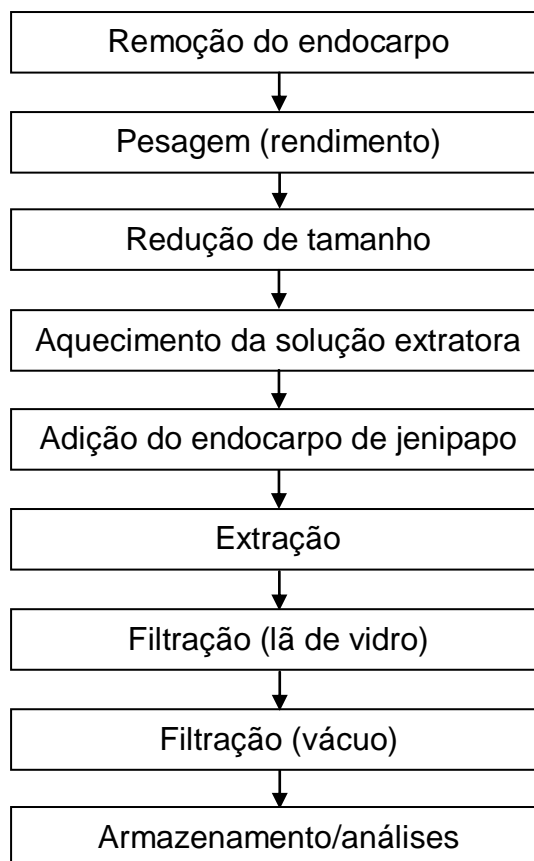
**Figura 8 – Sistema de extração**

A-D: Sistema de extração; E: Extrator; F: Secção longitudinal do extrator.

Fonte: Autora.

Ao final da extração, realizou-se a filtração em lã de vidro, seguida de filtração a vácuo em papel Whatman nº 1. Na Figura 9 podem-se observar as etapas da técnica de extração.

Deve-se ressaltar que a solução extratora foi aquecida até a temperatura prevista no ensaio do planejamento antes da adição do endocarpo, pois se observou em ensaios preliminares, que com a elevação da temperatura a formação do pigmento é iniciada, entretanto, o tempo só é contabilizado a partir do momento em que é atingida a temperatura prevista no planejamento, isto acarretaria um tempo inexato de extração, e conseqüentemente alterações nas características do extrato.



**Figura 9** – Fluxograma de extração do pigmento azul de jenipapo

Os extratos produzidos, de acordo com o DCCR, foram quantificados, em relação ao teor de pigmento azul e de genipina, via espectrofotometria segundo descrito nos itens 3.4 e 3.5, e a concentração de pigmento foi expressa em miligramas de pigmento azul de ácido glutâmico por grama de endocarpo ( $\text{mg}_{\text{PA-GLU}}/\text{g}_E$ ) e em miligramas de genipina por grama de endocarpo ( $\text{mg}_G/\text{g}_E$ ), respectivamente para o pigmento azul e para a genipina.

### 3.6.2 Determinação do ponto ótimo do planejamento experimental

Para determinação do ponto ótimo do planejamento experimental, as respostas geradas pelo modelo de regressão foram avaliadas por meio da função desejabilidade.

A função desejabilidade foi desenvolvida por Harrington em 1965 e adaptada por Derringer e Suich (1980) e tem por principal objetivo analisar, simultaneamente, um planejamento experimental com múltiplas variáveis de respostas, determinando em um único ponto do planejamento as condições de obtenção da resposta mais próxima do desejável para cada variável.

Esta função atribui a cada resposta  $\hat{Y}_i$ , um valor de desejabilidade ( $d_i$ ) restrito ao intervalo  $[0,1]$ , no qual quanto maior o valor de  $d_i$ , maior a desejabilidade. Assim, para  $d_i = 0$  tem-se um resultado totalmente inaceitável e para  $d_i = 1$ , o valor ideal. As desejabilidades das respostas são combinadas através de uma média geométrica (Equação 4) que fornece a desejabilidade global ( $D$ ) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

$$D = \sqrt[k]{d_1 d_2 \dots d_k} \quad (4)$$

Onde  $k$  representa o número de respostas analisadas e  $D$  varia no intervalo  $[0,1]$ . A utilização da média geométrica atribui a função a propriedade de se anular, caso alguma resposta tenha um valor inaceitável ( $d_i = 0$ ), impossibilitando a otimização (DERRINGER; SUICH, 1980).

A função desejabilidade pode ser unilateral ou bilateral, no presente trabalho será discutido apenas o segundo caso, o qual será empregado na análise dos dados. Na desejabilidade bilateral, a resposta desejável ( $J_i$ ) está situada entre um intervalo com limites superior e inferior,  $S_i$  e  $I_i$ , respectivamente, de forma que a desejabilidade pode ser representada pela Equação 5 (CASTILLO; MONTGOMERY; McCARVILLE, 1996).

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se } \hat{Y}_i < I_i \\ \left( \frac{\hat{Y}_i - I_i}{J_i - I_i} \right)^s & \text{se } I_i \leq \hat{Y}_i \leq J_i \\ \left( \frac{\hat{Y}_i - S_i}{J_i - S_i} \right)^t & \text{se } J_i \leq \hat{Y}_i \leq S_i \\ 0 & \text{se } \hat{Y}_i > S_i \end{cases} \quad (5)$$

Os expoentes  $s$  e  $t$  possibilitam acelerar ou retardar a função, por exemplo, aumentando os valores de  $s$  e  $t$ , restringe-se a desejabilidade às respostas ( $Y_i$ ) que mais se aproximam de  $J_i$ , por outro lado a redução nos expoentes permite a aceitação de valores mais afastados de  $J_i$ . A insensibilidade da desejabilidade a alterações nos expoentes traduzem a robustez das condições experimentais sugeridas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PIGMENTO AZUL E DA GENIPINA

O extrato obtido a partir do ponto ótimo do planejamento foi submetido a três condições de luminosidade e temperatura para avaliação da estabilidade do pigmento azul e da genipina.

Determinou-se a ordem aparente da reação e a constante de velocidade de degradação por meio do ajuste dos modelos da Tabela 4 aos pontos experimentais. Foi determinada ainda a energia de ativação de acordo com a Equação 2 e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) através das equações contidas na Tabela 5.

#### 3.7.1 Luz

A concentração do pigmento azul e de genipina foi inicialmente dosada como descrito nos itens 3.4 e 3.5. A solução foi distribuída em tubos de ensaio de 10 mL que foram vedados com filme de policloreto de vinila (PVC). Os tubos de ensaio foram retirados a cada dois dias, durante quinze dias, para quantificação de pigmento azul e de genipina.

As câmaras utilizadas para avaliação do efeito da luz sobre o pigmento azul possuem as seguintes características: 38x28x46 (cm); sistema de exaustão;



recobrimento interno de papel alumínio em seu interior e apresentam termômetro para aferir a temperatura do interior da câmara. Às câmaras foram acopladas lâmpadas fluorescentes, por serem as mais utilizadas em locais de armazenamento de alimentos, e as potências empregadas foram 15, 30 e 60 W, que correspondem às intensidades luminosas de 975, 3050 e 9200 lux, respectivamente (aferidas por meio de luxímetro digital da marca ICEL, modelo LD – 500).

As condições a que foram submetidos os tubos contendo extrato de jenipapo em cada câmara de fotodegradação encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9 – Características das câmaras de fotodegradação**

<b>Potência (W)</b>	<b>Luminosidade (lux)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
15	975	26,5 ± 0,5
30	3050	27,5 ± 0,5
60	8200	28,5 ± 0,5

Observa-se que apesar do grande aumento na luminosidade a elevação na temperatura das câmaras foi pequena, o que reduz a possibilidade de interação entre luz e temperatura ter afetado de forma significativa o experimento.

A Figura 10 apresenta maquete digital de uma câmara. As câmaras foram fabricadas artesanalmente e pertence ao Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), localizado no Laboratório de Engenharia Química (LEQ) da Universidade Federal do Pará (UFPA).



**Figura 10** – Câmara de fotodegradação  
Fonte: Autora.

### 3.7.2 Temperatura

A concentração do pigmento azul foi inicialmente dosada como descrito nos itens 3.4 e 3.5. A solução foi distribuída em tubos de ensaio de 10 mL vedados com parafilme e envolvidos com papel alumínio, para minimizar interferências pela luz. Posteriormente os tubos foram submetidos a 3 diferentes temperaturas: 20; 30 e 40 °C. Para controle das temperaturas utilizaram-se estufas incubadoras da marca QUIMIS, modelo Q315M16. Os tubos de ensaio foram retirados a cada dois dias, durante quinze dias, para quantificação de pigmento azul e de genipina.

## 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram efetuadas com auxílio do Software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

### 3.8.1 Caracterização física

Realizou-se a distribuição de frequências dos frutos com relação ao peso (g), agrupando-os em 7 intervalos, determinados segundo Milone (2006), o qual afirma que o número de intervalos pode ser determinado por:  $\sqrt{n}$ , onde “n” corresponde ao

tamanho da amostra e o resultado deve ser arredondado para o número inteiro mais próximo. Estimou-se também o peso médio e o rendimento médio dos intervalos.

Os resultados de caracterização física (peso, diâmetros longitudinal e transversal) foram ainda submetidos à análise de regressão linear múltipla com ajuste pelo método dos mínimos quadrados, para determinação de um modelo matemático que explicasse o peso do fruto, em função das circunferências longitudinal e transversal. As análises estatísticas foram processadas em um intervalo de confiança de 99% ( $p < 0,01$ ).

Para avaliação do rendimento de endocarpo dos frutos realizou-se a análise de variância (ANOVA de um critério) entre os intervalos de peso. O peso médio (g) foi analisado em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) e o rendimento médio (%), em um intervalo de 99% ( $p < 0,01$ ).

### **3.8.2 Caracterização físico-química**

Nas análises de caracterização físico-química, a comparação entre as porções do fruto (mesocarpo e endocarpo) foi realizada através da análise de Variância (ANOVA de um critério).

Para o perfil de aminoácidos a ANOVA foi complementada pelo Teste Tukey, quando detectadas diferenças significativas. As análises estatísticas foram processadas em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **3.8.3 Curvas de calibração (pigmento azul e genipina)**

As curvas de calibração para o pigmento na região do visível e do UV para a genipina e foram construídas por meio de regressão linear simples, com ajuste do modelo pela soma dos mínimos quadrados.

Para correção da absorbância da genipina os resultados da adição de genipina em soluções de pigmento azul foram analisados por meio de regressão linear simples e da análise de variância. Por fim, estabeleceu-se um modelo, ajustado pelo método dos mínimos quadrados, para quantificar genipina em soluções contendo pigmento azul. Todos os dados foram avaliados em um intervalo de confiança de 99% ( $p < 0,01$ ).

#### **3.8.4 Avaliação da estabilidade do pigmento azul e da genipina**

O ajuste dos modelos de ordem aparente de reação foi estimado pelo método dos mínimos quadrados, em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). A escolha do modelo foi baseada no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e na análise da distribuição dos resíduos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO FRUTO DE JENIPAPO

Os resultados da caracterização física estão representados na Tabela 10 e na Figura 11, através da distribuição de frequências e da distribuição normalizada dos frutos por intervalos de peso (g), respectivamente.

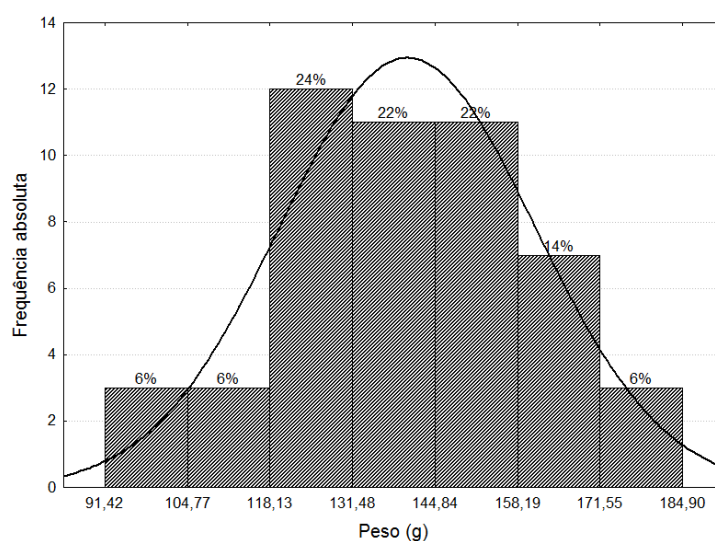
**Tabela 10** – Distribuição de frequências por peso (g) dos frutos de jenipapo<sup>1</sup>

Intervalos – Peso (g)	Frequência absoluta	Peso Médio (g)	<sup>2</sup> D. L. Médio (mm)	<sup>3</sup> D. T. Médio (mm)
91,42 ─ 104,77	3	99,20 ± 6,74	64,87 ± 4,22	56,75 ± 1,17
104,77 ─ 118,13	3	112,54 ± 5,52	68,09 ± 2,54	58,93 ± 0,48
118,13 ─ 131,48	12	124,61 ± 2,40	70,35 ± 2,15	61,10 ± 0,84
131,48 ─ 144,84	11	137,94 ± 3,15	73,10 ± 2,62	61,72 ± 0,49
144,84 ─ 158,19	11	152,44 ± 3,15	75,37 ± 2,24	65,04 ± 1,01
158,19 ─ 171,55	7	163,29 ± 3,73	76,80 ± 2,96	67,04 ± 0,73
171,55 ─ 184,90	3	179,03 ± 5,29	80,37 ± 0,19	68,63 ± 1,10
Total	50	-	-	-

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.

<sup>2</sup> DL: Diâmetro longitudinal.

<sup>3</sup> DT: Diâmetro transversal.



**Figura 11** – Histograma de distribuição normalizada dos frutos por peso (g)

Observa-se que os frutos analisados apresentam de fato um aumento nas duas dimensões com o aumento de peso e que seguem uma distribuição normal, com a maior frequência ocorrendo em torno da média. Os valores médios dos parâmetros avaliados encontram-se na Tabela 11.

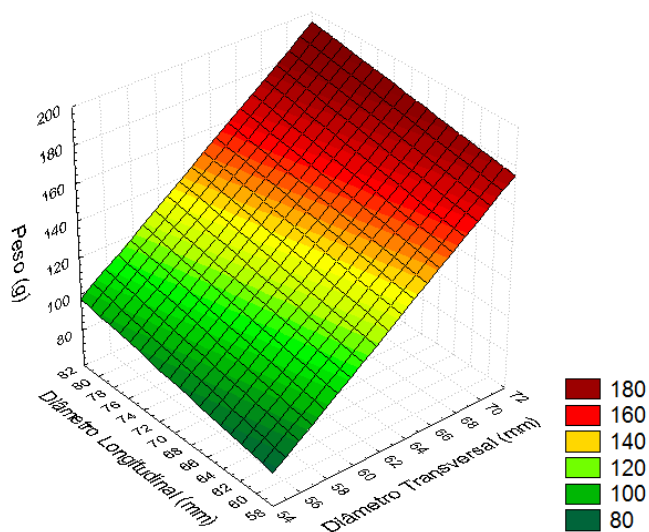
**Tabela 11 – Características físicas médias do fruto de jenipapo**

<b>Característica do fruto</b>	<b>Média</b>	<b>Hansen et al. (2007)</b>	<b>Santos et al. (2007)</b>
Peso (g)	140,10 ± 20,58	257,9	218,9
Diâmetro longitudinal (mm)	73,10 ± 4,41	80,15	75
Diâmetro transversal (mm)	63,22 ± 3,17	76,9	70
Rendimento – endocarpo (%)	29,38 ± 4,16	-	-

O peso médio dos frutos de jenipapo verde analisados foi de 140,10g, valor que representa 54,3% do valor encontrado por Hansen et al. (2007) que analisaram 6 populações de *Genipa americana* L. no Recôncavo Baiano nos meses de maio a junho para frutos “de vez”; e 64,0% do valor encontrado por Santos et al. (2007) que avaliaram 30 genótipos de jenipapeiros através das características de seus frutos “de vez”.

O diâmetro longitudinal médio encontrado foi de 73,10 mm, que corresponde a 91,2% do encontrado por Hansen et al. (2007) e 97,4% do obtido por Santos et al. (2007). O diâmetro transversal médio (63,22 mm) equivale a 82,2% e 90,3% do relatado por Hansen et al. (2007) e Santos et al. (2007), respectivamente.

O gráfico da Figura 12 representa a superfície de resposta gerada a partir do modelo matemático de regressão, que expressa o peso do fruto em função dos seus diâmetros transversal e longitudinal.



**Figura 12** – Gráfico da regressão linear para os parâmetros físicos avaliados (peso, diâmetros longitudinal e transversal)

A Equação 6 representa o modelo para o peso (P) em função dos diâmetros transversal (DT) e longitudinal (DL). Os valores entre parênteses representam o erro padrão estimado para cada coeficiente. O erro padrão da estimativa foi de 4,0908.

$$P = 5,3906 DT + 0,8113 DL - 259,9871 \quad (6)$$

(0,2443)      (0,3394)      (11,6644)

O modelo gerado a partir da regressão linear múltipla apresentou  $R^2 = 0,9605$  e  $R = 0,9809$ , um bom resultado tratando-se de um produto natural. Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007) o modelo pode ser considerado preditivo quando o F (teste de Fisher-Snedecor) calculado ( $F_{\text{calc}}$ ) é pelo menos dez vezes maior que o F tabelado ( $F_{\text{tab}}$ ). No caso do modelo em questão o  $F_{\text{calc}}$  foi de 596,88, mais de 100 vezes superior ao  $F_{\text{tab}} (2,47)$  de 5,11, podendo assim, ser considerado preditivo (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

A Tabela 12 apresenta a distribuição de frequências dos frutos analisados em relação ao peso. Os frutos foram agrupados em 7 intervalos, de amplitude igual a 13,86. Observa-se diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre todos os intervalos em relação ao peso médio dos frutos. Entretanto, independentemente do peso dos frutos, o rendimento médio de endocarpo não difere entre os intervalos ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 12 – Distribuição de frequências em relação ao peso dos frutos**

Intervalos - Peso (g)	F.A. <sup>1</sup>	F.R. <sup>2</sup>	Peso médio (g) – Fruto <sup>3</sup>	Rendimento médio (%) – Endocarpo <sup>3</sup>
58,62  — 72,48	5	10%	66,57 ± 5,37 <sup>a</sup>	25,61 ± 5,57 <sup>a</sup>
72,48  — 86,35	3	6%	80,62 ± 1,56 <sup>b</sup>	27,83 ± 4,24 <sup>a</sup>
86,35  — 100,22	7	14%	92,47 ± 4,39 <sup>c</sup>	29,64 ± 4,72 <sup>a</sup>
100,22  — 114,08	8	16%	107,46 ± 3,36 <sup>d</sup>	28,06 ± 4,25 <sup>a</sup>
114,08  — 127,95	8	16%	119,91 ± 4,98 <sup>e</sup>	29,53 ± 3,98 <sup>a</sup>
127,95  — 141,82	8	16%	136,85 ± 2,77 <sup>f</sup>	29,06 ± 2,70 <sup>a</sup>
141,82  — 155,69	11	22%	148,75 ± 5,42 <sup>g</sup>	32,43 ± 2,63 <sup>a</sup>
Total	50	100%	-	-

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os intervalos ( $p < 0,01$ ).

<sup>1</sup> F.A.: Frequência absoluta

<sup>2</sup> F.R.: Frequência relativa.

<sup>3</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MESOCARPO E DO ENDOCARPO DO JENIPAPO

As características físico-químicas do fruto de jenipapo (mesocarpo e endocarpo) encontram-se na Tabela 13. Os valores de umidade variaram de 68,01% no endocarpo a 80,87% no mesocarpo, o que representa um teor de água, nesta porção, 16% acima do encontrado no endocarpo. Entretanto, apesar da significativa diferença no conteúdo de umidade, as duas porções do fruto não diferiram significativamente em relação à atividade de água, apresentando valores elevados para esta característica, 0,99 e 0,98 para meso e endocarpo, respectivamente, o que se traduz em grande suscetibilidade a ocorrência de reações químicas, enzimáticas e desenvolvimento de microorganismos.



**Tabela 13** – Características físico-químicas do mesocarpo e endocarpo de jenipapo

<b>Característica<sup>1</sup></b>	<b>Mesocarpo<sup>2</sup></b>	<b>Endocarpo<sup>2</sup></b>
Umidade (%)	80,87 ± 0,42 <sup>a</sup>	68,01 ± 1,38 <sup>b</sup>
Cinzas (%)	0,95 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,07 <sup>a</sup>
Proteínas (%)	0,62 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,19 ± 0,08 <sup>b</sup>
Lipídios (%)	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,06 <sup>b</sup>
Açúcares redutores (%)	3,20 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,87 ± 0,07 <sup>b</sup>
Açúcares totais (%)	10,69 ± 0,20 <sup>a</sup>	9,63 ± 0,08 <sup>b</sup>
Sólidos solúveis (°brix)	10,36 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,43 ± 0,00 <sup>a</sup>
Fibras totais (%)	7,88 ± 0,39 <sup>a</sup>	16,76 ± 0,65 <sup>b</sup>
Fibras insolúveis (%)	7,10 ± 0,26 <sup>a</sup>	14,73 ± 1,31 <sup>b</sup>
Atividade de água	0,99 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,00 <sup>a</sup>
pH	4,49 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,21 ± 0,01 <sup>b</sup>
Acidez total titulável (meq NaOH/100g)	0,55 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,01 <sup>b</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Valores expressos em base úmida.

<sup>2</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.

Santos et al. (2007) avaliaram 30 genótipos de jenipapeiros através das características de seus frutos “de vez” e obtiveram como resultados, um conteúdo de umidade que variou de 65,44 a 81,43%. Bento (2007) avaliou jenipapos maduros selecionados aleatoriamente em supermercados de Recife-PE e obteve como resultado 81,22% de umidade para o mesocarpo. Em ambos os estudos os valores encontrados estão próximos aos obtidos no presente trabalho, mas deve-se salientar que neste estudo foram utilizados frutos verdes e que os dados de literatura aqui apresentados para comparação são de caracterizações de frutos maduros e apenas do mesocarpo (polpa) destes, devido à inexistência de caracterizações de frutos no estágio de maturação verde.

Com relação ao teor de cinzas, as duas porções do fruto não diferiram de forma significativa, encontrando-se 0,88% e 0,95%, para endocarpo e mesocarpo, respectivamente. Santos et al. (2007) obtiveram uma variação de 0,85% a 1,91% no conteúdo de cinzas.

Observa-se que o endocarpo apresentou um conteúdo de proteínas significativamente maior (414%) que o encontrado no mesocarpo. Em relação ao conteúdo lipídico, observou-se uma baixa concentração deste componente, como é característico das frutas, apesar disso, o endocarpo apresentou um teor lipídico 86%

maior que o observado no mesocarpo. Estas diferenças entre endocarpo e mesocarpo, em relação ao conteúdo de proteínas e lipídios, podem ser justificadas pelo fato de as sementes apresentam “nutrientes de reserva” para o embrião (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007).

Houve diferenças significativas com relação ao teor de açúcares nas duas porções do fruto. O mesocarpo apresentou nível de açúcares redutores e totais maiores que o endocarpo, 11,5% e 11%, respectivamente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas para o teor de sólidos solúveis.

Santos et al. (2007), na análise dos 30 genótipos de jenipapos, observaram uma variação no conteúdo de açúcares redutores e totais de 4,11% a 12,66% e de 12,56% a 18,67%, respectivamente; e no teor de sólidos solúveis de 12,60 a 20,87 °brix, entre as amostras analisadas. Harsen et al. (2008) analisaram 6 populações de *Genipa americana* L. no Recôncavo Baiano nos meses de maio a junho e obtiveram, para frutos “de vez”, 9,11% e 12,45% de açúcares redutores e totais, respectivamente; e 16,99 °brix, de sólidos solúveis.

Na análise de jenipapos maduros selecionados aleatoriamente em supermercados de Recife-PE, Bento (2007) obteve 14 °brix de sólidos solúveis. Silva; Lima e Vieites (1998) acompanharam as variações provocadas pelo armazenamento nas características físico-químicas de jenipapo “de vez” produzido na região de Botucatu-SP, e obtiveram no tempo zero (dia da colheita) um teor de sólidos solúveis de 13,64 °brix.

O conteúdo de fibras contido no meso e no endocarpo também mostrou diferenças significativas. Observou-se que o teor de fibras totais e de fibras insolúveis presentes no endocarpo representam o dobro do encontrado no mesocarpo para estes mesmo componentes. Deve-se ressaltar ainda que a maior parte destas fibras são insolúveis para as duas porções de fruto (90% para o mesocarpo e 87% para o endocarpo).

É provável que a concentração das fibras diminua com o processo de maturação do fruto (degradação da hemicelulose e protopectina), já que os frutos analisados encontravam-se no estágio verde de maturação, e isto é especialmente válido para o mesocarpo, uma vez que, o endocarpo contém as sementes, as quais são formadas principalmente por matéria vegetal que se caracteriza como fibra insolúvel, como celulose e lignina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007).

Em relação ao pH's encontrados, houveram diferenças significativas entre o mesocarpo (pH 4,49) e o endocarpo (pH 5,21). Estes resultados enquadram o mesocarpo como de caráter ácido ( $4,0 < \text{pH} < 4,5$ ) e o endocarpo como de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,0$ ). No primeiro caso, o desenvolvimento de microorganismos é ligeiramente restrito, podendo-se desenvolver bactérias lácticas e esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, além de bolores e leveduras. No caso de produtos de baixa acidez, a gama de microorganismos que podem se desenvolver é bastante ampla, e inclui a maioria das bactérias, inclusive patogênicas, bolores e leveduras (HOFFMANN, 2001).

Silva; Lima e Vieites (1998), mensuraram o pH do jenipapo no dia da colheita, obtendo o valor de pH 4,3 e observaram o decréscimo deste valor ao longo do período de armazenamento, de forma que no 28º dia o pH era de 3,05 para os frutos armazenados a temperatura ambiente. Santos et al. (2007), ao avaliarem os 30 genótipos de jenipapo, obtiveram uma variação no pH de 3,33 a 3,77. Harsen et al. (2008) encontraram como valor médio para a populações de jenipapo do Recôncavo Baiano, pH 3,42. Bento (2007), encontrou pH 3,78 para jenipapos coletados em supermercados de Recife-PE.

Deve-se observar que o fato do pH médio encontrado para o mesocarpo ser menor do que para o endocarpo, pressupõe menor acidez para esta parte do fruto, entretanto, isto não foi confirmado pela respectiva análise, a qual evidenciou maior acidez para o endocarpo (63 meq NaOH/100 g) do que para o mesocarpo (55 meq NaOH/100 g), o que poderia ser atribuído a diferenças entre as amostras utilizadas.

#### 4.3 PERFIL DE AMINOÁCIDOS DO MESOCARPO E ENDOCARPO FRESCOS E OXIDADOS

Foram determinados apenas os aminoácidos totais, pois na análise de aminoácidos livres observaram-se, no cromatograma, concentrações abaixo do limite de quantificação do equipamento e picos anômalos, o que pode sugerir a provável reação dos aminoácidos com algum constituinte da matriz analisada, possivelmente genipina.

A detecção na análise de aminoácidos totais talvez seja possível em função da hidrólise efetuada no preparo da amostra (HCl 6N por 24 horas), a qual,

possivelmente, poderia destruir o produto da reação com a genipina e permitir a regeneração dos aminoácidos, possibilitando a sua detecção.

A Tabela 14 apresenta os resultados da determinação de aminoácidos totais no mesocarpo e no endocarpo, frescos e oxidados. Não foram observadas diferenças significativas entre o mesocarpo fresco e oxidado e entre o endocarpo fresco e oxidado, para nenhum dos aminoácidos. O que reforça a possibilidade de que após a hidrólise, os aminoácidos que reagiram foram recuperados.

**Tabela 14** – Perfil de aminoácidos totais do mesocarpo e do endocarpo (frescos e oxidados) de jenipapo

Aminoácido (mg/100g)	Mesocarpo <sup>1</sup>		Endocarpo <sup>1</sup>	
	Fresco	Oxidado	Fresco	Oxidado
Ác. Aspártico	93,317 ± 31,65 <sup>a</sup>	95,762 ± 28,06 <sup>a</sup>	209,150 ± 1,63 <sup>b</sup>	218,480 ± 4,41 <sup>b</sup>
Ác. Glutâmico	77,723 ± 6,33 <sup>a</sup>	75,627 ± 7,74 <sup>a</sup>	304,230 ± 8,44 <sup>b</sup>	319,475 ± 25,07 <sup>b</sup>
Serina	9,288 ± 8,08 <sup>a</sup>	11,968 ± 7,12 <sup>a</sup>	95,975 ± 2,86 <sup>b</sup>	105,017 ± 9,45 <sup>b</sup>
Glicina	26,921 ± 3,93 <sup>a</sup>	27,335 ± 4,76 <sup>a</sup>	99,172 ± 7,82 <sup>b</sup>	102,774 ± 11,14 <sup>b</sup>
Histidina	19,754 ± 0,49 <sup>a</sup>	17,597 ± 0,99 <sup>a</sup>	51,298 ± 4,39 <sup>b</sup>	50,668 ± 3,86 <sup>b</sup>
Arginina	17,536 ± 5,99 <sup>a</sup>	12,306 ± 0,98 <sup>a</sup>	99,175 ± 5,90 <sup>b</sup>	100,325 ± 4,70 <sup>b</sup>
Treonina	26,494 ± 1,99 <sup>a</sup>	28,990 ± 7,09 <sup>a</sup>	78,680 ± 3,37 <sup>b</sup>	84,557 ± 0,63 <sup>b</sup>
Alanina	42,881 ± 2,01 <sup>a</sup>	39,529 ± 0,04 <sup>a</sup>	116,380 ± 5,97 <sup>b</sup>	120,350 ± 7,00 <sup>b</sup>
Prolina	32,562 ± 6,42 <sup>a</sup>	32,390 ± 5,81 <sup>a</sup>	93,333 ± 6,32 <sup>b</sup>	100,111 ± 9,04 <sup>b</sup>
Tirosina	22,162 ± 0,48 <sup>a</sup>	23,547 ± 1,63 <sup>a</sup>	75,770 ± 5,19 <sup>b</sup>	84,659 ± 6,59 <sup>b</sup>
Valina	30,693 ± 2,41 <sup>a</sup>	31,224 ± 4,07 <sup>a</sup>	104,250 ± 4,03 <sup>b</sup>	111,335 ± 8,01 <sup>b</sup>
Metionina	2,482 ± 1,01 <sup>ab</sup>	1,682 ± 2,38 <sup>a</sup>	7,109 ± 0,55 <sup>ab</sup>	7,167 ± 0,24 <sup>b</sup>
Cistina	74,583 ± 10,30 <sup>a</sup>	74,163 ± 4,01 <sup>a</sup>	58,437 ± 15,22 <sup>a</sup>	44,558 ± 0,34 <sup>a</sup>
Isoleucina	25,280 ± 2,43 <sup>a</sup>	25,628 ± 2,93 <sup>a</sup>	88,861 ± 5,43 <sup>b</sup>	95,068 ± 7,82 <sup>b</sup>
Leucina	52,784 ± 5,96 <sup>a</sup>	57,359 ± 6,85 <sup>a</sup>	176,125 ± 14,53 <sup>b</sup>	185,080 ± 17,71 <sup>b</sup>
Fenilalanina	28,757 ± 6,14 <sup>a</sup>	29,659 ± 0,65 <sup>a</sup>	94,533 ± 1,46 <sup>b</sup>	103,056 ± 5,01 <sup>b</sup>
Lisina	41,437 ± 0,90 <sup>a</sup>	37,796 ± 1,28 <sup>a</sup>	121,930 ± 4,71 <sup>b</sup>	117,885 ± 1,25 <sup>b</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.

No mesocarpo os aminoácidos que se apresentaram em maiores concentrações foram o ácido aspártico, o ácido glutâmico e a cistina. No endocarpo os aminoácidos presentes em maiores quantidades foram o ácido glutâmico, o ácido aspártico e a leucina.

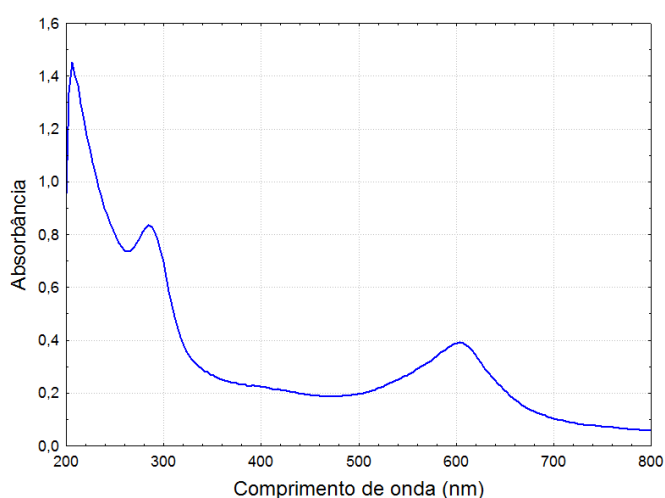
O endocarpo (fresco e oxidado) apresentou teores significativamente maiores que o mesocarpo em praticamente todos os aminoácidos, excetuando-se na cistina, onde não foram observadas diferenças significativas para as porções do fruto analisadas; e na metionina, para qual se observou diferença apenas entre mesocarpo e endocarpo oxidados.

Avaliando-se os teores de aminoácidos individualmente, observa-se que o endocarpo apresentou as seguintes concentrações médias acima daquelas encontradas no mesocarpo: ácido aspártico 126%; ácido glutâmico 307%; serina 846%; glicina 272%; histidina 173%; arginina 569%; treonina 194%; alanina 187%; prolina 198%; tirosina 251%; valina 248%; metionina 243%; isoleucina 261%; leucina 228%; fenilalanina 238%; e lisina 203%.

#### 4.4 PADRÃO DE PIGMENTO AZUL

Considerando-se a reação equimolar entre genipina e ácido glutâmico ilustrada na Figura 7, as concentrações de pigmento azul e de água formados foram de 123,150 mg<sub>PA-GLU</sub>/L e de 6,238 mg/L, respectivamente.

O comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) observado na região do visível foi de 605 nm, e este foi selecionado como referência para determinação da curva de calibração do pigmento azul. Na região do UV pode-se observar um pico a 286 nm, que será discutido na próxima seção. A Figura 13 apresenta um espectro de varredura de uma solução de pigmento azul.



**Figura 13** – Espectro de varredura da solução de pigmento azul a 36,945 mg/L

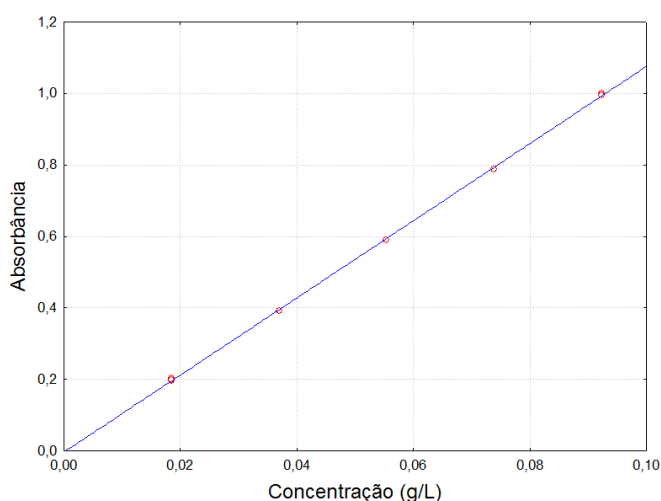
Lee et al. (1998), encontram como  $\lambda_{\text{máx}}$  para o pigmento azul formado a partir da reação entre genipina e ácido glutâmico, 601 nm. Lee et al. (2003) avaliaram a reação da genipina com 20 aminoácidos e obtiveram para o mesmo pigmento do presente estudo, um  $\lambda_{\text{máx}}$  de 596 nm. Cho et al. (2006) relatam que o  $\lambda_{\text{máx}}$  para este pigmento foi de 608 nm após três horas de reação entre ácido glutâmico e genipina e de 598 nm após 17 horas de reação.

A curva de calibração para o pigmento foi construída por meio de 5 pontos de concentrações distintas (Tabela 15), com triplicatas nos extremos e no centro. A Figura 14 apresenta a curva de calibração para o pigmento azul. O solvente utilizado foi tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.

**Tabela 15** – Concentrações e absorbâncias médias das soluções de pigmento azul (605 nm) da curva de calibração

Concentração (mg/L)	Absorbância <sup>1</sup>
18,472	0,199 ± 0,003
36,945	0,391
55,417	0,590 ± 0,001
73,890	0,787
92,362	0,997 ± 0,003

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.



**Figura 14** – Regressão linear das soluções de pigmento azul a 605 nm

A Equação 7 corresponde a curva de calibração para o pigmento azul a 605 nm:

$$A = 10,7936c - 0,0039 \quad (7)$$

Onde:

A = Absorbância da solução (adimensional);

c = Concentração da solução (g/L).

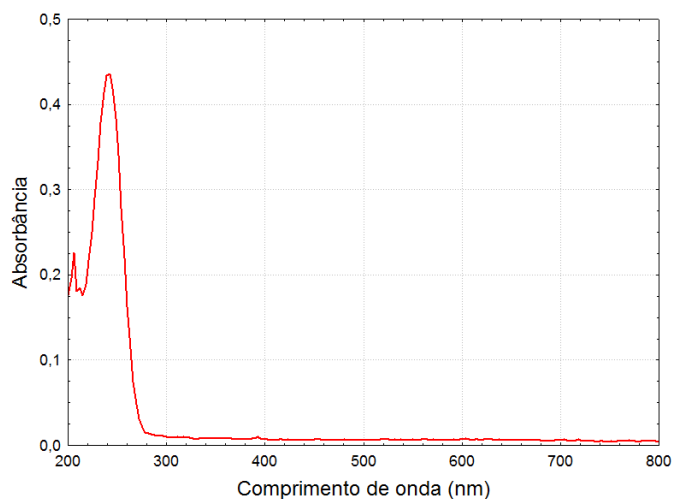
O modelo proposto apresentou excelente adequação ( $R^2 = 0,9997$ ), podendo ser considerado preditivo, pois  $F_{\text{calc}} = 83.729,41$  e  $F_{\text{tab}(2,9)} = 8,02$  (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

A absorvidade específica encontrada para o pigmento azul foi de  $10,7936 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Lee et al. (2003) determinaram a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para cada pigmento azul produzido a partir da reação de genipina com um aminoácido específico (ver Tabela 3), sendo  $\epsilon$  do pigmento azul formado com ácido glutâmico igual a  $2343 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Entretanto deve-se ressaltar que os autores consideraram como peso molecular do pigmento azul o somatório entre o peso molecular da genipina e do ácido glutâmico, o que constitui um erro, pois o pigmento azul trata-se, na verdade, de um conjunto de polímeros de alto peso molecular, formado a partir da associação de monômeros por sequências de desidrogenações (TOUYAMA et al., 1994).

Por este motivo, adotou-se neste trabalho a absorvidade específica ( $a$ ) expressa em  $\text{L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , que independe do peso molecular das estruturas presentes, mas que permite quantificar o pigmento azul total presente na solução.

#### 4.5 DOSAGEM DE GENIPINA RESIDUAL

A Figura 15 apresenta um espectro de varredura de uma solução de genipina. A curva de calibração para genipina foi construída através de 5 pontos de concentrações distintas (Tabela 16), com triplicatas em todos os pontos (Figura 16). O solvente utilizado foi tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.

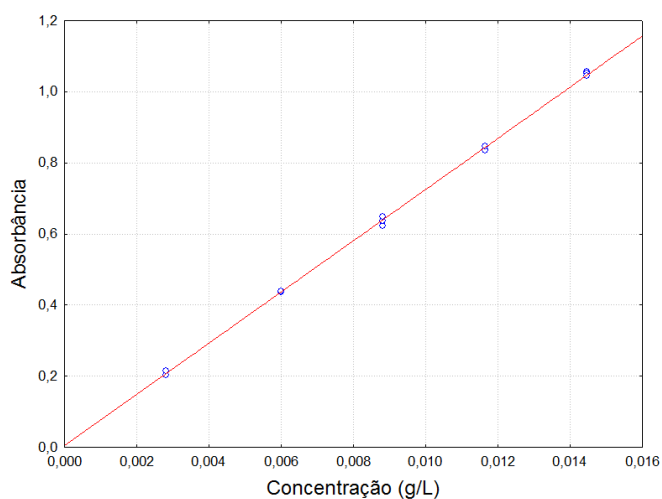


**Figura 15** – Espectro de varredura da solução de genipina a 5,998 mg/L

**Tabela 16** – Concentrações e absorbâncias médias das soluções de genipina da curva de calibração

Genipina (mg/L)	Absorbância <sup>1</sup>
2,822	0,211 ± 0,008
5,998	0,437 ± 0,001
8,820	0,636 ± 0,013
11,642	0,839 ± 0,006
14,465	1,051 ± 0,006

<sup>1</sup>Valores expressos como média ± desvio padrão.



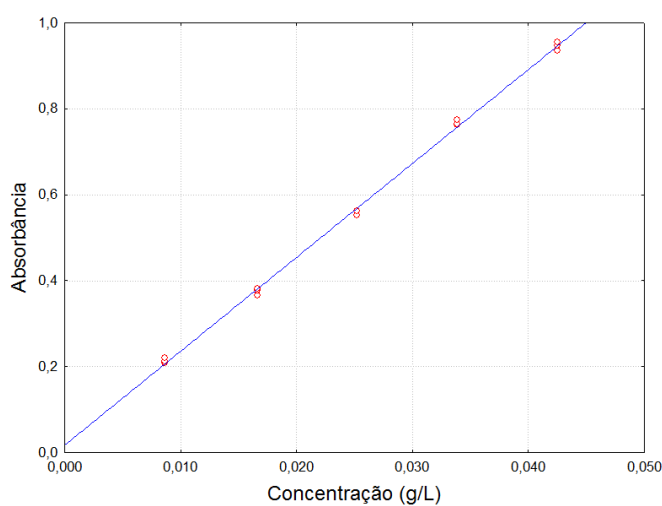
**Figura 16** – Regressão linear das soluções de genipina

O modelo ajustado para genipina (Equação 8) mostrou-se muito adequado ( $R^2 = 0,9994$ ), podendo ser considerado preditivo, uma vez que,  $F_{\text{calc}} = 60.415,99$  e  $F_{\text{tab}}(2,13) = 6,70$  (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).



$$A = 71,0028c + 0,0049 \quad (8)$$

A curva para o pigmento azul a 286 nm (Figura 17) foi construída de maneira similar a da genipina. A Tabela 17 apresenta as concentrações utilizadas. O solvente utilizado foi tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.



**Figura 17** – Regressão linear das soluções de pigmento azul a 286 nm

**Tabela 17** – Concentrações e absorvâncias médias das soluções de pigmento azul (286 nm) da curva de calibração

Pigmento azul (mg/L)	Absorvância <sup>1</sup>
8,620	0,214 ± 0,009
16,625	0,375 ± 0,008
25,246	0,556 ± 0,006
33,866	0,767 ± 0,006
42,487	0,946 ± 0,010

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.

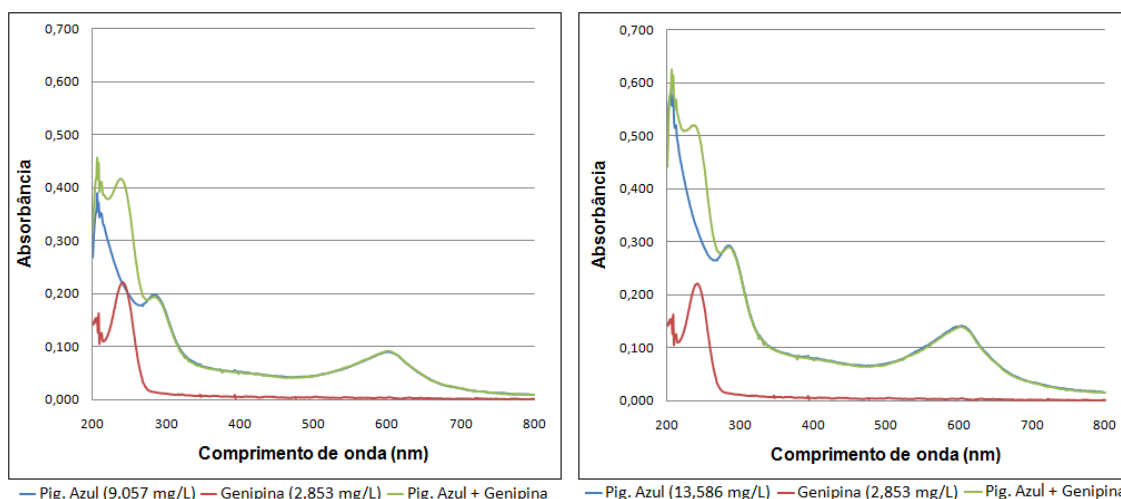
O modelo ajustado para o pigmento azul a 286 nm (Equação 9) também mostrou ótima adequação ( $R^2 = 0,9984$ ), podendo ser considerado preditivo ( $F_{\text{calc}} = 23.544,93$  e  $F_{\text{tab}}(2,13) = 6,70$ ) (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

$$A = 21,8531c + 0,0171 \quad (9)$$

Pode-se considerar como vantagem deste modelo em relação ao estabelecido a 605 nm (Figura 14), a possibilidade de quantificar soluções de concentrações muito menores, em virtude de a absorvidade específica a 286 nm ( $a = 21,8531$ ) ser praticamente o dobro daquela a 605 nm ( $a = 10,7936$ ).

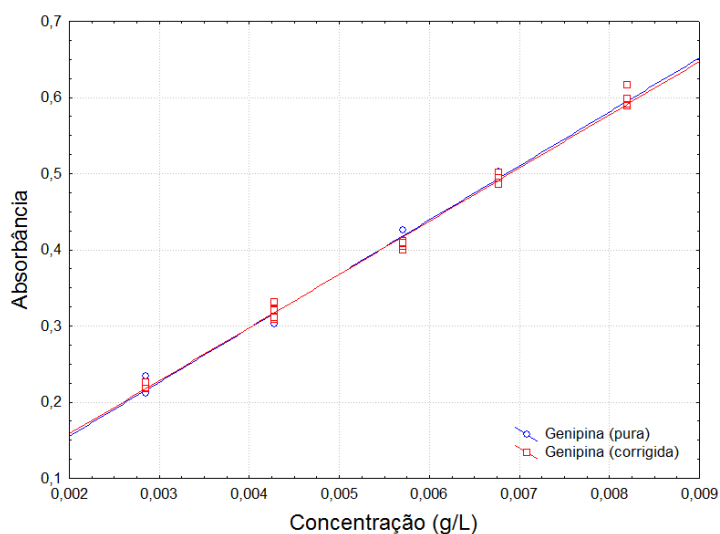
Para mensurar a influência provocada pela absorbância do pigmento azul a 286 nm na absorbância da genipina, utilizaram-se duas soluções de pigmento azul contendo 8,620 mg<sub>PA-GLU/L</sub> e 12,931 mg<sub>PA-GLU/L</sub>, às quais adicionaram-se soluções de genipina nas concentrações de: 2,853; 4,279; 5,705; 6,775 e 8,201 mg/L. Ao todo foram produzidos dez pontos, todos efetuados em triplicata e utilizando-se como solvente tampão fosfato pH 7,0 a 100 mM.

A Figura 18 ilustra o comportamento de uma solução de genipina (2,853 mg/L) na presença de pigmento azul, em duas concentrações (8,620 mg<sub>PA-GLU/L</sub> e 12,931 mg<sub>PA-GLU/L</sub>). Pode-se inferir que a absorbância da genipina é acrescida do número de unidades correspondentes a absorbância do pigmento azul a 286 nm, sendo assim o valor da absorbância real da genipina em soluções contendo pigmento azul equivale à diferença entre a absorbância apresentada pela genipina a 241nm e a absorbância do pigmento azul a 286 nm.



**Figura 18** – Influência do pigmento azul na absorbância da genipina

A Figura 19 apresenta duas curvas: a de genipina pura em solução e a correspondente a correção da absorbância da genipina em soluções contendo pigmento azul. O modelo foi estabelecido a partir de todos os pontos executados. As equações 10 e 11 representam o modelo de correção para a absorbância da genipina.



**Figura 19** – Curva de correção da absorvância da genipina

$$A_{GC} = A_{GPA} - A_{PA} \quad (10)$$

$$A_{GPA} - A_{PA} = 69,8215 c + 0,0186 \quad (11)$$

Onde:

$A_{GC}$  = Absorvância da genipina corrigida

$A_{GPA}$  = Absorvância da genipina em solução contendo pigmento azul;

$A_{PA}$  = Absorvância do pigmento azul (286 nm) em solução.

A Tabela 18 apresenta as absorvâncias da genipina pura e corrigida para as duas soluções de pigmento azul e o valor de p, resultante da análise de variância (ANOVA) entre as três soluções, ao nível de significância de 99%, indicando que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,01$ ) entre a absorvância da solução de genipina pura e os valores corrigidos para as demais soluções, e que a Equação 11 pode ser utilizada para quantificar genipina em soluções contendo pigmento azul ( $R^2 = 0,9956$ ).

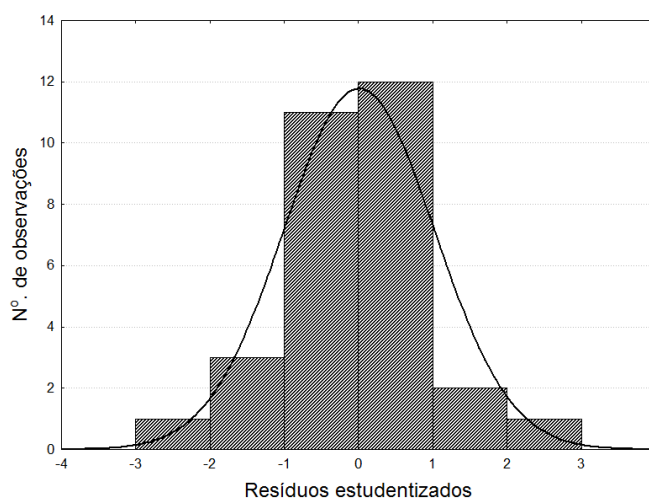
**Tabela 18 – ANOVA de correção da absorvância de genipina**

Concentração - genipina (mg/L)	Genipina <sup>1</sup>	Genipina (corrigida) <sup>1</sup>		p
		Pig. Azul - 9,057 mg/L	Pig. Azul - 13,586 mg/L	
2,853	0,222 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,220 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,224 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,850
4,279	0,311 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,313 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,324 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,154
5,705	0,414 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,403 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,409 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,197
6,775	0,496 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,493 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,489 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,577
8,201	0,598 ± 0,000 <sup>a</sup>	0,590 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,604 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,099

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os intervalos ( $p < 0,01$ ).

<sup>1</sup> Valores expressos como média ± desvio padrão.

A Figura 20 apresenta o histograma de resíduos estudentizados, os quais se aproximaram de uma distribuição t-student com desvio padrão igual a 0,133, sendo 0,407, o limite médio estimado ( $\alpha = 99\%$ ). O erro padrão para a correção da absorvância da genipina foi estimado em 0,024.



**Figura 20 – Histograma dos resíduos estudentizados para correção da absorvância da genipina**

#### 4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A Tabela 19 apresenta a matriz de experimentos com as variáveis independentes codificadas e as respostas correspondentes a cada ensaio.

Tabela 19 – Matriz do experimento

Ensaio	Variáveis codificadas <sup>1</sup>				Variáveis reais				Variáveis de resposta	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	CE	T	t	pH	PA <sup>2</sup>	G <sup>3</sup>
1	-1	-1	-1	-1	40	26,5	30	5	4,643	9,649
2	1	-1	-1	-1	60	26,5	30	5	1,258	13,041
3	-1	1	-1	-1	40	39,5	30	5	1,602	9,197
4	1	1	-1	-1	60	39,5	30	5	4,643	12,065
5	-1	-1	1	-1	40	26,5	60	5	2,832	13,658
6	1	-1	1	-1	60	26,5	60	5	1,515	12,611
7	-1	1	1	-1	40	39,5	60	5	4,820	11,021
8	1	1	1	-1	60	39,5	60	5	6,107	13,842
9	-1	-1	-1	1	40	26,5	30	9	6,024	6,610
10	1	-1	-1	1	60	26,5	30	9	2,566	8,593
11	-1	1	-1	1	40	39,5	30	9	2,927	5,775
12	1	1	-1	1	60	39,5	30	9	3,652	5,953
13	-1	-1	1	1	40	26,5	60	9	5,487	4,696
14	1	-1	1	1	60	26,5	60	9	1,539	7,628
15	-1	1	1	1	40	39,5	60	9	3,683	5,917
16	1	1	1	1	60	39,5	60	9	4,853	5,079
17	-2	0	0	0	20	53	45	7	7,093	8,296
18	2	0	0	0	80	53	45	7	1,722	10,524
19	0	-2	0	0	0	15	15	7	2,197	10,984
20	0	2	0	0	0	75	75	7	2,654	6,692
21	0	0	-2	0	0	53	45	7	4,416	10,023
22	0	0	2	0	0	53	45	7	7,391	10,696
23	0	0	0	-2	0	53	45	3	1,496	12,355
24	0	0	0	2	0	53	45	11	7,133	3,416
25	0	0	0	0	0	53	45	7	2,248	9,710
26	0	0	0	0	0	53	45	7	2,515	9,155
27	0	0	0	0	0	53	45	7	1,955	9,856

<sup>1</sup> X<sub>1</sub> = CE: Concentração de etanol (%) na solução extratora; X<sub>2</sub> = T: Temperatura (°C); X<sub>3</sub> = t: Tempo (min.); X<sub>4</sub> = pH: pH.

<sup>2</sup> PA = Pigmento azul (expresso em mg<sub>PA-GLU</sub>/g<sub>E</sub>).

<sup>3</sup> G = Genipina (expressa em mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>).

Deve-se ressaltar que apesar de a matriz estar na forma padronizada, os ensaios foram executados de forma aleatória para evitar erros sistemáticos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

#### 4.6.1 Influência das variáveis de entrada no rendimento de pigmento azul

O efeito das variáveis de entrada no rendimento de pigmento azul pode ser observado na Tabela 20:

**Tabela 20** – Efeitos principais e de resposta para o rendimento de pigmento azul

Fator <sup>1</sup>	Efeito	Erro Padrão	p <sup>2</sup>
Média	2,240	± 0,162	<b>0,005</b>
CE (L)	-1,386	± 0,114	<b>0,007</b>
CE (Q)	0,875	± 0,121	0,019
T (L)	0,611	± 0,114	0,033
T (Q)	-0,116	± 0,121	0,438
t (L)	0,789	± 0,114	0,020
t (Q)	1,623	± 0,121	<b>0,006</b>
pH (L)	1,215	± 0,114	<b>0,009</b>
pH (Q)	0,828	± 0,121	0,021
CE x T	2,291	± 0,140	<b>0,004</b>
CE x t	0,033	± 0,140	0,833
CE x pH	-0,642	± 0,140	0,044
T x t	1,220	± 0,140	0,013
T x pH	-0,928	± 0,140	0,022
t x pH	-0,342	± 0,140	0,134

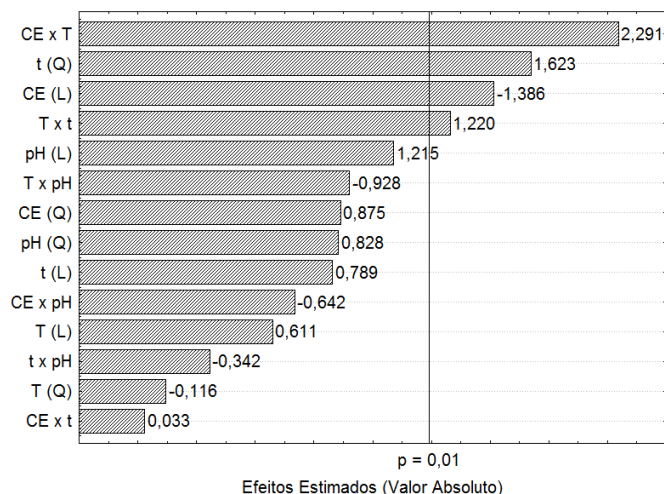
CE = Concentração de etanol (%) na solução extratora; T = Temperatura (°C); t = Tempo (min.).

<sup>1</sup> L: Fator linear; Q: Fator quadrático.

<sup>2</sup> O efeito é significativo se  $p < 0,01$  (destacados em negrito).

Observa-se que as variáveis individuais concentração de etanol (CE) linear, tempo (t) quadrático, pH linear e a interação entre CE e T apresentaram efeitos significativos, ou seja, que mudanças nos níveis destas, provocam alterações significativas na resposta (pigmento azul), que não podem ser atribuídas ao acaso.

O Diagrama de Pareto (Figura 21) permite melhor visualizar as variáveis com efeito significativo, para as quais a barra ultrapassa a reta vertical, indicativa do limite de rejeição da hipótese nula.



**Figura 21** – Diagrama de Pareto para a extração de pigmento azul

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 21 ratifica a estatística dos efeitos das variáveis de entrada sobre o rendimento de pigmento azul.

Segundo Box; Hunter; Hunter (2005), o  $F_{\text{tab}(10,2)} = 99,40$ , ao nível de confiança de 99% ( $p = 0,01$ ), o que significa que somente as variáveis CE (L), t (Q), pH (L) e a interação CE x T apresentaram efeitos significativos, confirmado pelo valor de  $p < 0,01$ .

**Tabela 21 – ANOVA para o rendimento de pigmento azul**

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p
CE (L)	11,523	1	11,523	147,192	<b>0,007</b>
CE (Q)	4,079	1	4,079	52,101	0,019
T (L)	2,243	1	2,243	28,657	0,033
T (Q)	0,072	1	0,072	0,924	0,438
t (L)	3,737	1	3,737	47,734	0,020
t (Q)	14,041	1	14,041	179,354	<b>0,006</b>
pH (L)	8,864	1	8,864	113,223	<b>0,009</b>
pH (Q)	3,657	1	3,657	46,711	0,021
CE x T	21,003	1	21,003	268,286	<b>0,004</b>
CE x t	0,004	1	0,004	0,057	0,833
CE x pH	1,648	1	1,648	21,054	0,044
T x t	5,950	1	5,950	76,006	0,013
T x pH	3,443	1	3,443	43,982	0,022
t x pH	0,468	1	0,468	5,972	0,134
Falta de ajuste	19,196	10	1,920	24,520	0,040
Erro puro	0,157	2	0,078		
Total SQ	97,282	26			

CE = Concentração de etanol (%) na solução extratora; T = Temperatura (°C); t = Tempo (min.).  
SQ: Soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

#### 4.6.1.1 Modelo proposto e análise da qualidade

Para o rendimento de pigmento azul (PA) foi proposto um modelo polinomial de segunda ordem, descrito de forma genérica pela Equação 12. O modelo apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,8012, ou seja, é capaz de explicar 80,12% das variações experimentais em torno da média.

$$PA = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 + \beta_4 X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad (12)$$

A Tabela 22 apresenta os coeficientes correspondentes às variáveis de entrada e seus respectivos erros padrões.

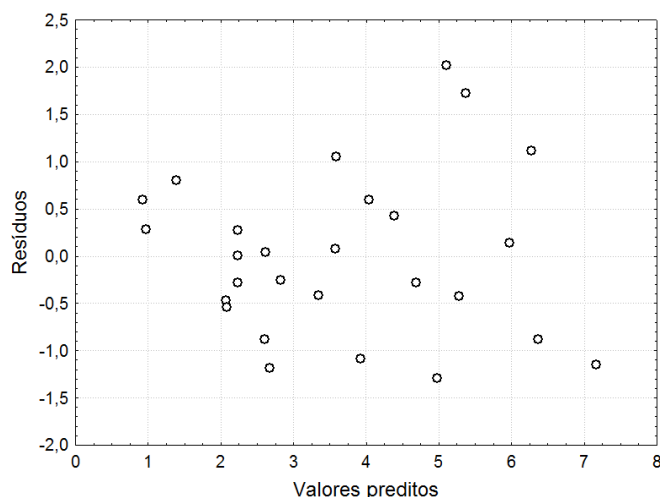


**Tabela 22 – Coeficientes de regressão para o modelo proposto para o pigmento azul**

<b>Fator</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>
Média	$\beta_0 = 2,240$	$\pm 0,162$
CE (L)	$\beta_1 = -0,693$	$\pm 0,057$
CE (Q)	$\beta_1^2 = 0,437$	$\pm 0,061$
T (L)	$\beta_2 = 0,306$	$\pm 0,057$
T (Q)	$\beta_2^2 = -0,058$	$\pm 0,061$
t (L)	$\beta_3 = 0,395$	$\pm 0,057$
t (Q)	$\beta_3^2 = 0,811$	$\pm 0,061$
pH (L)	$\beta_4 = 0,608$	$\pm 0,057$
pH (Q)	$\beta_4^2 = 0,414$	$\pm 0,061$
CE x T	$\beta_{12} = 1,146$	$\pm 0,070$
CE x t	$\beta_{13} = 0,017$	$\pm 0,070$
CE x pH	$\beta_{14} = -0,321$	$\pm 0,070$
T x t	$\beta_{23} = 0,610$	$\pm 0,070$
T x pH	$\beta_{24} = -0,464$	$\pm 0,070$
t x pH	$\beta_{34} = -0,171$	$\pm 0,070$

CE = Concentração de etanol (%) na solução extratora; T = Temperatura (°C); t = Tempo (min.).

A avaliação da qualidade do modelo foi realizada por meio da análise dos resíduos, em relação a sua amplitude e distribuição em torno dos valores observados. Na Figura 22 observa-se que a amplitude dos resíduos encontra-se na faixa entre -1,3 e 2,0, e que a sua distribuição é aleatória em torno de zero, não apresentando comportamento tendencioso ou sistemático, o que indica independência das variáveis de entrada em relação aos valores preditos.

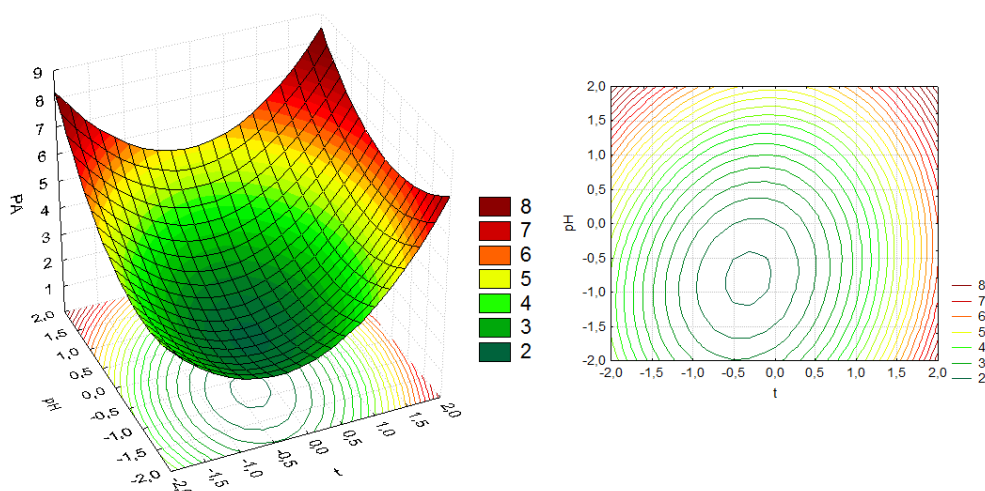


**Figura 22** – Distribuição de resíduos para o rendimento de pigmento azul

#### 4.6.1.2 Superfície de resposta e curvas de nível para o pigmento azul

A visualização do modelo proposto para o rendimento de pigmento azul é possível através da superfície de resposta e das curvas de nível (Figura 23) em função das variáveis independentes.

Em virtude de terem sido utilizadas quatro variáveis independentes, selecionou-se duas, tempo e pH, para compor os eixos X e Y, respectivamente. As demais variáveis, concentração de etanol e temperatura foram mantidas no nível 0 (ponto central). O eixo Z (Figura 23 à esquerda) representa a resposta rendimento de pigmento azul em  $\text{mg}_{\text{PA-GLU}}/\text{g}_E$ .



**Figura 23** – Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de nível (à direita) para PA em função de pH e t

Analisando a Figura 23, observa-se que níveis elevados de tempo e extremos de pH (mínimo e máximo) resultam em maior rendimento de pigmento. Entretanto, para níveis reduzidos de tempo, somente a utilização de níveis elevados de pH, maximizam a extração de pigmento. De forma geral, os maiores rendimentos observados na figura são obtidos com os níveis máximos (+2) de tempo e pH.

Tal fato já havia sido denotado através da análise dos efeitos significativos (Tabela 20), segundo a qual, o aumento do pH em um nível proporciona o aumento no rendimento, em média, de 1,215 mg<sub>PA-GLU</sub>/g<sub>E</sub>. Entretanto, observou-se durante a execução dos ensaios que pH's alcalinos resultavam em extratos negros, o que talvez seja provocado pelo excesso de hidroxilas livres em solução e que poderiam intensificar o processo de polimerização do pigmento por desidrogenação (TOUYAMA, 1994), portanto o pH 7,0 enquadra-se como o mais adequado para a extração de pigmento azul.

Lee et al. (1998) relatam a síntese de pequenas proporções de PA em pH 5,0 e 9,0 e nenhuma formação de pigmento a pH 3,0 e 12,0, considerando assim, o pH 7,0 o melhor para a síntese de PA. Cho et al. (2006) não obtiveram formação de PA em pH alcalino (9,0 a 12,0) e relataram reduzida síntese a pH 4,0, estabelecendo como faixa ótima pH entre 4,5 e 6,0.

Renhe (2008) avaliou a extração de pigmento azul a partir de jenipapo verde, objetivando um extrato que mais se assemelhasse, em relação à cor, a uma solução 0,05% de azul de indigotina, para o qual a autora determinou como condições ótimas pH 4,0 e temperatura de 75 °C para extrações com soluções etanólicas e de 55 °C para extrações com água.

#### **4.6.2 Influência das variáveis de entrada no rendimento de genipina**

A Tabela 23 apresenta o efeito das variáveis de entrada no rendimento de genipina, na qual se pode observar que as variáveis, concentração de etanol (CE) linear, temperatura (T) linear, pH linear e quadrático e a interação entre tempo (t) e pH, apresentaram efeitos significativos na resposta (genipina).

**Tabela 23** – Efeitos principais e de resposta para o rendimento de genipina

<b>Fator<sup>1</sup></b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>p<sup>2</sup></b>
Média	9,574	± 0,213	<b>0,000</b>
CE (L)	1,396	± 0,151	<b>0,011</b>
CE (Q)	-0,095	± 0,160	0,613
T (L)	-1,352	± 0,151	<b>0,012</b>
T (Q)	-0,381	± 0,160	0,140
t (L)	0,410	± 0,151	0,113
t (Q)	0,380	± 0,160	0,141
pH (L)	-5,226	± 0,151	<b>0,001</b>
pH (Q)	-0,857	± 0,160	<b>0,033</b>
CE x T	-0,279	± 0,185	0,270
CE x t	-0,569	± 0,185	0,091
CE x pH	-0,472	± 0,185	0,125
T x t	0,271	± 0,185	0,280
T x pH	-0,246	± 0,185	0,314
t x pH	-1,349	± 0,185	<b>0,018</b>

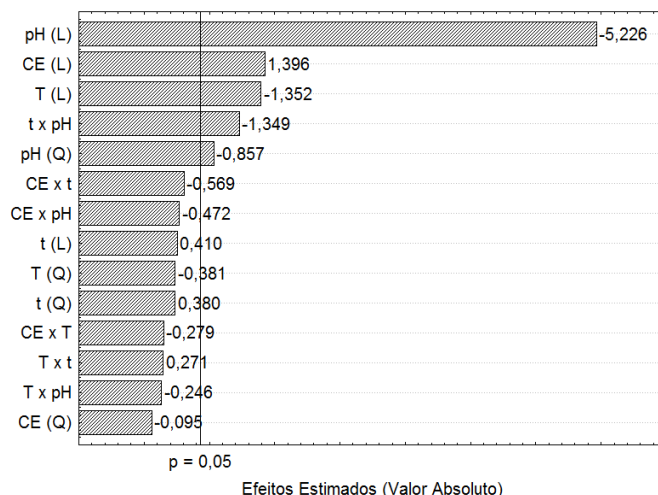
CE = Concentração de etanol (%) na solução extratora; T = Temperatura (°C); t = Tempo (min.).

<sup>1</sup> L: Fator linear; Q: Fator quadrático.

<sup>2</sup> O efeito é significativo se  $p < 0,05$  (destacados em negrito).

Deve-se ressaltar que as variáveis, concentração de etanol e temperatura apresentam efeitos individuais na resposta, sendo que a elevação de CE em um nível provoca o aumento no rendimento de genipina, em média, de 1,396 mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>. De forma contrária, o aumento de T em um nível, causa a redução no rendimento, em média, de 1,352 mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>.

No Diagrama de Pareto (Figura 24) podem-se visualizar as variáveis com efeito significativo, para as quais a barra ultrapassa a reta vertical, limítrofe para rejeição da hipótese nula.



**Figura 24** – Diagrama de Pareto para a extração de genipina

A Tabela 24 apresenta a análise de variância (ANOVA), a qual confirma as variáveis de entrada dadas como significativas pela análise dos efeitos, sobre o rendimento de genipina.

Ao nível de confiança de 95% ( $p = 0,05$ ) o  $F_{\text{tab}}(10,2) = 19,40$  (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005), o que significa que somente as variáveis CE linear, T linear, pH linear e quadrático e a interação entre t e pH apresentaram efeitos significativos, confirmado pelo valor de  $p < 0,05$ .

**Tabela 24 – ANOVA para o rendimento de genipina**

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	p
CE (L)	11,687	1	11,687	85,570	0,011
CE (Q)	0,048	1	0,048	0,352	0,613
T (L)	10,965	1	10,965	80,284	0,012
T (Q)	0,774	1	0,774	5,667	0,140
t (L)	1,006	1	1,006	7,369	0,113
t (Q)	0,769	1	0,769	5,630	0,141
pH (L)	163,871	1	163,871	1199,889	0,001
pH (Q)	3,921	1	3,921	28,714	0,033
CE x T	0,311	1	0,311	2,280	0,270
CE x t	1,294	1	1,294	9,477	0,091
CE x pH	0,893	1	0,893	6,536	0,125
T x t	0,294	1	0,294	2,155	0,280
T x pH	0,242	1	0,242	1,774	0,314
t x pH	7,279	1	7,279	53,296	0,018
Falta de ajuste	13,240	10	1,324	9,694	0,097
Erro puro	0,273	2	0,137		
Total SQ	218,411	26			

CE = Concentração de etanol (%) na solução extratora; T = Temperatura (°C); t = Tempo (min.).  
 SQ: Soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

#### 4.6.2.1 Modelo proposto e análise da qualidade

Para o rendimento de genipina (G), assim como para o pigmento azul, foi proposto um modelo polinomial de segunda ordem, descrito de forma genérica pela Equação 13, o qual apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9381, ou seja é capaz de explicar 93,81% das variações experimentais em torno da média.

$$G = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_3 X_3^2 + \beta_4 X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad (13)$$

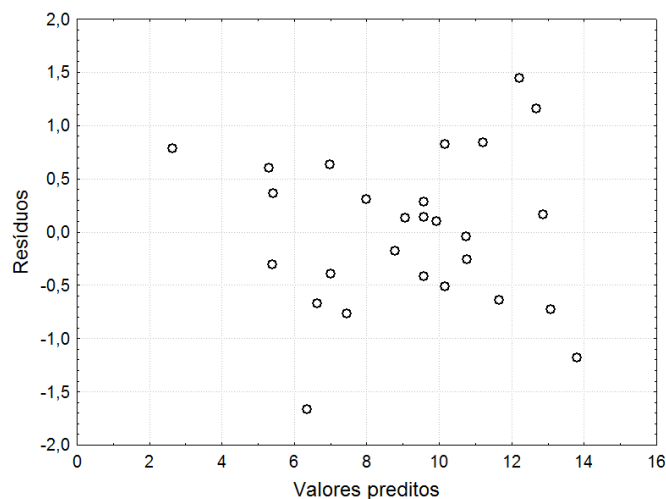
Os coeficientes das variáveis de entrada podem ser observados na tabela 25, bem como seus respectivos erros padrões.

**Tabela 25** – Coeficientes de regressão do modelo proposto para o rendimento de genipina

Fator	Coeficiente de regressão	Erro Padrão
Média	$\beta_0 = 9,574$	$\pm 0,213$
CE (L)	$\beta_1 = 0,698$	$\pm 0,075$
CE (Q)	$\beta_1^2 = -0,047$	$\pm 0,080$
T (L)	$\beta_2 = -0,676$	$\pm 0,075$
T (Q)	$\beta_2^2 = -0,190$	$\pm 0,080$
t (L)	$\beta_3 = 0,205$	$\pm 0,075$
t (Q)	$\beta_3^2 = 0,190$	$\pm 0,080$
pH (L)	$\beta_4 = -2,613$	$\pm 0,075$
pH (Q)	$\beta_4^2 = -0,429$	$\pm 0,080$
CE x T	$\beta_{12} = -0,140$	$\pm 0,092$
CE x t	$\beta_{13} = -0,284$	$\pm 0,092$
CE x pH	$\beta_{14} = -0,236$	$\pm 0,092$
T x t	$\beta_{23} = 0,136$	$\pm 0,092$
T x pH	$\beta_{24} = -0,123$	$\pm 0,092$
t x pH	$\beta_{34} = -0,674$	$\pm 0,092$

CE = Concentração de etanol (%) na solução extratora; T = Temperatura (°C); t = Tempo (min.).

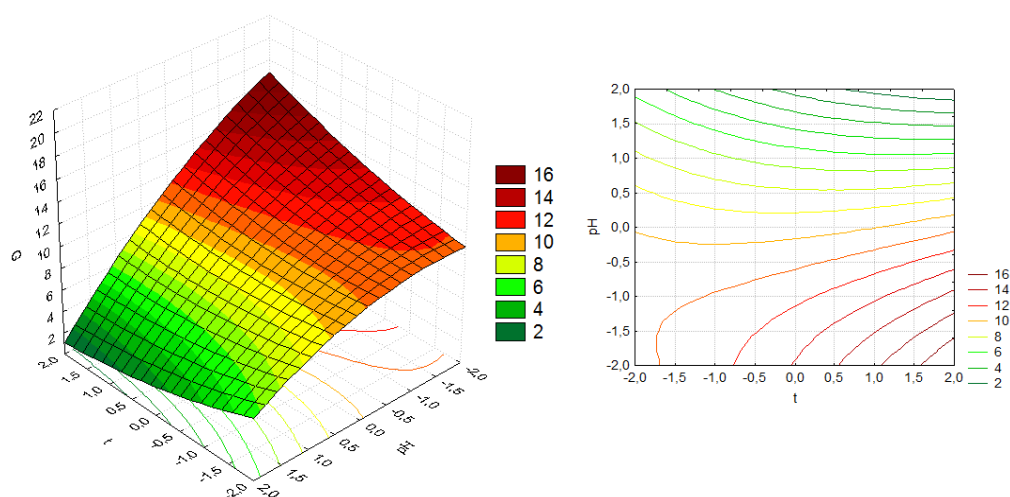
Os resíduos foram analisados para determinar a qualidade do modelo. A amplitude dos resíduos situou-se na faixa entre -1,7 e 1,4 (Figura 25), e estes não apresentaram comportamento tendencioso ou sistemático, caracterizando uma distribuição aleatória em torno de zero, o que indica que as variáveis de entrada são independentes.



**Figura 25** – Distribuição de resíduos para o rendimento de genipina

#### 4.6.2.2 Superfície de resposta e curvas de nível para a genipina

A Figura 26 representa a superfície de resposta e as curvas de nível obtidas pelo modelo de regressão (Equação 13) para o rendimento de genipina. Foram selecionadas as variáveis independentes tempo e pH, para compor os eixos X e Y, respectivamente; as variáveis concentração de etanol e temperatura foram mantidas no nível 0 (ponto central). O eixo Z (Figura 26 à esquerda) representa a resposta rendimento de genipina em  $\text{mg}_G/\text{g}_E$ .



**Figura 26** – Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de nível (à direita) para genipina em função de pH e t

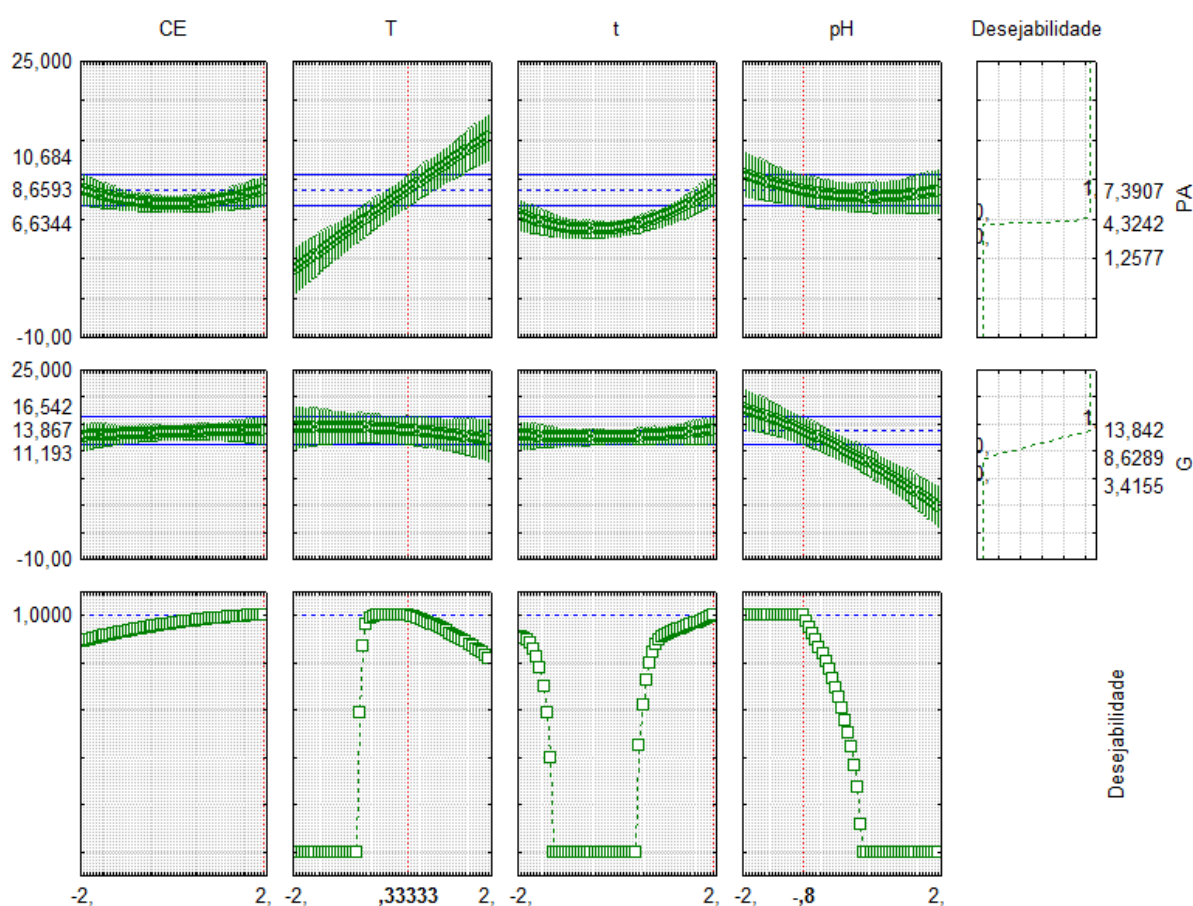
Observa-se que a redução nos níveis de pH, juntamente com a elevação nos níveis de tempo, aumentam o rendimento de genipina.



#### 4.6.3 Determinação do ponto ótimo do planejamento experimental

A análise de desejabilidade foi executada com uma grade de 60 pontos para cada uma das quatro variáveis independentes, ou seja, os valores das respostas e respectivas desejabilidades foram calculadas em  $60^4$  combinações de níveis. Para o pigmento azul e para a genipina, fixou-se como ideal ( $d_i = 1$ ) o máximo rendimento obtido no planejamento (7,391 mg<sub>PA-GLU</sub>/g<sub>E</sub> e 13,842 mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>, respectivamente), valores médios e mínimos foram considerados inaceitáveis ( $d_i = 0$ ). Os expoentes  $s$  e  $t$  foram igualados a 1.

A Figura 27 apresenta a função desejabilidade para o pigmento azul (PA) e para a genipina (G) e os respectivos gráficos para as variáveis de entrada, com as faixas que atendem as especificações do desejável.



**Figura 27 – Gráficos da função desejabilidade**

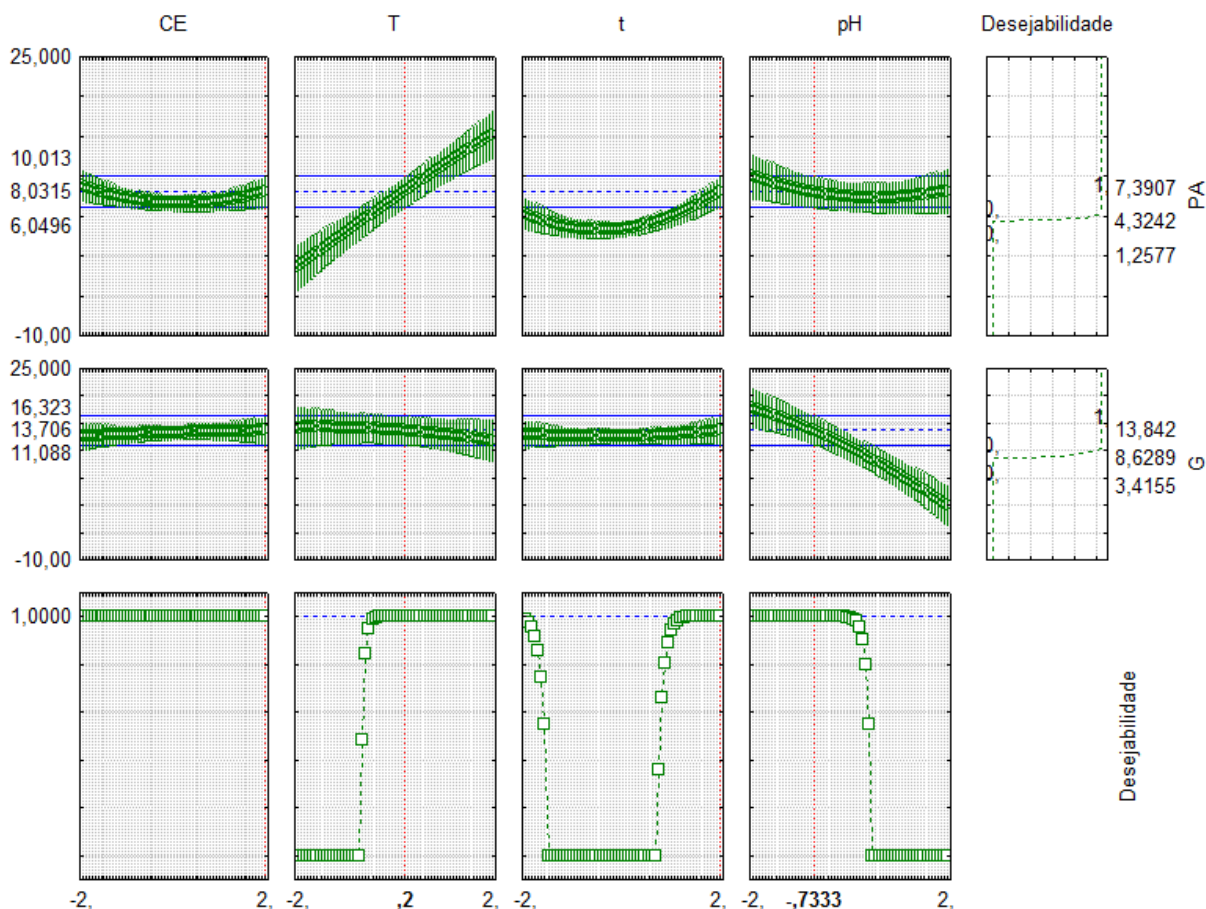
Pode-se observar que a função desejabilidade atendeu plenamente às características previamente estabelecidas, o que é comprovado pelo resultado da desejabilidade global (D) igual a 1,0, ou seja, a função consegue especificar níveis

para cada variável de entrada que possibilitam a maximização da extração de PA e G simultaneamente. As condições de extração são dadas de forma codificada (de acordo com o planejamento) e representam os seguintes valores reais: 80% de etanol, 57,5 °C, 75 min. e pH 5,4. A Tabela 26 apresenta as equações de conversão entre os níveis codificados do planejamento e seus respectivos valores reais.

**Tabela 26** – Equações de conversão dos níveis das variáveis de entrada para valores reais

Variável	Equação de conversão
Concentração de etanol (%) – CE	$X_1 = \frac{CE - 40}{20}$
Temperatura (°C) – T	$X_2 = \frac{T - 53}{13,5}$
Tempo (min.) – t	$X_3 = \frac{t - 45}{15}$
pH	$X_4 = \frac{pH - 7}{2}$

Para avaliar a robustez das condições experimentais sugeridas, realizou-se novamente a análise de desejabilidade sob as mesmas condições, exceto pelo aumento nos expoentes  $s$  e  $t$ , que foram igualados a 10. Os gráficos resultantes podem ser observados na Figura 28.



**Figura 28** – Gráficos da função desejabilidade, para  $s = t = 10$

Observa-se que o resultado da função  $D$  não foi afetado, permanecendo igual a 1,0, garantindo a robustez da análise. Entretanto deve-se ressaltar que o gráfico da Figura 28 apresenta maior especificidade em relação aos valores de desejabilidade atribuídos às respostas analisadas, selecionando, como mais aceitável, valores muito mais próximos do estabelecido como desejável do que o gráfico da Figura 27, onde  $s = t = 1$ .

Dessa forma, as condições ótimas para a produção do extrato utilizado no estudo da estabilidade foram determinadas a partir da interpretação da Figura 28, da qual se pode inferir que:

- A concentração de etanol na solução extratora não exerce influência no rendimento, assim, visando um processo em larga escala, é economicamente mais viável trabalhar com o menor nível para esta variável (-2), que corresponde a 0% de etanol, ou seja, extração somente com água;

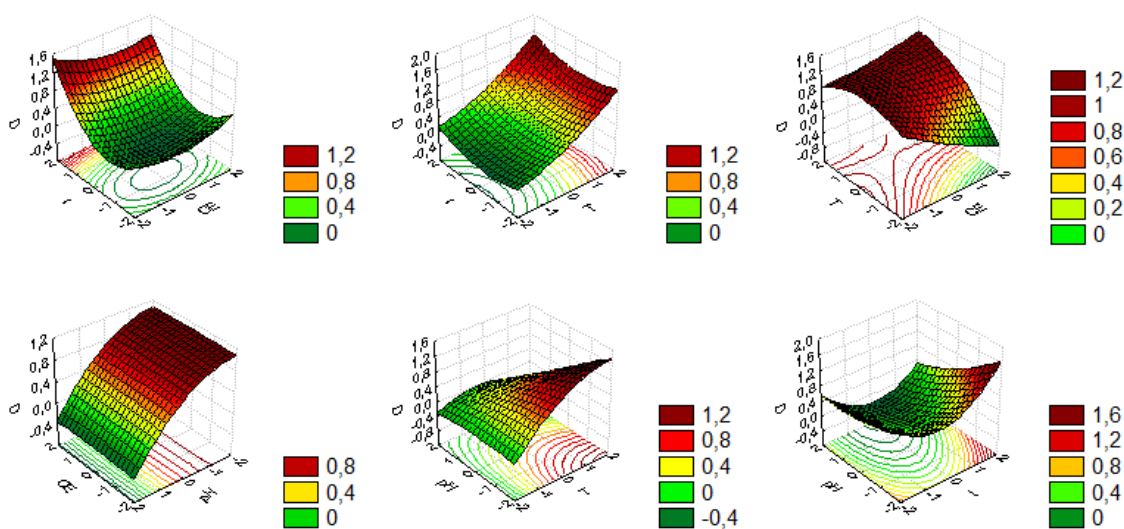
- O nível estabelecido para temperatura é equivalente a 55,7 °C, no entanto observa-se no gráfico que não há variação no rendimento aplicando-se temperaturas a partir de 53 °C (temperatura do ponto central do planejamento).

- Em relação ao tempo, a função é bastante específica e determina o nível +2 para esta variável, o qual corresponde ao tempo de 75 minutos.

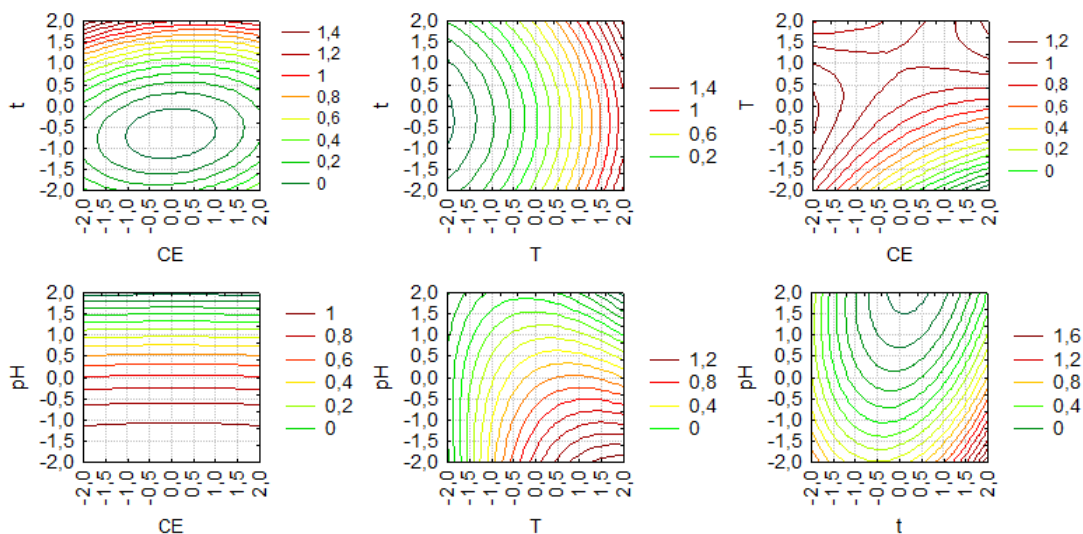
- Para o pH o nível determinado pela função corresponde ao valor de 5,5, porém observa-se que valores de  $\text{pH} \leq 7,0$  atendem a faixa determinada como “aceitável”.

Em resumo as condições consideradas ótimas para a extração de pigmento azul e genipina são: 0% de etanol (extração somente com água), a 53 °C por 75 minutos em pH 7,0. Cho et al. (2006) avaliaram as condições ótimas para síntese de pigmento azul e concluíram que na faixa de temperatura entre 25 e 75 °C, a mais adequada é 55 °C.

As Figuras 29 e 30 apresentam as superfícies de resposta e as curvas de nível, plotados segundo uma função quadrática, para D (eixo Z) em função das variáveis de entrada do planejamento (eixos X e Y).



**Figura 29** – Superfícies de resposta para a desejabilidade global (D)



**Figura 30** – Curvas de nível para a desejabilidade global (D)

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO PIGMENTO AZUL E DA GENIPINA

Para avaliação da estabilidade do pigmento azul e da genipina realizou-se a extração nas condições ótimas (0% de etanol a 53 °C por 75 minutos em pH 7,0) determinadas pela desejabilidade global (D). O rendimento da extração foi de 7,587 mg<sub>PA-GLU</sub>/g<sub>E</sub> e 8,468 mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>, o que representa um rendimento de acima do mínimo esperado para o pigmento azul (7,391 mg<sub>PA-GLU</sub>/g<sub>E</sub>) e 38,82% abaixo do mínimo esperado para genipina (13,842 mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>), tal variação poderia ser explicada por variações na matéria prima, ou falhas na manipulação do experimento.

Determinou-se ainda a concentração massa/volume (g/L) de PA e G que foi considerada como a concentração inicial da solução utilizada na avaliação da estabilidade, correspondente ao dia do início do experimento (t = 0).

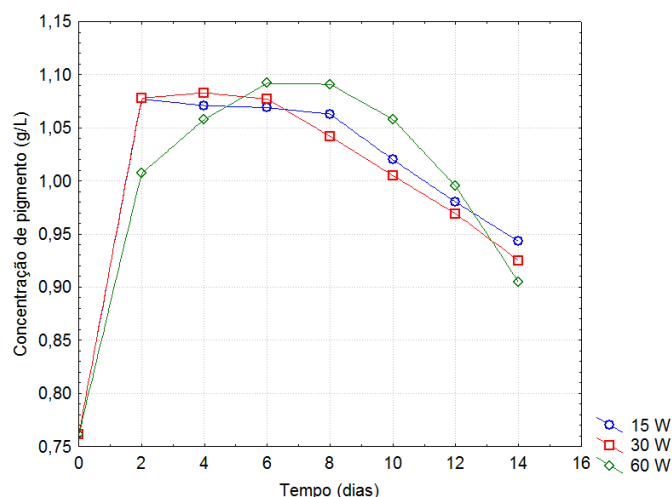
##### 4.7.1 Pigmento azul

###### 4.7.1.1 Efeito da luz

A Tabela 27 apresenta os resultados da concentração do extrato de jenipapo em relação ao pigmento azul, ao longo do período de exposição a diferentes condições de luminosidade.

Para as luminosidades produzidas pelas lâmpadas com as potências de 15 e 30 W (Figura 31), observa-se que há um aumento na concentração de pigmento azul

bastante acentuada dois dias após o início do experimento, seguida de uma fase de estabilização, que se estende até o 8º dia para 15 W e até o 6º dia para 30 W e por fim, inicia-se a degradação do pigmento. A análise dos dados (Tabela 27) mostrou não haver diferença significativa entre o efeito causado pelas lâmpadas de 15 e 30 W sobre o pigmento azul ( $p > 0,05$ ).



**Figura 31** – Efeito de diferentes intensidades luminosas sobre o pigmento azul

**Tabela 27** – Variação na concentração de pigmento azul (g/L) exposto a diferentes intensidades luminosas em relação ao tempo

Tempo (dias)	Intensidade luminosa (lux) <sup>1</sup>		
	975	3050	8200
0	0,761 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,761 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,761 ± 0,020 <sup>a</sup>
2	1,077 ± 0,025 <sup>a</sup>	1,078 ± 0,028 <sup>a</sup>	1,007 ± 0,020 <sup>b</sup>
4	1,071 ± 0,028 <sup>a</sup>	1,083 ± 0,022 <sup>a</sup>	1,058 ± 0,004 <sup>a</sup>
6	1,069 ± 0,012 <sup>a</sup>	1,077 ± 0,010 <sup>a</sup>	1,092 ± 0,006 <sup>a</sup>
8	1,063 ± 0,012 <sup>ab</sup>	1,042 ± 0,018 <sup>b</sup>	1,091 ± 0,017 <sup>a</sup>
10	1,020 ± 0,011 <sup>ab</sup>	1,005 ± 0,010 <sup>b</sup>	1,058 ± 0,024 <sup>a</sup>
12	0,980 ± 0,008 <sup>ab</sup>	0,969 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,995 ± 0,004 <sup>a</sup>
14	0,943 ± 0,017 <sup>a</sup>	0,925 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,905 ± 0,017 <sup>b</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

No caso do comportamento do pigmento diante da luminosidade proporcionada pela lâmpada de 60 W, observa-se também um aumento bastante acentuado na concentração de PA até o 2º dia, seguido de um aumento menos intenso até o 6º dia, onde ocorre uma fase de estabilização e por fim o declínio da

concentração de forma muito mais acentuada dos que para as demais condições (15 e 30 W).

A síntese de pigmento pós-extração pode ser devida à presença de genipina remanescente e fontes de amins primárias (aminoácidos livres e proteínas) no extrato. No entanto, observa-se para as três condições aqui discutidas um nível de saturação da síntese de pigmento para o qual poderiam ser atribuídas duas hipóteses: a taxa de degradação supera a taxa de síntese de pigmento deixando evidenciar a redução da concentração desta substância; ou as fontes de amins primárias foram esgotadas do extrato. A possibilidade de haver esgotado o conteúdo de genipina é descartada uma vez que esta também foi acompanhada pelo mesmo período, como será discutido posteriormente.

A degradação observada para as lâmpadas de 15, 30 e 60 W foi de 11,95; 14,59 e 17,12%, respectivamente, a partir do ponto onde a concentração de pigmento atingiu o máximo (4º dia para 15 e 30 W e 6º dia para 60 W). A concentração de pigmento azul final foi de 123,92; 121,55 e 118,92%, para as amostras submetidas à luz fluorescente de 15, 30 e 60 W, respectivamente.

Paik et al. (2001) acompanharam o efeito de diferentes intensidades luminosas sobre PA e também obtiveram formação de pigmento posteriormente ao método de síntese empregado; e concluíram que o pigmento é estável a luz.

Não foram ajustados modelos cinéticos de degradação neste caso, devido o comportamento anômalo do pigmento e em virtude de os pontos, a partir do qual é observado a degradação, serem poucos e estarem relativamente próximos, o que poderia tendenciar o ajuste do modelo de ordem aparente zero.

#### 4.7.1.2 Efeito da temperatura

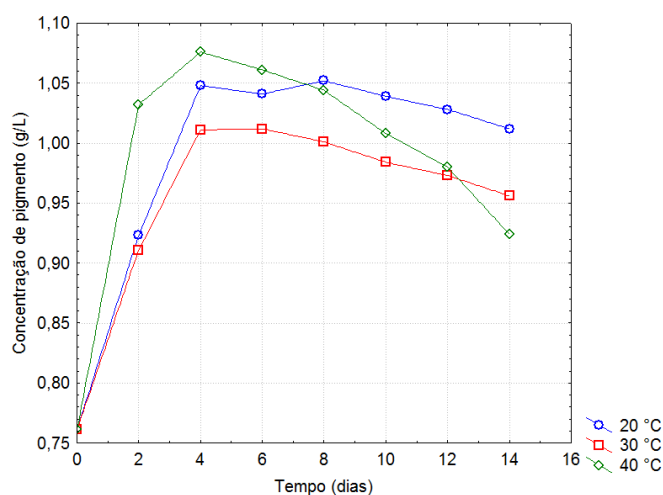
A Tabela 28 apresenta os dados referentes à concentração de PA ao longo do processo de exposição a diferentes temperaturas.

**Tabela 28** – Variação na concentração de pigmento azul (g/L) exposto a diferentes temperaturas em relação ao tempo

Tempo (dias)	Temperatura (°C)		
	20	30	40
0	0,761 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,761 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,761 ± 0,020 <sup>a</sup>
2	0,923 ± 0,024 <sup>a</sup>	0,911 ± 0,007 <sup>a</sup>	1,032 ± 0,026 <sup>b</sup>
4	1,048 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,011 ± 0,024 <sup>b</sup>	1,076 ± 0,010 <sup>a</sup>
6	1,041 ± 0,027 <sup>a</sup>	1,012 ± 0,006 <sup>a</sup>	1,061 ± 0,012 <sup>b</sup>
8	1,052 ± 0,005 <sup>a</sup>	1,001 ± 0,014 <sup>b</sup>	1,044 ± 0,011 <sup>a</sup>
10	1,039 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,984 ± 0,012 <sup>b</sup>	1,008 ± 0,003 <sup>c</sup>
12	1,028 ± 0,013 <sup>a</sup>	0,973 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,980 ± 0,014 <sup>b</sup>
14	1,012 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,956 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,924 ± 0,010 <sup>c</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

De forma análoga ao ocorrido em relação à luz, para as diferentes temperaturas também foi observada uma intensa síntese pós-extração, porém com menor intensidade que a observada para as diferentes intensidades luminosas. Ressalta-se ainda que apesar da temperatura de 40 °C provocar a síntese de quantidades significativamente maiores de pigmento em relação às temperaturas 20 e 30 °C, o seu efeito degradativo também é mais intenso (Figura 32).



**Figura 32** – Efeito de diferentes temperaturas sobre o pigmento azul

A degradação observada, a partir do ponto onde a concentração de pigmento atingiu o máximo (8º dia para 20 °C, 6º dia para 30 e 4º dia 40 °C) até o final do experimento, foi de 3,80; 5,53 e 14,13% para 20, 30 e 40 °C, respectivamente. A



concentração de pigmento azul final foi de 132,98; 125,62 e 121,42%, em relação à concentração inicial, para as amostras submetidas às temperaturas de 20, 30 e 40 °C, respectivamente.

Paik et al. (2001) avaliaram a estabilidade do pigmento azul exposto por dez horas a diferentes temperaturas (60 a 90 °C) e observaram que a 90 °C a amostra que mais degradou ainda permanecia com 78% da concentração inicial, relatando ainda que algumas amostras apresentaram, ao final do experimento, teores de pigmento maiores que o inicial (102%).

Neste caso também não foram ajustados modelos cinéticos de degradação, devido o comportamento anômalo do pigmento, como já foi discutido no item anterior.

## 4.7.2 Genipina

### 4.7.2.1 Efeito da luz

A Tabela 29 apresenta os resultados da concentração de genipina submetida a diferentes intensidades luminosas ao longo do tempo.

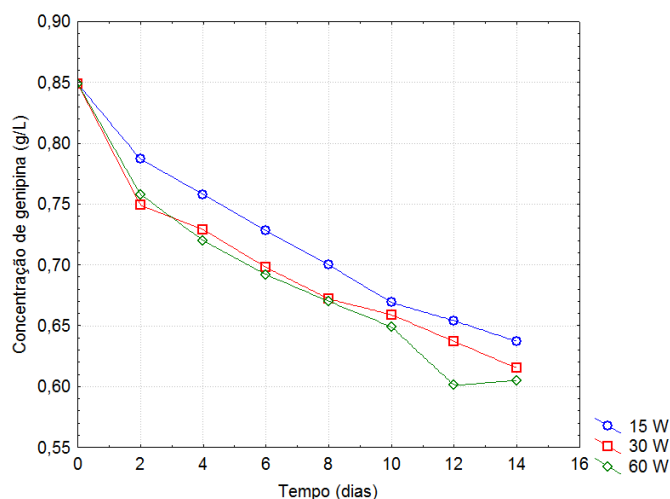
**Tabela 29** – Variação na concentração de genipina (g/L) exposta a diferentes intensidades luminosas em relação ao tempo

Tempo (dias)	Intensidade (lux) <sup>1</sup>		
	975	3050	8200
0	0,849 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,849 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,849 ± 0,029 <sup>a</sup>
2	0,787 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,749 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,758 ± 0,009 <sup>a</sup>
4	0,758 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,729 ± 0,007 <sup>b</sup>	0,720 ± 0,010 <sup>b</sup>
6	0,728 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,698 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,692 ± 0,009 <sup>a</sup>
8	0,700 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,672 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,670 ± 0,016 <sup>a</sup>
10	0,669 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,659 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,649 ± 0,016 <sup>a</sup>
12	0,654 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,637 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,601 ± 0,003 <sup>c</sup>
14	0,637 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,615 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,605 ± 0,010 <sup>b</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A análise dos dados mostra que de forma geral não houve diferença entre a utilização das potências de 30 e 60 W em relação à taxa de degradação de genipina

( $p > 0,05$ ). A figura 33 ilustra o decréscimo na concentração da referida substância ao longo do tempo, devido à ação das diferentes intensidades luminosas. Observou-se uma redução de 24,97; 27,56 e 28,74% na concentração de genipina submetida às lâmpadas de 15, 30 e 60 W, respectivamente.



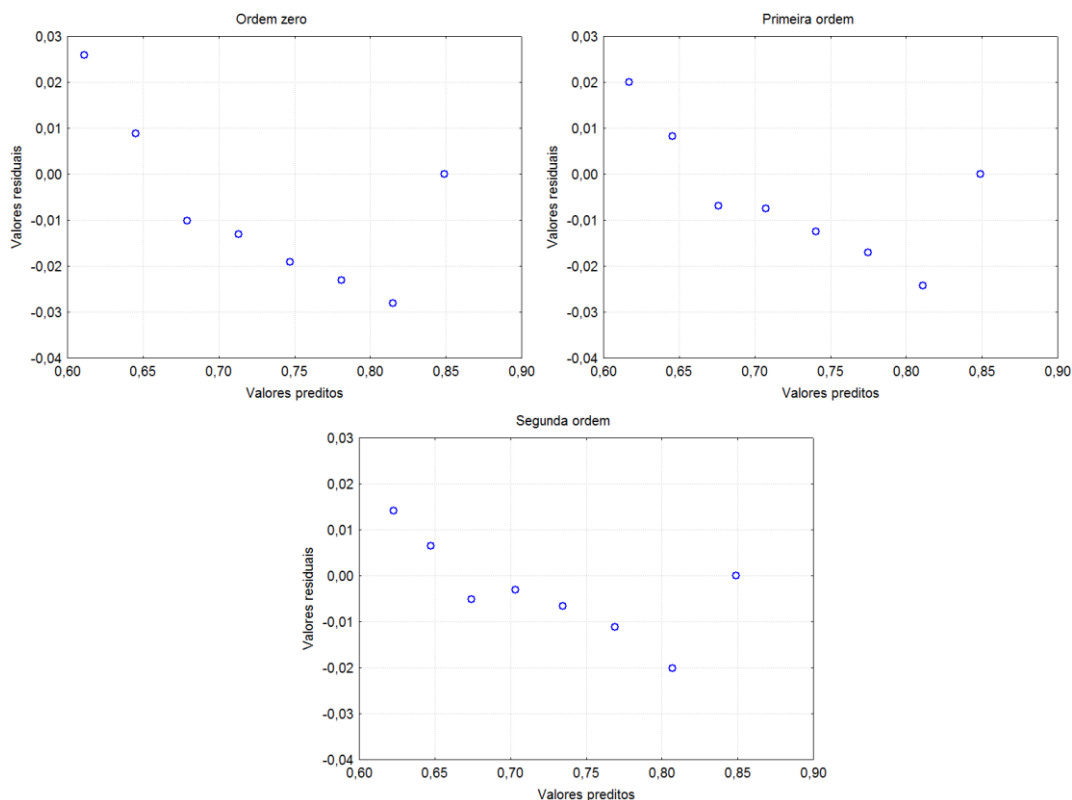
**Figura 33** – Degradação de genipina em diferentes intensidades luminosas

Para determinar a ordem aparente de reação, foram testados três modelos cinéticos e os parâmetros estimados para cada um encontram-se na Tabela 30.

**Tabela 30** – Parâmetros dos modelos testados para as reações de fotodegradação da genipina

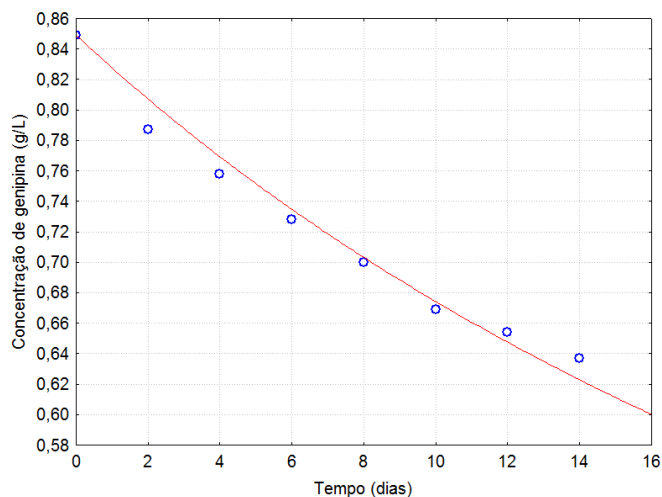
Modelo	$C = C_o - kt$		$C = C_o e^{-kt}$		$C = \frac{1}{kt + \frac{1}{C_o}}$	
	Zero		Primeira		Segunda	
Ordem	Zero		Primeira		Segunda	
Parâmetros	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>
975 lux	$1,699 \times 10^{-2}$	0,9266	$2,280 \times 10^{-2}$	0,9565	$3,056 \times 10^{-2}$	0,9768
3050 lux	$1,915 \times 10^{-2}$	0,7686	$2,632 \times 10^{-2}$	0,8329	$3,617 \times 10^{-2}$	0,8825
8200 lux	$2,047 \times 10^{-2}$	0,8338	$2,842 \times 10^{-2}$	0,8896	$3,941 \times 10^{-2}$	0,9293

Para a lâmpada de 15 W observou-se pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que o modelo que explicou a maior parte das variações em torno da média foi o de segunda ordem ( $R^2 = 0,9768$ ). A confirmação da adequação do modelo foi realizada por meio da análise dos resíduos gerados em cada modelo (Figura 34).



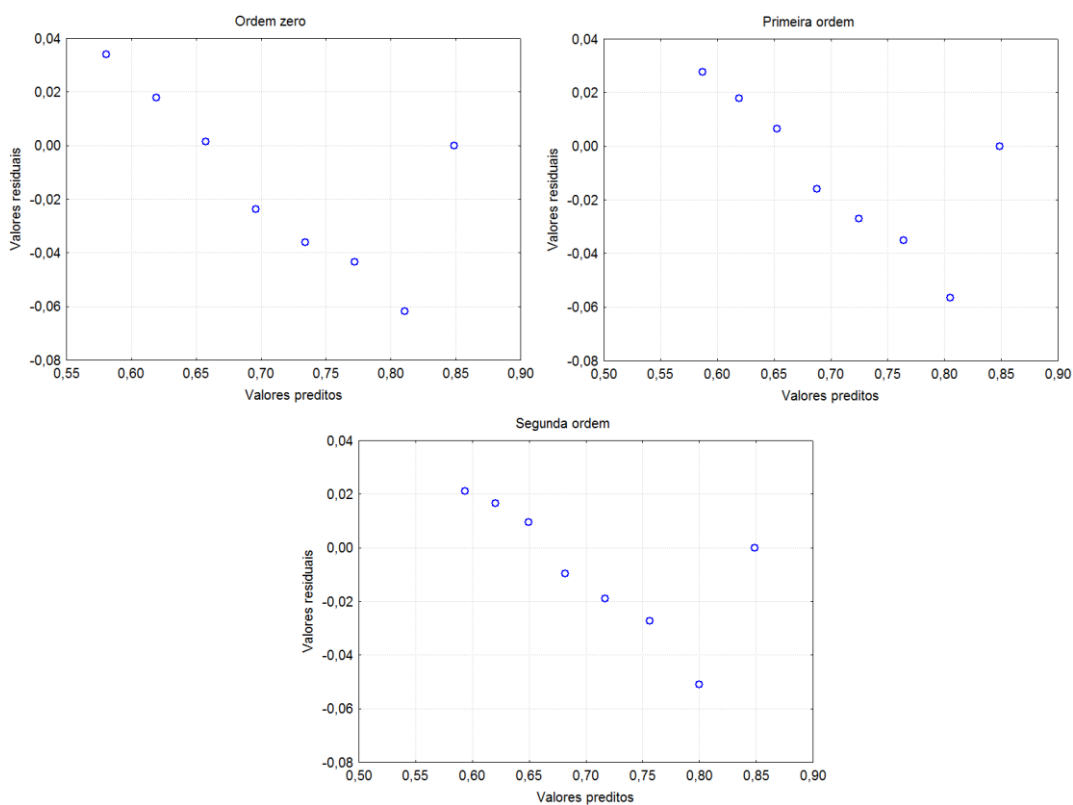
**Figura 34** – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 975 lux

Observou-se que o modelo de segunda ordem apresentou melhor distribuição dos resíduos, o que permitiu considerá-lo como preditivo e mais adequado para a reação de degradação da genipina sob incidência de uma lâmpada de 15 W. A velocidade de degradação estimada foi de  $3,056 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tempo de meia vida (segundo equação da Tabela 5) foi de 38,54 dias. A curva característica do modelo, ajustado aos pontos experimentais, pode ser visualizada na Figura 35.



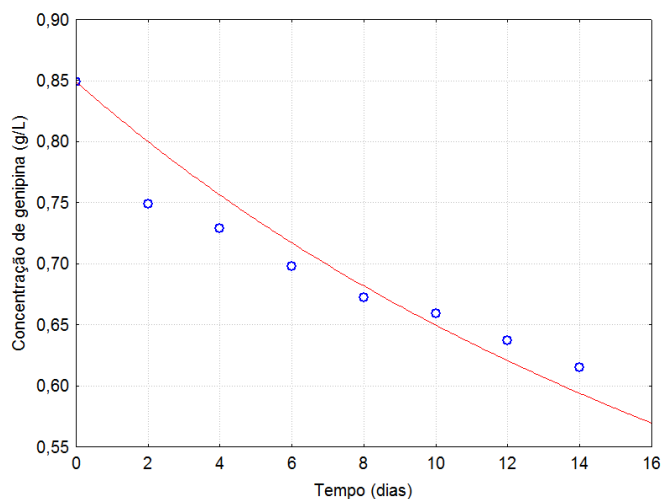
**Figura 35** – Ajuste do modelo de segunda ordem para 975 lux

Para a lâmpada de 30 W de potência, o modelo de segunda ordem apresentou melhor ajuste, em relação ao coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,8825$ ). A análise dos resíduos (Figura 36) mostrou que para este modelo, a amplitude dos resíduos é menor e mais concentrada em torno de zero, sendo considerado mais preditivo que os demais e o mais adequado para a degradação da genipina sob influência de luz fluorescente de 30 W.



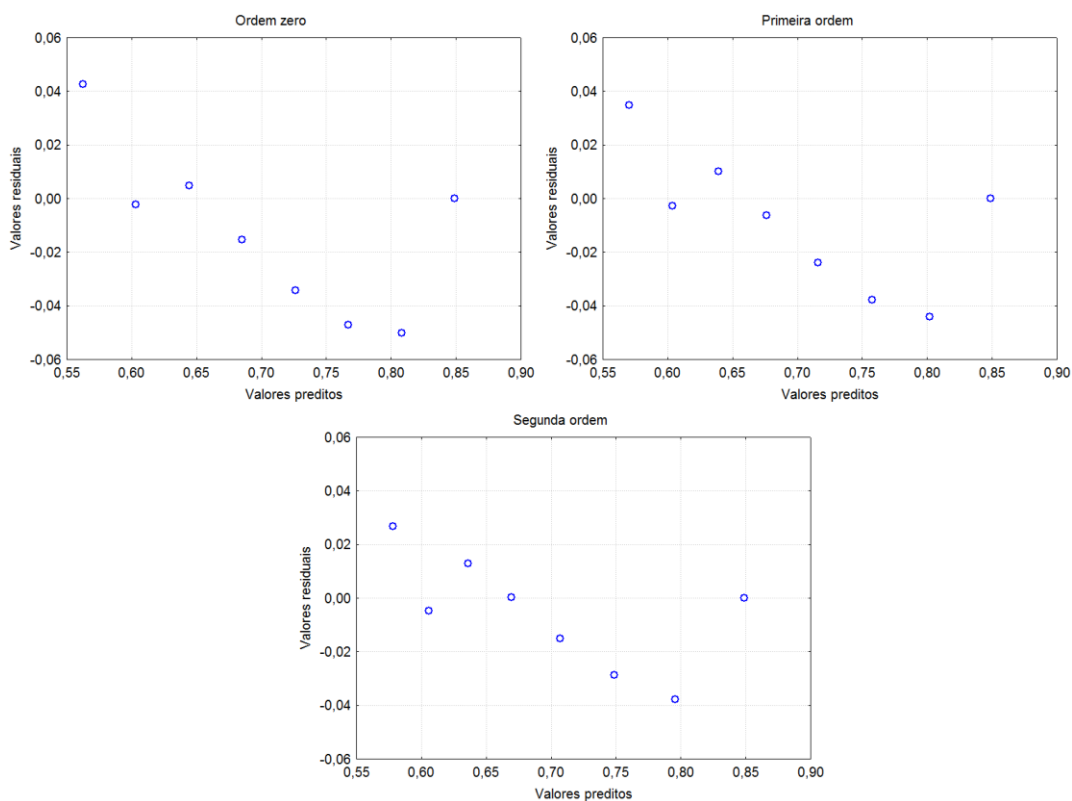
**Figura 36** – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 3050 lux

A velocidade de degradação calculada para este modelo foi de  $3,617 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tempo de meia-vida foi de 32,56 dias. O comportamento da curva representativa do modelo de 2ª ordem ajustada aos pontos experimentais está ilustrado na Figura 37.



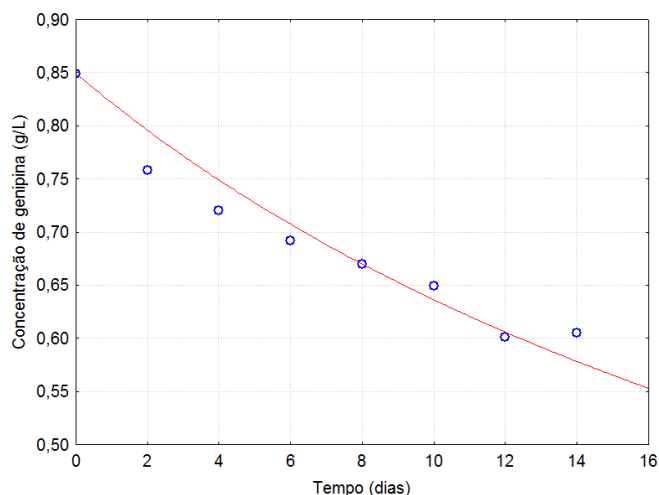
**Figura 37** – Ajuste do modelo de segunda ordem para 3050 lux

Para a lâmpada de 60 W, o modelo que conseguiu explicar a maior parte das variações experimentais em torno da média foi o de segunda ordem ( $R^2 = 0,9293$ ). Por meio da análise dos resíduos (Figura 38) pode-se visualizar que tal modelo é, de fato, mais preditivo que os demais, uma vez que os resíduos apresentam menor amplitude e localizam-se mais próximos de zero.



**Figura 38** – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 8200 lux

A curva representativa do modelo de segunda ordem ajustada aos pontos experimentais pode ser visualizada na Figura 39, para a qual a velocidade de degradação da genipina foi de  $3,941 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tempo de meia-vida foi de 29,89 dias.



**Figura 39** – Ajuste do modelo de segunda ordem para 8200 lux

#### 4.7.2.2 Efeito da temperatura

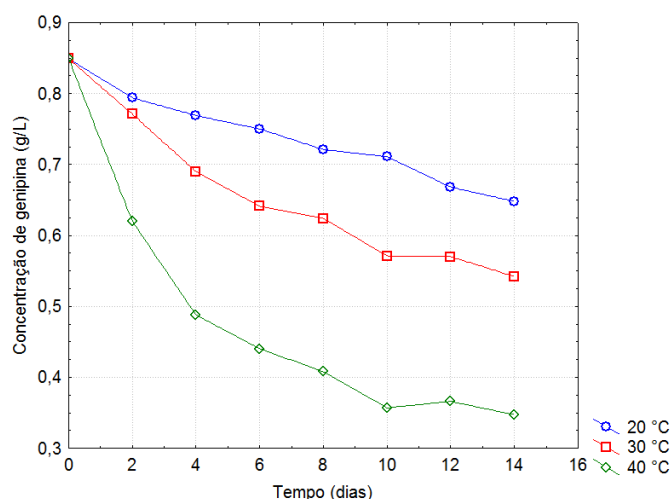
Na Tabela 31 pode-se observar a variação na concentração de genipina submetida a diferentes temperaturas ao longo do tempo.

**Tabela 31** – Variação na concentração de genipina (g/L) exposta a diferentes temperaturas em relação ao tempo

Tempo (dias)	Temperatura (°C)		
	20	30	40
0	0,849 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,849 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,849 ± 0,029 <sup>a</sup>
2	0,794 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,771 ± 0,026 <sup>a</sup>	0,620 ± 0,005 <sup>b</sup>
4	0,769 ± 0,020 <sup>a</sup>	0,690 ± 0,009 <sup>b</sup>	0,488 ± 0,018 <sup>c</sup>
6	0,750 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,641 ± 0,007 <sup>b</sup>	0,440 ± 0,006 <sup>c</sup>
8	0,721 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,624 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,408 ± 0,012 <sup>c</sup>
10	0,711 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,571 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,357 ± 0,003 <sup>c</sup>
12	0,668 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,570 ± 0,006 <sup>b</sup>	0,366 ± 0,002 <sup>c</sup>
14	0,648 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,542 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,347 ± 0,003 <sup>c</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A análise de variância mostra que a partir do quarto dia de exposição, a degradação a 40 °C foi mais acentuada que a 30 °C, e esta, por sua vez foi mais intensa que a 20 °C ( $p < 0,05$ ). Na Figura 40 pode-se visualizar o decréscimo da concentração de genipina ao longo do tempo devido a ação das diferentes temperaturas. Observou-se uma degradação de 23,67; 36,16 e 59,13% do teor de genipina submetida às temperaturas de 20, 30 e 40 °C, respectivamente.



**Figura 40** – Degradação de genipina em diferentes temperaturas

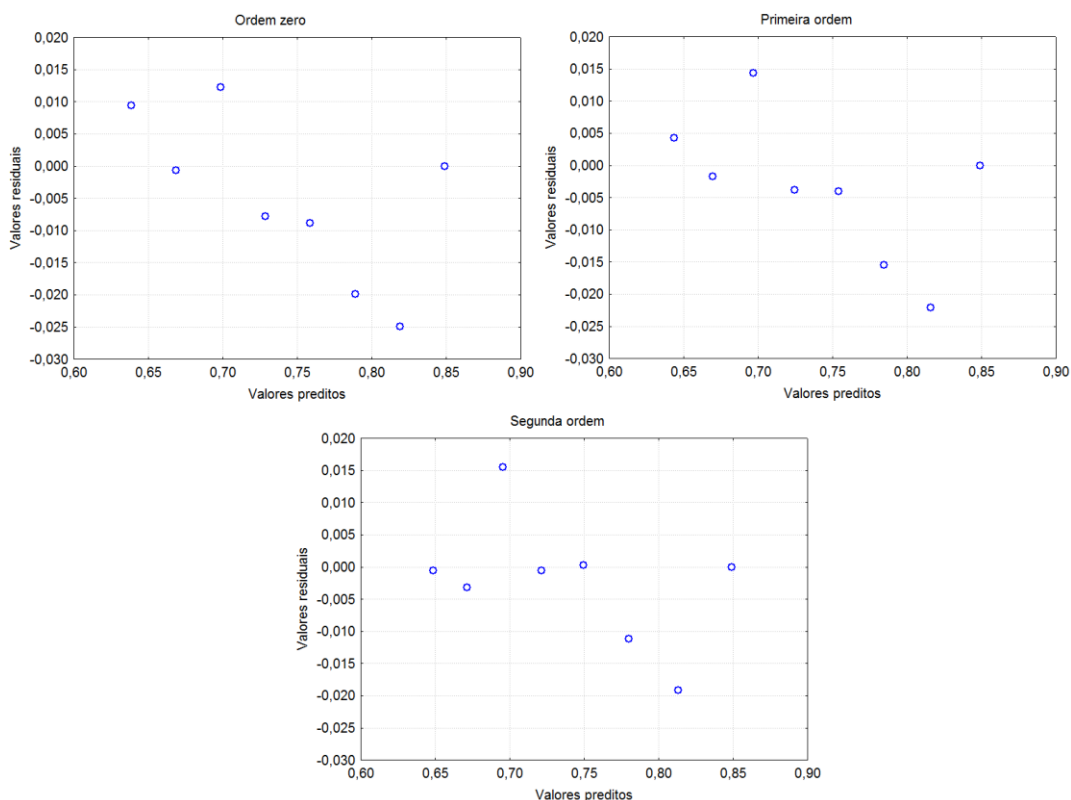
Os modelos testados para determinar a ordem aparente da reação de degradação, bem como os parâmetros gerados a partir deles, para os dados experimentais encontram-se na Tabela 32.

**Tabela 32** – Parâmetros dos modelos testados para as reações de termodegradação da genipina

Modelo	$C = C_0 - kt$		$C = C_0 e^{-kt}$		$C = \frac{1}{kt + \frac{1}{C_0}}$	
	Ordem	Zero	Primeira	Segunda	Ordem	Segunda
Parâmetros	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>	k	R <sup>2</sup>
20 °C	$1,503 \times 10^{-2}$	0,9543	$1,977 \times 10^{-2}$	0,9678	$2,560 \times 10^{-2}$	0,9758
30 °C	$2,548 \times 10^{-2}$	0,8608	$3,709 \times 10^{-2}$	0,9272	$5,377 \times 10^{-2}$	0,9669
40 °C	$4,577 \times 10^{-2}$	0,5244	$8,804 \times 10^{-2}$	0,8123	$16,381 \times 10^{-2}$	0,9443

Para 20 °C observa-se que todos os modelos apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, dado pelos elevados coeficientes de determinação ( $R^2$ ), sendo

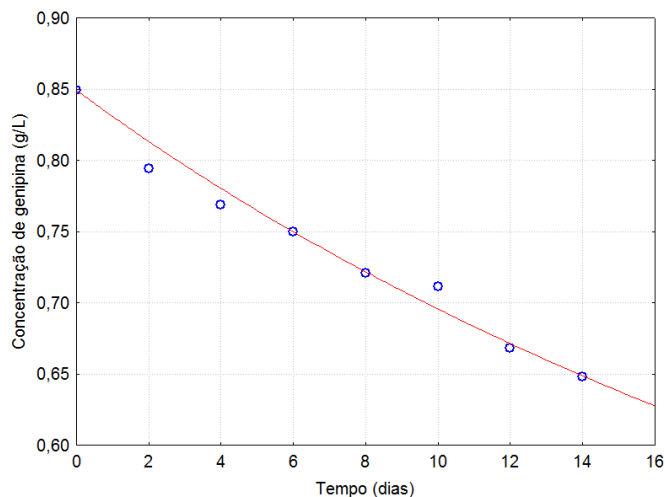
o modelo de segunda ordem o que explica a maior porcentagem das variações em torno da média (97,58%). Para confirmação de que tal modelo é o mais adequado, realizou-se a análise dos resíduos gerados em cada modelo (Figura 41), na qual se observa que todos possuem uma distribuição aleatória, sem tendências. Entretanto o modelo de segunda ordem apresentou a menor amplitude de resíduos, consolidando-se como o mais preditivo.



**Figura 41** – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 20 °C

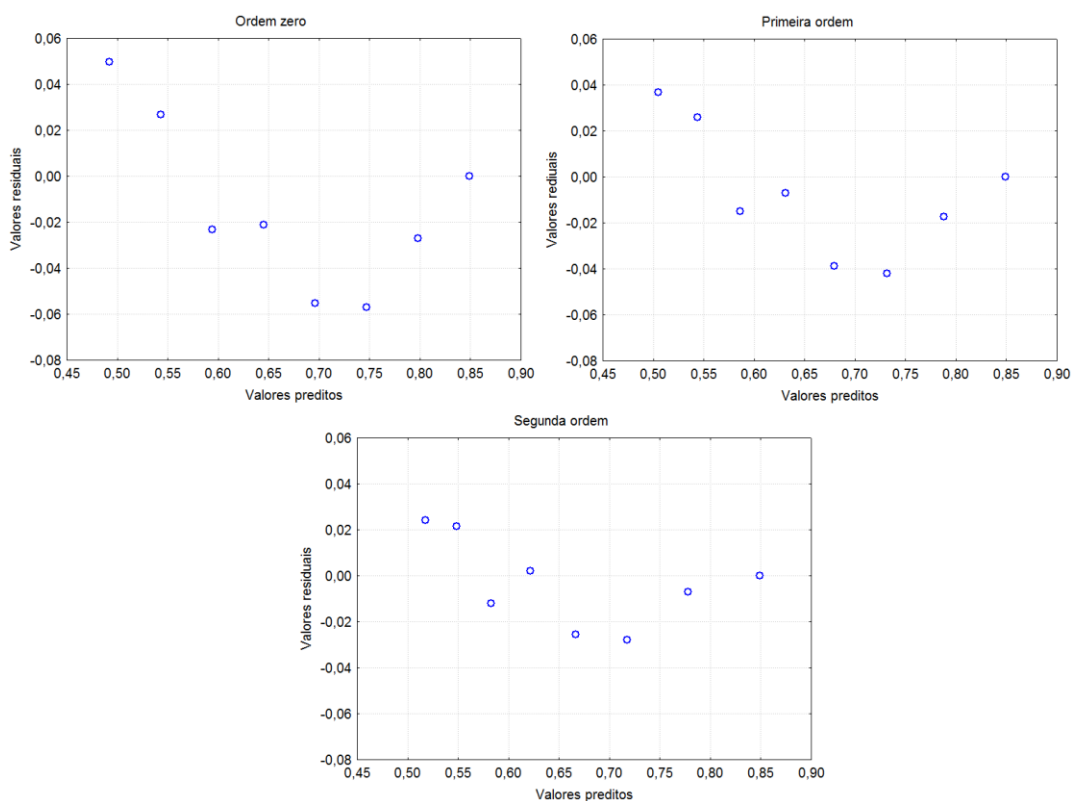
A Figura 42 apresenta o modelo de segunda ordem ajustado aos dados experimentais, para o qual a velocidade de degradação da genipina exposta à temperatura de 20 °C foi de  $2,560 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  e o tempo de meia-vida foi de 46,01 dias.





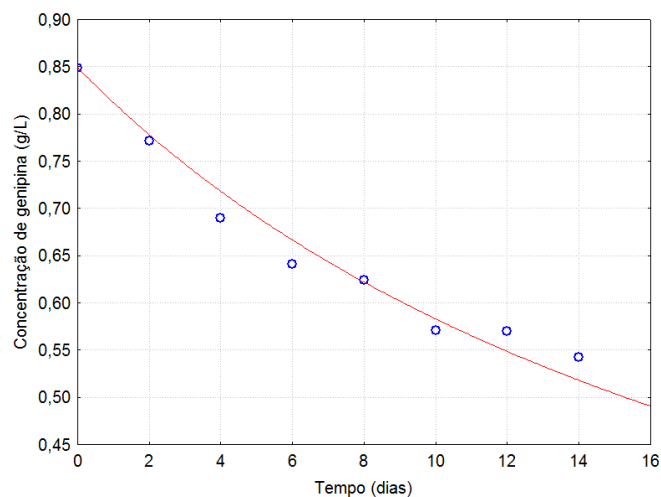
**Figura 42** – Ajuste do modelo de segunda ordem para 20 °C

Para a temperatura de 30 °C o modelo que conseguiu explicar a maior parte das variações experimentais foi o de segunda ordem ( $R^2 = 0,9669$ ), e a análise de resíduos (Figura 43) confirmou que tal modelo também foi o mais preditivo, pois seus resíduos apresentaram uma distribuição aleatória e de amplitude reduzida, enquanto os demais modelos mostraram resíduos com distribuição tendenciosa.



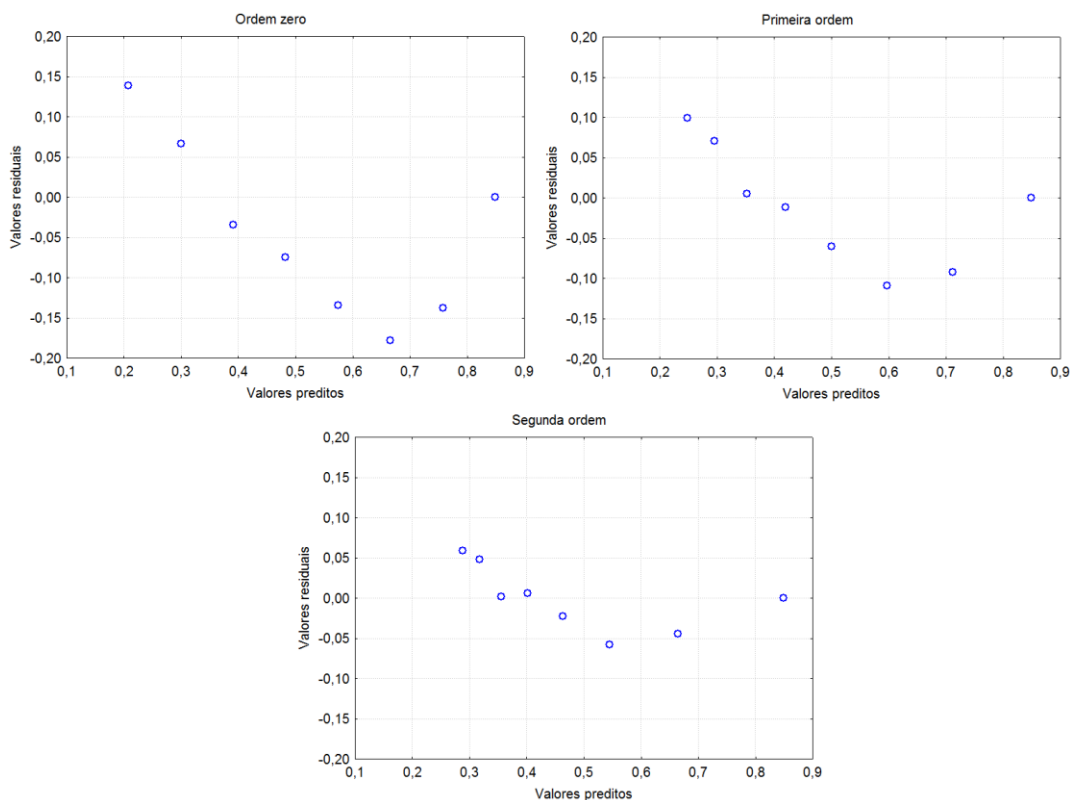
**Figura 43** – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 30 °C

O modelo de segunda ordem, ajustado aos dados experimentais, pode ser visualizado na Figura 44. Para esta ordem aparente de reação, a degradação da genipina a 30 °C apresentou uma velocidade de reação de  $5,377 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  e tempo de meia-vida de 21,90 dias.



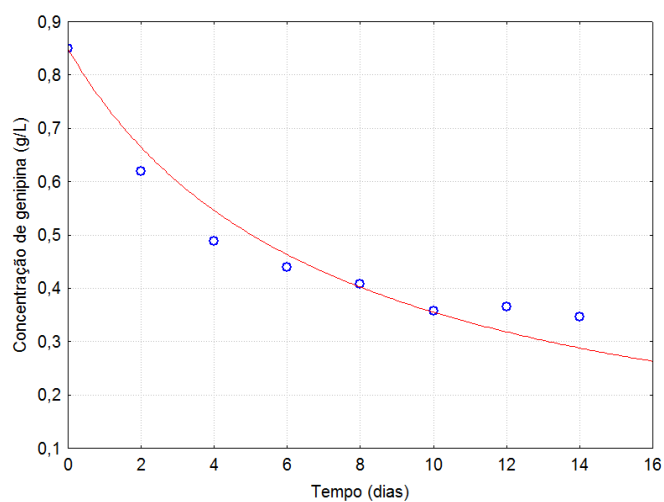
**Figura 44** – Ajuste do modelo de segunda ordem para 30 °C

Para a temperatura de 40 °C o modelo de segunda ordem foi o que conseguiu explicar o maior percentual de variações (94,43%), e a análise de resíduos (Figura 45) confirmou o caráter preditivo do modelo, uma vez que seus resíduos apresentaram distribuição aleatória e de amplitude reduzida, enquanto os demais apresentaram distribuição sistemática dos resíduos.



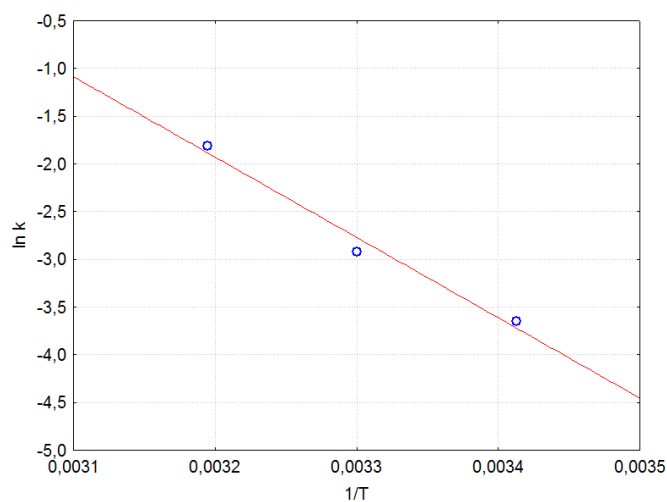
**Figura 45** – Distribuição de resíduos dos modelos testados para 40 °C

A Figura 46 apresenta o modelo de segunda ordem ajustado aos dados experimentais, segundo o qual a velocidade de reação para degradação da genipina a 40 °C foi de  $16,381 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  e tempo de meia-vida de 7,19 dias. Neste caso pode-se confirmar o tempo de meia-vida previsto, observando-se a Tabela 31, onde aproximadamente metade da concentração foi atingida no oitavo dia.



**Figura 46** – Ajuste do modelo de segunda ordem para 40 °C

A Equação Arrhenius (Equação 1) é o modelo matemático mais empregado para descrever a perda de qualidade em função da temperatura, assim, a partir da derivação desta equação, plotou-se no gráfico da Figura 47 o  $\ln k$  em função do inverso da temperatura absoluta ( $1/T$ ).



**Figura 47** – Relação entre degradação de genipina e temperatura

A relação da degradação da genipina com a temperatura mostrou-se adequada, com  $R^2 = 0,9805$ . A energia de ativação ( $E_a$ ) estimada foi de 69,951 KJ/mol.

## 5 CONCLUSÕES

Na caracterização física os frutos apresentaram uma distribuição normalizada em relação ao peso, com média de 140,10 g e dimensões médias de 73,10 mm para o diâmetro longitudinal e 63,22 mm para o diâmetro transversal e rendimento médio de endocarpo de 29,38%.

Em relação às características físico-químicas, o mesocarpo apresentou maiores teores de água, açúcares totais e redutores e sólidos solúveis, que o endocarpo, o qual apresentou maiores teores de proteínas, lipídios, fibras totais e insolúveis, pH e acidez total titulável.

Os aminoácidos predominantes no mesocarpo (fresco e oxidado) foram: ácido aspártico, ácido glutâmico e cistina; e no endocarpo (fresco e oxidado) foram: ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina. O fato de não haver diferença entre a mesma porção do fruto fresca e oxidada significa que apesar da complexação com a genipina durante a formação do pigmento, os aminoácidos são recuperados integralmente na etapa de hidrólise da análise de quantificação dos mesmos.

O pigmento azul, formado a partir de ácido glutâmico e genipina, apresentou comprimentos de onda máximos a 286 nm (região do UV) e a 605 nm (região do visível) e a genipina a 241 nm. O método para correção da absorbância de genipina em solução contendo pigmento azul mostrou-se adequado, não havendo diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre a curva do padrão de genipina e a curva obtida pelo método.

Por meio de experimentos estatisticamente planejados, observou-se para a extração de pigmento azul um rendimento máximo de 7,391 mg<sub>PA-GLU</sub>/g<sub>E</sub>, e que as variáveis independentes, concentração de etanol (linear), tempo (quadrático), pH (linear) e a interação entre concentração de etanol e tempo influenciam significativamente o rendimento. Para a extração de genipina, obteve-se rendimento máximo de 13,842 mg<sub>G</sub>/g<sub>E</sub>, e que as variáveis independentes, concentração de etanol (linear), temperatura (linear), pH (linear) e a interação entre tempo e pH, mostraram influência sobre o rendimento.

A análise da desejabilidade global indicou como ponto ótimo do planejamento as seguintes condições de extração: 0% de etanol (extração com água), 53 °C, 75 minutos e pH 7,0. O extrato obtido a partir destes parâmetros atingiu 102,65% do esperado para o pigmento azul e 61,18% do esperado para genipina.

Na avaliação da estabilidade observou-se a ocorrência de síntese de pigmento azul em todas as condições avaliadas de luz e temperatura, seguida por uma breve fase de estabilidade e finalmente por uma fase de declínio. Ao final do experimento a concentração de pigmento azul foi de 123,92; 121,55 e 118,92% do teor inicial, para as amostras submetidas às intensidades luminosas geradas por luzes fluorescentes de 15, 30 e 60 W, respectivamente. Concentrações de pigmento azul de 132,98; 125,62 e 121,42% foram obtidas para as amostras submetidas às temperaturas de 20, 30 e 40 °C, respectivamente.

Para a cinética de degradação da genipina propôs-se uma ordem aparente de segundo grau, e que o tempo de meia-vida decresce com o aumento da temperatura e da intensidade luminosa. A energia de ativação estimada para a genipina foi de 69,951 KJ/mol.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S.P. **Cerrado**: aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 1998. 188p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official method of analysis of AOAC**. 16 ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1141p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. 480p.

BENTO, R.A. **Influência das variáveis do processo sobre a qualidade do jenipapo (*Genipa americana* L.) desidratado osmoticamente**. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

BLIGH, E.G; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, Ottawa, n.37, p.911-917, 1959.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 3ª ed. rev. atual. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BOX, G.P.; HUNTER, J.S. HUNTER, W.G. **Estatítics for experimenters**: design, innovation, and discovery. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005. 633 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 4, de 15 de janeiro de 2007a. Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 13: Molhos e Condimentos. **Diário Oficial da União**. 17 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=27988&word=>>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007b. Aprova o Regulamento Técnico sobre "Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16.2: Bebidas Não Alcoólicas, Subcategoria 16.2.2: Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas", que consta como Anexo da presente Resolução. **Diário Oficial da União**. 17 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 65, de 04 de outubro de 2007c. Dispõe sobre o uso de aditivos alimentares para geléias e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. 08 de outubro de 2007. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=28459&word=>>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 64, de 16 de setembro de 2008. Aprova Regulamento Técnico sobre Atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. **Diário Oficial da União**. 17 de setembro de 2008. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=33014&word=corante>>. Acesso em: 29 out. 2008.

BRASIL. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 2, de 28 de janeiro de 1987. Exclui da Tabela I do Decreto 55871/65, os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015) Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69800) Laranja GGN (15980) Vermelho Sólido E (16045) E Escarlate GN (14815) para uso em alimentos. **DINAL**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10190&word=>>>. Acesso em: 29 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**. 28 de outubro de 1997. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=88>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

CALIL, R.; AGUIAR, J. **Aditivos nos alimentos**. São Paulo: R.M. Calil, 1999. 139p.

CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O; MÜLLER, C.H. **Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia**. Belém: EMBRAPA – CPATU, 1998. 18p. (EMBRAPA – CPATU. Boletim de Pesquisa, 203).

CASTILLO, E.D.; MONTGOMERY, D.C.; McCARVILLE, D.R. Modified desirability functions for multiple response optimization. **Journal of Quality Technology**, Milwaukee, v. 28, p. 337-345, 1996.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. CNPq: Museu Paraense Emílio Goeldi. 5ª ed. Coleção Adolfo Ducke. Belém: CEJUP, 1991. 279p. (Coleção Adolfo Ducke)

CHO, Y.J.; KIM, S.Y.; KIM, J.; CHOE, E.K.; KIM, S.I.; SHIN, H.-J. One-step enzymatic synthesis of blue pigment from geniposide for fabric dyeing. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 11, p. 230-234, 2006.

CHOW, S.-C. (ed.). **Statistical design and analysis of stability studies**. Boca Raton: CRC, 2007. 330p.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. (Ed). **Fennema's food chemistry**. 4th ed. Boca Raton: CRC, 2007. 1144p.



DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. Boca Raton: CRC, 2002. 327p.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, Milwaukee, v. 12, p. 214-219, 1980.

DJERASSI, C.; GRAY, D.; KINCL, F.A. Naturally occurring oxygen heterocycles. IX. Isolation and characterization of genipin. **Journal of Organic Chemistry**. Washington, v. 25, n. 12, p. 2174-2177, 1960.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35. p. 5-22, 2000.

ENDO, T.; TAGUCHI, H. The constituents of *Gardenia jasminoides* geniposide and genipin-gentiobioside. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 21, n. 12, p. 2684-2688, 1973.

FDA. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations**, Title 21, Vol. 1, Part 74 - Listing of color additives subject to certification. Revised as of April 1, 2009. U.S. Food and Drug Administration, 2009. Disponível em: <[http://data.gbif.org/occurrences/searchCountries.htm?c\[0\].s=20&c\[0\].p=0&c\[0\].o=14262117](http://data.gbif.org/occurrences/searchCountries.htm?c[0].s=20&c[0].p=0&c[0].o=14262117)>. Acesso em: 13 fev. 2010.

FRANCIS, J.K. **Genipa americana L. Jagua, genipa. Rubiaceae. Madder family**. New Orleans, LA: USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry. 5p, 1993.

FREEMAN, H.S.; PETERS, A.T. (Ed). **Colorants for non-textile applications**. Amsterdam: Elsevier, 2000. 618p.

GBIF. Global Biodiversity Information Facility. **Species: *Genipa americana* L.** Disponível em: <[http://data.gbif.org/occurrences/searchCountries.htm?c\[0\].s=20&c\[0\].p=0&c\[0\].o=14262117](http://data.gbif.org/occurrences/searchCountries.htm?c[0].s=20&c[0].p=0&c[0].o=14262117)>. Acesso em: 13 dez. 2008.

HANSEN, D.S.; SILVA, S.A.; FONSECA, A.A.O.; HANSEN, O.A.S.; FRANÇA, N.O. Caracterização química de frutos de jenipapeiros nativos de Recôncavo Baiano visando ao consumo natural e industrialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v. 30, n. 4, p. 964-969, Dez. 2008.

HANSEN, D.S.; SILVA, S.A.; FONSECA, A.A.O.; SALDANHA, R.B.; SILVA, S.M.P.C.; GARCIA, F.R. Jenipapeiros nativos do recôncavo baiano: dissimilaridade e caracterização física de frutos. **Magistra**. Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 4, p. 359-366, Out./Dez., 2007.

HOFFMANN, F.L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**. São Paulo, n. 9, p. 23-30, Jul./Ago., 2001.

HUNGER, K. (Ed.). **Industrial dyes: chemistry, properties, applications**. Weinheim: WILEY-VCH, 2003. 660p.

IMAZAWA, T.; NISHIKAWA, A.; FURUKAWA, F.; KASAHARA, K.; IKEDA, T.; TAKAHASHI, M.; HIROSE, M. Lack of carcinogenicity of gardenia blue colour given chronically in the diet to F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, p. 313-318, 2000.

IPEF. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. **Identificação de espécies florestais**. Piracicaba/SP. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=6>>. Acesso em: 15 abr. 2008.

KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (ed.). **The stability and shelf-life of food**. Boca Raton: CRC Press, 2000.

KUEHNI, R.G. **Color: an introduction to practice and principles**. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2004. 199 p.

LEE, J.-Y.; HAHN, T.-R.; PAIK, Y.-S. Physicochemical characteristics for the transformation of the blue pigments from genipina of *Gardenia jasminoides* with amino acids. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**. Korea South, v. 41, n. 5, p. 399-404, 1998.

LEE, S.W.; LIM, J.-M.; BHOO, S.-H.; PAIK, Y.-S.; HAHN, T.-R. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 480, p. 267-274, 2003.

LINDINO, C.A.; JÚNIOR, A.C.G.; SCHREINER, G.G.O.; SCHREINER, J.S.; FARINA, L.O. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. **Acta Scientiarum: Technology**. Maringá, v. 30, n. 1, p. 93-98, 2008.

MACDOUGALL, D.B. (Ed.). **Colour in food: Improving quality**. Boca Raton: CRC, 2002. 378p.

MAHAN, B.M.; MYERS, R.J.; **Química – um curso universitário** (tradução da 4ª edição americana). Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo-SP, 1995. 604p.

MAN, D. **Food industry briefing series: shelf life**. Oxford: Blackwell Science, 2002.

MARCZENKO, Z.; BALCERZAK, M. **Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2000. 521p.

MARTINS, L.; COUTINHO, E.L.; PANZANI, C.R.; CHAVIER, N.J.D. **Fruteiras nativas do Brasil e exóticas**. Campinas: Cinco continentes. 2002. 112p.

MILONE, G. **Estatística geral e aplicada**. São Paulo: Thomson, 2006.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972 . 627.

MORITOME, N.; KISHI, Y.; FUJII, S. Properties of red pigments prepared from geniposidic acid and amino acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. London, v. 79, p. 810-814, 1999.

MULTON, J.L. (Coord.). **Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias**. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1999. 836p.

NAZARÉ, R.F.R.; ALVES, S.M.; BARBOSA, W.C., RODRIGUES, I.A.; FARIA, L.J. G.; KUSUHARA, K. **Estudos para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na flora Amazônica**. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido. Belém: Embrapa-CPATU:JICA, 1996. p. 173-191.

NIELSEN, S.S. (Ed.). **Food analysis**. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 1994. 630p.

NOLLET, L.M.L. (Ed.). **Food analysis by HPLC**. 2nd ed. rev. exp. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. 1049p.

PAIK, Y.-S.; LEE, C.-M.; CHO, M.-H.; HAHN, T.-R. Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: effects of ph, temperature, and light. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 49, p. 430-432, 2001.

PARK, J.-E.; LEE, J.-Y; KIM, H.-G.; HAHN, T.-R; PAIK, Y.-S. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *gardenia jasminoides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 50, p. 6511-6514, 2002.

PARLAMENTO EUROPEO Y CONSEJO. Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de junio de 1994. "Relativa a los corantes utilizados em los productos alimenticios". Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 237: 13-29, 1994.

PENALBER, T.J. A.; SADALA, M. A. C.; CASTRO, M. S.; FARIA, L. J. G. Ensaio de extração e aplicação do corante do fruto do jenipapeiro (*Genipa americana*). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. Viçosa, v. 1, n. 2, p. 129-135, 1996.

PICSEARCH. Picsearch: Genipa americana. Disponível em: <<http://toptropicals.com/pics/garden/05/23/3223.jpg>>. Acesso em: 13 dez. 2008.

RENHE, I.R.T. **Extração e estabilidade do corante azul de jenipapo** (*Genipa americana* L.). 2008. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

SABIR, J.S.M. Cytogenetic evaluation of natural and synthetic mixtures of green-s and chlorophyll and/or royal jelly as food additives. **World Journal of Agricultural Science**. v. 2, n. 4, p. 435-438, 2006.

SANTOS, R.O.S.; DANTAS, A.C.V.L.; FONSECA, A.A.O.; SILVA, S.A.; LORDELO, L.S.; DOS SANTOS, K.V. Dispersão da variabilidade fenotípica de jenipapeiros de Cruz das Almas, Bahia. **Magistra**. Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 4, p. 337-345, Out./Dez., 2007.

SILVA, A.P.; LIMA, C.L.C.; VIEITES, R.L. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 55, n. 1, Jan./Abr. 1998.

SILVA, D.B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas do cerrado**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2001. 179p.

SILVA, J.A.; SILVA, D.J.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA – CPAC: EMBRAPA – SPI, 1994. 166p.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas Brasil Frutas**. 4ª ed. São Paulo: Empresa das Artes, 2005. 321p.

SOCACIU, C. (Ed.). **Food Colorants: Chemical and Functional Properties**. Boca Raton: CRC, 2007. 633p.

STATSOFT, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

TAOUKIS, P.S.; LABUZA, T.P.; SAGUY, I.S.; **Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction**. In: VALENTAS, K.J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R.P. The handbook of food engineering practice. Boca raton: CRC Press LLC, p.361-402, 1997.

THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Food additives**: List of Designated Additives, June 4, 2009. Disponível em:

<<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-desin.add-x>>. Acesso em: 13 fev. 2010.

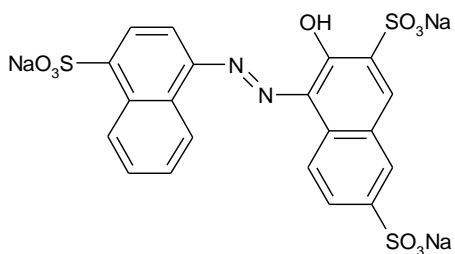
TOUYAMA, R.; TAKEDA, Y. INOUE, K.; KAWAMURA, I.; YATSUZUKA, M.; IKUMOTO, T.; SHINGU, T.; YOKOI, T.; INOUE, H. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structure of brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo. v. 42, n. 3, p. 668 – 673, 1994.

UNCTAD, United Nations Conference on Trade and Development. **Market Brief in the European Union for Selected Natural Ingredients Derived from Native Species: Genipa Americana**. BioTrade Initiative/BioTrade Facilitation Programme (BTFP), Governos da Holanda e Suíça, 2005. 38p.

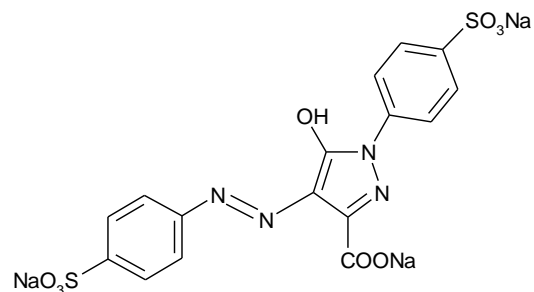
WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, London. v. 8, n. 4, p. 170-177, Oct-Dec, 1986.

## APÊNDICE A – Estrutura química de compostos corantes sintéticos

### AZO

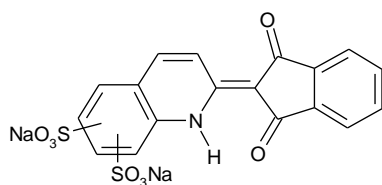


Amaranto



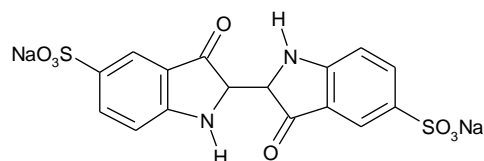
Tartrazina

### QUINOLINA



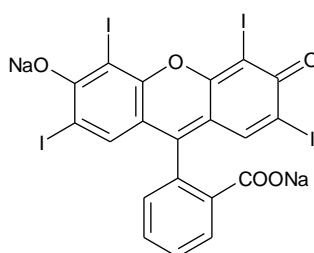
Amarelo-quinolina

### INDIGÓIDE



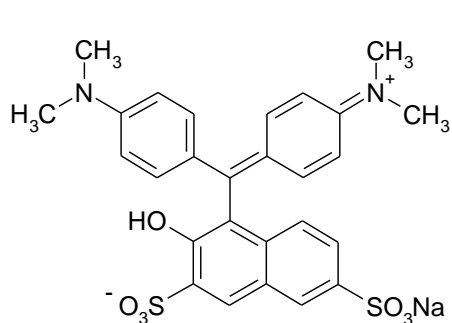
Indigotina

### XANTENO

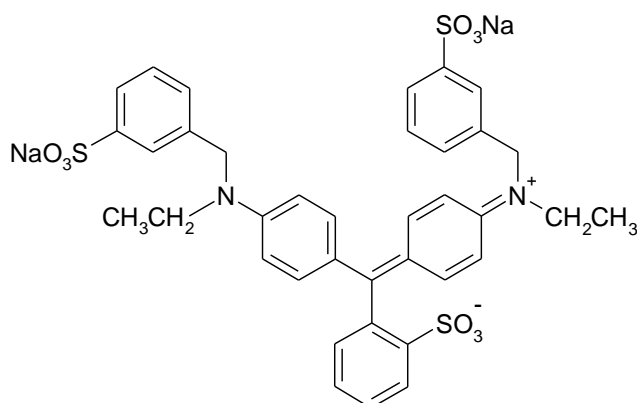


Eritrosina

### TRIARILMETANO



Verde S

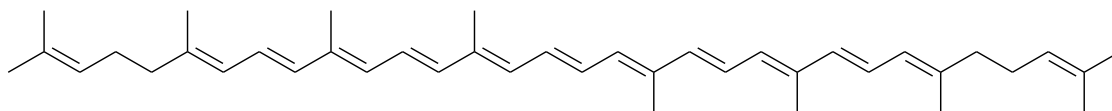


Azul Brilhante FCF

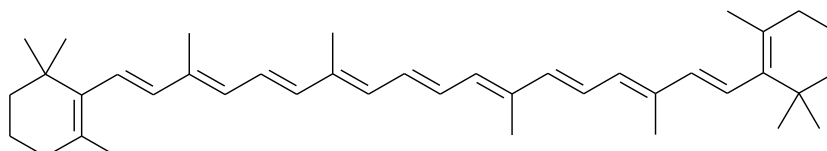
Fonte: Adaptado de NOLLET (2000).

## APÊNDICE B – Estruturas dos principais pigmentos naturais

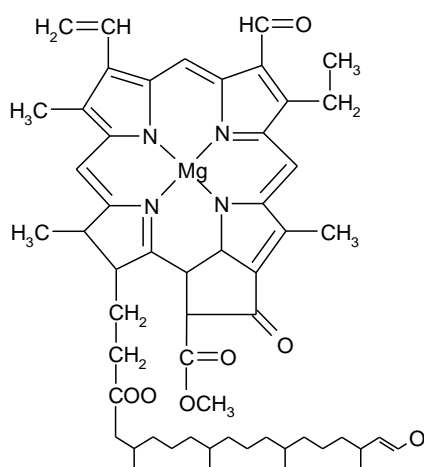
### CAROTENOS



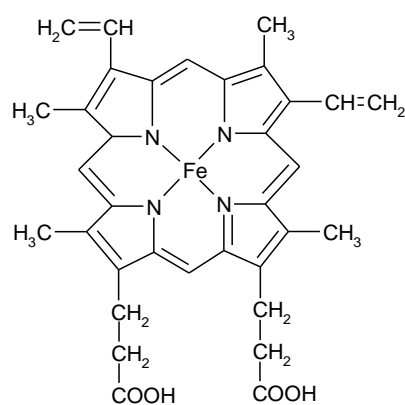
Lycopeno

 $\beta$ -caroteno

### TETRAPIRRÓLICOS

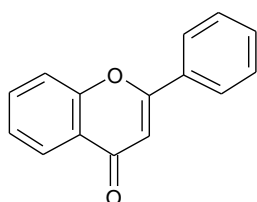


Clorofila b

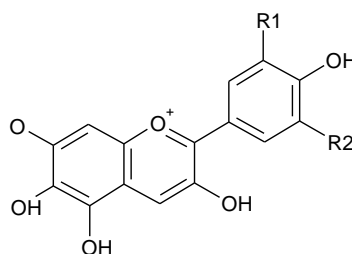


Hemoglobina

### FLAVONÓIDES

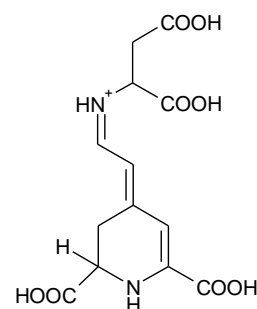


Flavona



Antocianina

### BETALAÍNA



Betaxantina

Fonte: Adaptado de DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ (2002).