



EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE CENOURA PRETA ASSISTIDA POR CAMPO ELÉTRICO PULSADO

Stephanie L. Wink^{1*}; Luciano F. F. Rosa², Bethania Brochier¹

¹ Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS, Unidade Acadêmica de Graduação, Curso de Engenharia Química. Av. Unisinos, 950, São Leopoldo - RS, Brasil.,

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química. Rua Ramiro Barcelos, 2.777, Porto Alegre – RS, Brasil.

Palavras-Chave: corantes naturais; tecnologia não térmica; eletroporação.

Introdução

Os corantes alimentares naturais compreendem uma classe de aditivos amplamente aplicados na indústria moderna, cuja funcionalidade essencial está associada à agregação, restauração ou realce de propriedades cromáticas em matrizes complexas de alimentos e bebidas, impactando diretamente na aceitação sensorial do consumidor final. Atualmente, o mercado de corantes naturais experimenta um crescimento exponencial impulsionado pela consolidação da tendência global *clean label*, projetando-se uma taxa de crescimento anual composta de 8,47% entre 2024 e 2029, com estimativa de atingir a marca de USD 3,11 bilhões em 2029. No entanto, a substituição de aditivos sintéticos por alternativas naturais impõe gargalos tecnológicos severos: os pigmentos naturais possuem maior custo de processamento, menor poder tintorial e expressiva instabilidade química e física quando expostos à luz, oxigênio, agentes redutores e oscilações térmicas ou de pH. A cenoura preta (*Daucus carota* subsp. *sativus* var. *atrorubens*) desponta como uma matriz vegetal de alto valor estratégico para o isolamento desses aditivos devido ao seu conteúdo abundante de pigmentos antociânicos. Contudo, os métodos tradicionais de extração industrial dependem de altas temperaturas e longos períodos de processamento, o que induz a degradação e quebra térmica dessas moléculas termossensíveis. Frente a isso, conforme discutido por Bocker e Silva (2022), o processamento por Campo Elétrico Pulsado (PEF) destaca-se como uma tecnologia não térmica inovadora que aplica pulsos de alta tensão (5 kV/cm) por curtos intervalos de tempo (1 – 200 μ s). Esse campo elétrico gera o fenômeno de eletroporação através da formação de poros hidrofílicos reversíveis ou irreversíveis na membrana citoplasmática vegetal, incrementando a permeabilidade celular e intensificando os coeficientes de difusão de transferência de massa para o meio extrator em baixas temperaturas. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo quantificar a eficiência extrativa e avaliar a estabilidade físico-química imediata e ao longo do armazenamento refrigerado de antocianinas obtidas de cenoura preta assistidas por PEF em meio ácido, comparando este processo emergente com o método convencional por hidrólise enzimática.



Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos nas instalações da empresa *Elea GmbH Technology*, em Osnabrück, Alemanha. Amostras de cenoura preta comerciais de mesmo lote foram armazenadas a 10°C por, no máximo, uma semana antes de serem processadas. O preparo das amostras iniciou-se com o corte manual em fatias homogêneas de, aproximadamente, 1 cm com uso de faca, seguido pela pesagem de bateladas de 200 g de polpa e adição de 200 mL de uma solução aquosa de ácido cítrico (12 g/L) em um *mixer* comercial (*CHP61, Kenwood*). A cominuição ocorreu via aplicação rigorosa de 10 pulsos de trituração até a obtenção de fragmentos teciduais com granulometria média controlada entre 2 e 4 mm. O volume de polpa foi reunido em béqueres (aproximadamente 800 g) e submetido ao branqueamento térmico preventivo em banho-maria industrial (90° C), mantendo o interior da polpa a 80° C, por exatamente 4 minutos, para inativar por completo os complexos enzimáticos endógenos da peroxidase e da polifenoloxidase conforme descrito por Astráin-Redín *et al.* (2023). Imediatamente após, a polpa foi resfriada em banho de água e gelo (proporção mássica 60:40) por 2 minutos até que a temperatura interna estabilizasse entre 50 e 55 °C, tornando a amostra apta para os tratamentos de extração em triplicata.

O delineamento experimental de extração de antocianinas da cenoura preta contemplou:

- 1) Tratamento PEF: executado em sistema piloto (*Elea GmbH*) conforme descrito por Bocker e Silva (2022) e Pataro *et al.* (2017), com duas energias específicas distintas baseadas no número de pulsos (n) e volume da câmara (m): Condição A (energia de 5 kJ/L, intensidade de campo elétrico de 1,7 kV/cm, pulso de 17 kV, tensão de 4 kJ) e Condição B (energia de 10 kJ/L, intensidade de campo elétrico de 3 kV/cm e, pulso de 30 kV, tensão de 8 kJ), acompanhadas de uma amostra controle PEF (sem aplicação de campo). Os eletrodos do reator eram constituídos de aço inoxidável revestidos por paredes de polietileno de alta densidade PE500.
- 2) Tratamento enzimático: adição precisa de 96 µL de enzima comercial pectinolítica (*Pectinex Ultra Color*) via micropipeta diretamente na polpa aquosa, seguido por incubação em banho-maria a 55 °C por 1 hora, sob homogeneização mecânica intermitente a cada 10 minutos. O grupo controle enzimático correu paralelamente sem a adição da enzima.

A separação de fases sólido-líquido foi executada em prensa tipo *ParaPress* com a polpa acondicionada em sacos de nylon (28 × 28 cm, abertura de malha de 180 µm) por 2 minutos. O suco extraído e a fração sólida foram imediatamente amostrados. O teor de umidade foi quantificado em analisador halogênio automatizado a 105 °C até massa constante (critério de parada < 0,05% de perda por 30 segundos). O teor de sólidos solúveis totais foi quantificado em refratômetro digital de bancada (*HI 96801, Hanna Instruments*) e expresso em °Brix. A concentração de antocianinas monoméricas totais foi estimada via



espectrofotometria UV-Vis (*Biochrom GeneQuant 1300*) pelo método do pH diferencial (Lee, Durst e Wrolstad, 2005), utilizando diluições em tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e tampão acetato de sódio (pH 4,5), monitorando-se as absorbâncias em 520 e 700 nm, com os cálculos fundamentados na absorvidade molar da cianidina-3-glucosídeo ($\epsilon = 26.900 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ e $MM = 449,2 \text{ g/mol}$). O índice de escurecimento (*brown index*) foi calculado através da razão entre a absorbância de compostos polimerizados (420 nm) e pigmentos nativos (525 nm), corrigidos em 700 nm em meio tampão pH 3,0. O rendimento percentual do processo extraído foi determinado por gravimetria em balança analítica relacionando a massa de suco e a polpa inicial. O estudo de estabilidade cinética sob refrigeração a 10°C coletou dados nos dias 0, 83 e 124 de armazenamento. Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($\alpha = 0,05$) com o suporte do software *IBM SPSS Statistics* v. 30.

Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta os resultados físico-químicos analisados após os diferentes tratamentos de extração de antocianinas. É possível verificar que o teor de umidade residual da fração sólida permaneceu estatisticamente homogêneo entre todos os tratamentos avaliados ($p > 0,05$), situando-se em faixas estreitas de 85,7 a 86,7%, evidenciando que a eficiência de desidratação mecânica por prensagem independe da aplicação prévia de forças eletroporativas ou hidrolíticas nas condições operadas.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos obtidos após extração do suco de cenoura preta.

Tratamento aplicado	Teor de umidade (%)	Sólidos solúveis totais (°Brix)	Teor de antocianinas monoméricas totais (mg/L)
PEF controle	$85,7 \pm 0,7^a$	$5,50 \pm 0,33^a$	318 ± 33^a
PEF (5 kJ/L – 1,7 kV/cm)	$86,1 \pm 0,5^a$	$5,60 \pm 0,26^a$	313 ± 42^a
PEF (10 kJ/L – 3 kV/cm)	$85,8 \pm 0,6^a$	$5,70 \pm 0,71^a$	291 ± 73^a
Enzimático controle 1h	$86,7 \pm 0,4^a$	$5,50 \pm 0,36^a$	279 ± 36^a
Enzimático 1h	$86,5 \pm 0,5^a$	$6,00 \pm 0,08^a$	291 ± 21^a

^a Letras idênticas sobrescritas em uma mesma coluna indicam a ausência de diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).



Para o teor de sólidos solúveis totais, a análise de variância revelou que não houve diferença estatística rigorosa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). No entanto, os dados brutos apontam para uma clara tendência de elevação de sólidos solúveis no suco derivado do tratamento enzimático 1h ($6,00 \pm 0,08$ °Brix) em relação ao seu controle ($5,50 \pm 0,36$ °Brix). Esse incremento marginal é termodinamicamente justificado pela clivagem química exercida pelas pectinases sobre os polímeros estruturais da parede celular (pectinas estruturais), induzindo a solubilização de açúcares redutores de menor peso molecular no meio aquoso extraído. Os ensaios assistidos por PEF de 5 kJ/L ($5,60 \pm 0,26$ °Brix) e 10 kJ/L ($5,70 \pm 0,71$ °Brix) mantiveram-se estáveis, sugerindo que o campo elétrico pulsado atua predominantemente em mecanismos físicos de permeabilização transmembrana por eletroporação, sem acarretar a hidrólise química ou degradação direta de polissacarídeos complexos da matriz vegetal, tal comportamento vem de encontro aos discutidos por Bocker e Silva (2022).

A determinação quantitativa de antocianinas monoméricas totais evidenciou que os valores oscilaram em uma faixa compreendida entre 279 e 318 mg/L. A aplicação do campo elétrico pulsado na condição mais branda de energia específica (5 kJ/L e 1,7 kV/cm) resultou em teores numéricos de extração ligeiramente superiores (313 ± 42 mg/L) frente à digestão biológica exercida pelo tratamento enzimático de 1h (291 ± 21 mg/L). Contudo, a aplicação de ANOVA indicou a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os cinco tratamentos estudados ($p > 0,05$). Esse comportamento demonstra que as técnicas não térmicas emergentes alcançam patamares de eficiência de extração de solutos equivalentes às metodologias tradicionais de digestão molecular, porém com vantagens processuais associadas à redução drástica do tempo operacional (segundos *versus* horas) e eliminação do uso de enzimas comerciais de alto custo. Na condição mais severa de PEF (10 kJ/L e 3 kV/cm), novamente não houve diferença estatística significativa quanto aos demais tratamentos ($p > 0,05$). Entretanto, notou-se a tendência de um decréscimo numérico no teor recuperado (291 ± 73 mg/L) conforme o estudo de Pataro et al. (2017), indicando que densidades excessivas de energia podem induzir fenômenos colaterais locais de degradação radicalar dos cátions flavílicos das antocianinas.

O monitoramento cinético da estabilidade das antocianinas ao longo do armazenamento a 10°C mostrou decréscimos progressivos em todos os extratos líquidos (degradações de 10 a 15% aos 83 dias e flutuações de 7 a 27% ao término de 124 dias). Todavia, as trajetórias cinéticas não exibiram variabilidade estatisticamente distintas entre si ($p > 0,05$), devido aos desvios padrão elevados obtidos no método diferencial (de até 17%). Na literatura científica, como reportado por Puértolas *et al.* (2013) para tubérculos roxos, tratamentos por PEF conduzidos em baixas temperaturas (10 - 40° C) preservam a integridade estrutural e a estabilidade de estocagem de antocianinas hidrossolúveis por mitigar estresses hidrotérmicos agressivos. O índice de escurecimento (*brown index*) corroborou esse perfil de



preservação: não foram computadas variações significativas entre as amostras, porém as frações submetidas ao PEF a 5 kJ/L e 10 kJ/L manifestaram patamares médios reduzidos de 0,34 e 0,345, respectivamente, indicando uma forte tendência física de menor formação de polímeros marrons indesejáveis através da inativação eletroporativa de oxidases endógenas latentes. Embora seja para cenoura tradicional, Astráin-Redín *et al.* (2023) demonstraram que a aplicação de PEF associada ao branqueamento reduziu o tempo de processamento em até 60% e preservou a textura e a bioacessibilidade do β -caroteno. A rápida inativação da peroxidase contribuiu para minimizar reações de escurecimento durante o processamento, indicando que parâmetros adequados de PEF podem controlar o desenvolvimento da cor indesejada. Além disso, Quintão-Teixeira *et al.* (2013) mostraram que o PEF pode inativar até cerca de 93% da atividade da peroxidase em suco de cenoura quando aplicado em condições adequadas. Como a peroxidase e a polifenoloxidase são enzimas diretamente envolvidas no escurecimento enzimático, sua inativação contribui para a manutenção da qualidade visual do produto.

Por fim, no balanço macromassico do processo, o rendimento percentual médio de suco demonstrou sensibilidade frente à eletroporação: a condição PEF de 5 kJ/L e 1,7 kV/cm gerou uma tendência de maior liberação volumétrica de líquido, registrando rendimento de 71,1%. Esse aumento cinético encontra paralelo direto com achados de Pataro *et al.* (2017), que descreveram acréscimos expressivos no rendimento de prensagem mecânica de mirtilos tratados por PEF devido ao colapso mecânico controlado e permanente das estruturas de retenção celular, facilitando o escoamento hidrodinâmico das frações líquidas vacuolares ricas em pigmentos bioativos. De forma geral, os ensaios demonstraram que as diferentes formas de quebra do tecido vegetal não promoveram modificações significantes nas propriedades macro-microscópicas de retenção hídrica do bagaço.

Conclusões

O emprego da tecnologia emergente de Campo Elétrico Pulsado (PEF) consolidou-se como uma rota metodológica não térmica viável, sustentável e promissora para intensificar a transferência de massa na extração de antocianinas a partir de tecidos de cenoura preta. Embora o delineamento estatístico final não tenha revelado diferenças estatisticamente significativas em termos de rendimento de pigmento e estabilidade temporal prolongada em relação à hidrólise enzimática tradicional, o tratamento por PEF operando em baixas demandas energéticas (5 kJ/L) obteve êxito em mimetizar a mesma eficiência global em uma janela temporal reduzida a segundos e sem custos com insumos biológicos secundários. Os resultados reforçam o potencial do PEF estabelecidas por Bocker e Silva (2022), para integração sustentável na indústria de corantes naturais e engenharia de alimentos, recomendando-se investigações adicionais com foco na otimização multivariável de novos parâmetros de frequência e geometria de pulso elétrico.



Referências

ASTRAÍN-REDÍN, L.; RASO, J.; ÁLVAREZ, I.; KIRKHUS, B.; MEISLAND, A.; BERGE, G. I. A.; CEBRIÁN, G. New pulsed electric fields approach to improve the blanching of carrots. **LWT**, 189, 115468, 2023.

BOCKER, R.; SILVA, E. K. Pulsed electric field assisted extraction of natural food pigments and colorings from plant matrices. **Food Chemistry: X**, 15, 10039, 8, 2022.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, 88(5), 1269-1278, 2005.

PATARO, G. et al. Improving the Extraction of Juice and Anthocyanins from Blueberry Fruits and Their By-products by Application of Pulsed Electric Fields. **Food and Bioprocess Technology**, 10, 1595-1605, 2017.

PUÉRTOLAS, E. et al. Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. **Food Chemistry**, 136(3-4), 1330-1336, 2013.

QUINTÃO-TEIXEIRA, L.J.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MOTA RAMOS, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Kinetics of peroxidase inactivation in carrot juice treated with pulsed electric fields. **J Food Sci.** 78(2), E222-8, 2013.