

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH E DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA COR DE EXTRATO AQUOSO AZULADO OBTIDO A PARTIR DE BIOMASSA DE *Fusarium oxysporum*

Palavras-Chave: Pigmento natural azul, estabilidade, *Fusarium oxysporum*

Autores(as):

BEATRIZ FREITAS MACEDO, FEA – UNICAMP

CAROLINE KIE ISHIMOTO (doutoranda), FEA – UNICAMP

Prof. Dr. JULIANO LEMOS BICAS (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As principais fontes de pigmentos naturais têm origem vegetal, animal ou mineral, porém, os pigmentos produzidos por microrganismos como fungos e bactérias, apresentam diversas aplicações e vantagens em relação aos pigmentos vegetais, como facilidade de escalabilidade, custo de produção potencialmente mais baixo e crescimento independente das condições climáticas (Manikprabhu e Lingappa, 2013). Ainda, há a possibilidade do uso de engenharia genética, melhoramento do meio de cultivo e das condições de fermentação para aumentar a produção do pigmento natural (Sen; Barrow; Deshmukh, 2019).

Atualmente, nota-se uma transição do uso de corantes sintéticos para os de origem natural. Os possíveis efeitos adversos provocados por corantes sintéticos, como hiperatividade em crianças, alergenicidade e carcinogenicidade, e o crescente interesse em rotular alimentos como naturais, têm contribuído para o aumento do uso de corantes naturais em detrimento aos sintéticos (Sen; Barrow; Deshmukh, 2019). Com isso, torna-se evidente a necessidade da indústria de alimentos em buscar alternativas para atender às novas demandas do mercado e às restrições regulatórias (Sigurdson; Tang; Giusti, 2017).

Os principais pigmentos naturais são as antocianinas, carotenoides, betalaínas e clorofilas, que apresentam cores variando de vermelho ao azul (passando pelo púrpura), amarelo ao vermelho (passando pelo laranja), vermelho e verde, respectivamente. Em contrapartida, poucos corantes naturais estão disponíveis comercialmente para a obtenção de tons azuis (Dos Santos; Bicas, 2021). Atualmente, a cor azul pode ser obtida a partir de extratos da alga Spirulina, por precursores encontrados na planta Gardênia, e por meio da complexação das antocianinas com co-pigmentos (Galaffu; Bortlik; Michel, 2015). A maioria desses pigmentos apresenta sensibilidade ao calor, luz e oxigênio, resultando em perda

ou alteração da cor, podendo também ser sensíveis à fatores como o pH, presença de proteínas, íons metálicos ou compostos orgânicos (Sigurdson; Tang; Giusti, 2017).

Neste contexto de procura por alternativas naturais de tons azuis, tem-se o pigmento azulado obtido a partir de biomassa rica em bicaverina. A bicaverina é um policetídeo produzido por diversas espécies de fungos, a maioria do gênero *Fusarium*, principalmente *Fusarium fujikuroi*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. oxysporum* (Chelkowski; Zajkowski; Visconti, 1992). A biomassa contendo bicaverina originalmente apresenta coloração vermelha e torna-se azul após tratamento térmico, o que levanta a possibilidade de seu estudo como opção de cor azul natural (Dos Santos; Bicas, 2021). Tendo em vista a instabilidade que certos pigmentos microbianos podem apresentar à variações de condições de pH e temperatura, este é um aspecto de importante investigação para a aplicação posterior de tais pigmentos (Rodriguez-Amaya, 2016). Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar a estabilidade do extrato aquoso obtido a partir da biomassa de *Fusarium oxysporum* frente à diferentes condições de pH ao submetê-lo ao aquecimento.

METODOLOGIA:

Produção de biomassa azul de *F. oxysporum* CCT7620

A biomassa azul foi produzida a partir da fermentação submersa com *F. oxysporum* CCT7620, seguindo a metodologia de Mendonça *et al.* (2021) com algumas modificações. O inóculo foi obtido por meio da transferência de um pedaço de 1,5 cm² de uma cultura de *F. oxysporum* CCT7620 para cada 200 mL de meio líquido de arroz (preparado na proporção de 20 g de arroz moído/L de água). A cultura utilizada como inóculo foi previamente crescida a 30°C por 72 h em placa de Petri contendo meio ágar-arroz (50 g/L de arroz moído, 20 g/L de ágar). O meio inoculado foi homogeneizado com Ultra-Turrax a 7000 rpm por 30 s e incubado a 28°C/200 rpm por 240 h. A biomassa úmida vermelha resultante da fermentação após 240 h foi autoclavada a 121°C por 20 min para obtenção da biomassa úmida azul.

Extração do pigmento azul

A biomassa úmida azul foi centrifugada a 3600 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e a biomassa azul separada foi ressuspensa em água deionizada, mantendo-se o volume inicial. A biomassa ressuspensa foi colocada sob agitação a 200 rpm/10°C por 10 min. Centrifugou-se novamente a 3600 rpm por 10 min e a biomassa precipitada foi descartada, enquanto o sobrenadante foi colocado em banho-maria a 100°C por 20 min. Após o banho-maria, o sobrenadante foi resfriado sob agitação a 200 rpm/10°C por 20 min e centrifugado novamente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi armazenado para utilização como extrato azulado.

Avaliação variação de cor do extrato azulado em diferentes pHs e temperaturas

O extrato azulado foi diluído em tampão acetato de sódio 10 mM e fosfato de potássio 10 mM em diferentes pHs, conforme apresentado na Tabela 1. As amostras foram mantidas em banho-maria a 70°C por 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 min. Os testes foram realizados em triplicata e as amostras

| Tabela 1 – pH das soluções tampão testadas | | | | | | | |
|--------------------------------------------|---------------------------|---|---|---|------------------------|-----|-----|
| Tampão | Fosfato de potássio 10 mM | | | | Acetato de sódio 10 mM | | |
| pH | 2 | 3 | 6 | 7 | 3,5 | 4,5 | 5,5 |

foram agitadas para medição do pH e da absorbância (varredura de 190 nm a 800 nm) após o banho-maria. A mudança de cor foi analisada em espectrocolorímetro no sistema de cor CIELAB, após agitação das amostras, obtendo-se os parâmetros de cor L^* (luminosidade, sendo + mais claro e - mais escuro), a^* (sendo +a vermelho e -a verde) e b^* (sendo +b amarelo e -b azul), a partir dos quais calculou-se ΔE , a diferença de cor entre as amostras (Equação 1).

$$\Delta E = (L_n * - L_0 *)^2 + (a_n * - a_0 *)^2 + (b_n * - b_0 *)^2 \quad \text{Equação 1}$$

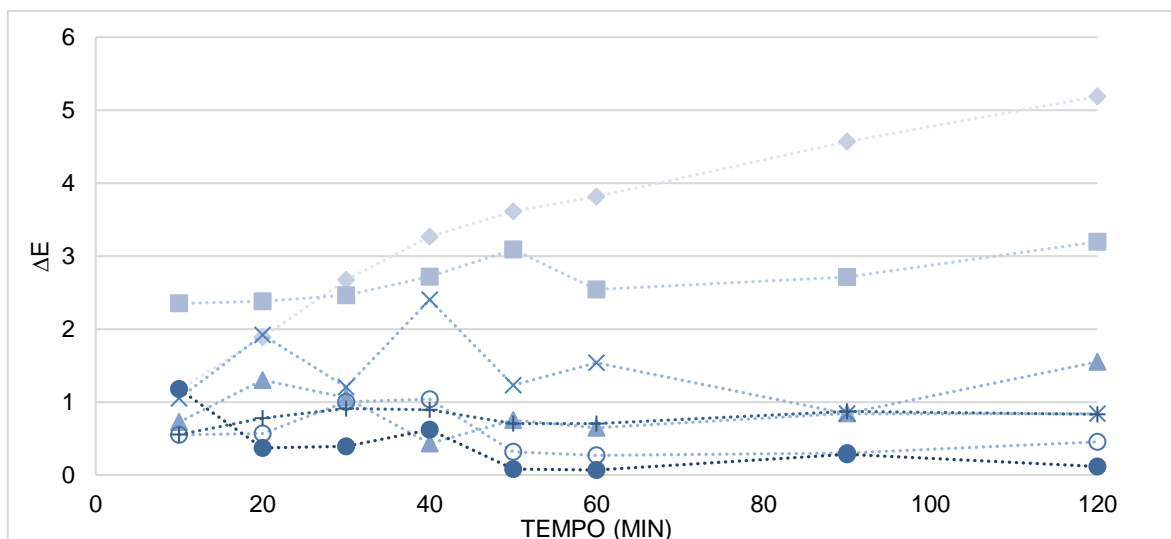
Em que $L_0 *$, $a_0 *$ e $b_0 *$ são os parâmetros da amostra sem tratamento térmico e $L_n *$, $a_n *$ e $b_n *$ são os parâmetros da amostra após o tempo de aquecimento pré-determinado para cada ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Por meio de testes prévios realizados, em que o extrato azulado preparado com diferentes soluções tampão pH 5 (citrato de sódio 10 mM, fosfato de sódio 10 mM, fosfato de potássio 10 mM e acetato de sódio 10 mM) foi submetido às temperaturas de 100°C, 90°C, 80°C e 70°C, decidiu-se por seguir os testes apenas com a temperatura de 70°C, visto que nas demais era observada precipitação nos primeiros minutos de aquecimento ou antes de este ser iniciado.

O valor de ΔE , calculado a partir dos parâmetros L^* , a^* e b^* , foi utilizado para avaliar a diferença de cor entre as amostras em diferentes tempos de aquecimento a 70°C quando comparadas às amostras iniciais, sem aquecimento. Os valores de ΔE obtidos estão dispostos na Figura 1.

Figura 1 – Variação de ΔE de acordo com o tempo de aquecimento para todas as amostras.



Legenda: As formas no gráfico representam as amostras tratadas com: ♦ tampão fosfato de potássio pH 2; ■ tampão fosfato de potássio pH 3; ▲ tampão acetato de sódio pH 3,5; × tampão acetato de sódio pH 4,5; ○ tampão acetato de sódio pH 5,5; ● tampão fosfato de potássio pH 6; + tampão fosfato de potássio pH 7.

O extrato azulado apresentou uma tendência de maior alteração de cor em valores mais baixos de pH. Conforme pode ser notado na Figura 1, em pH 3,5, 4,5, 5,5, 6 e 7, as amostras não apresentaram diferença perceptível ao olho humano ($\Delta E < 2$) em relação à amostra sem tratamento térmico (tempo 0),

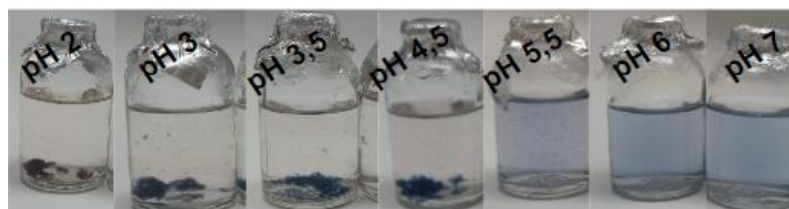
com exceção de uma das amostras em pH 4,5 ($\Delta E = 2,4$). Em pH 3 todas as amostras apresentaram diferença perceptível em relação à amostra sem tratamento térmico, e em pH 2, essa diferença aumentou pronunciadamente conforme o tempo de aquecimento.

Nos valores mais baixos de pH, foi percebido um aumento no valor do parâmetro a^* , indicando aumento da cor vermelha (+a), acompanhado por um aumento do valor do parâmetro b^* , indicando diminuição da cor azul (-b). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos em testes realizados anteriormente, em que já havia sido constatada a mudança da cor do extrato de azul para vermelho em pH baixo. Ainda, nota-se que houve um aumento da luminosidade conforme diminuição do pH. A Tabela 2 apresenta os parâmetros obtidos em cada pH para as amostras no tempo máximo de

| Amostra | L^* | a^* | b^* |
|------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Sem tratamento térmico | 41,31 ± 0,05 | 0,77 ± 0,03 | -5,91 ± 0,04 |
| pH 2 | 47,16 ± 0,09 | 2,01 ± 0,09 | -2,19 ± 0,08 |
| pH 3 | 46,56 ± 0,08 | 1,1 ± 0,1 | -4,9 ± 0,4 |
| pH 3,5 | 43,4 ± 0,4 | 0,9 ± 0,2 | -5,0 ± 0,2 |
| pH 4,5 | 43,5 ± 0,1 | 0,68 ± 0,05 | -6,38 ± 0,04 |
| pH 5,5 | 40,5 ± 0,2 | 0,78 ± 0,05 | -5,88 ± 0,05 |
| pH 6 | 41,2 ± 0,4 | 0,78 ± 0,05 | -6,0 ± 0,3 |
| pH 7 | 40,9 ± 0,1 | 0,81 ± 0,09 | -6,09 ± 0,08 |

aquecimento e a Figura 2 apresenta a aparência das amostras após 120 min de aquecimento a 70°C, a partir da qual nota-se que os resultados da análise de cor foram condizentes com o que foi observado visualmente, sendo perceptível uma coloração mais avermelhada/arroxeadada nos pHs mais baixos. Ainda, o abaixamento de pH levou à precipitação, mantendo-se estável em relação à solubilidade apenas em pH 6 e 7.

Figura 2 – Amostras do extrato azulado após 120 min de aquecimento (70°C) em diferentes pHs.



A Figura 3, que contém a amostra de pH 2 sem aquecimento (Figura 3a) e após aquecimento a 70°C por 120 min sem agitação (Figura 3b) e com agitação (Figura 3c), ilustra a alteração de cor do extrato e a precipitação ocorrida em baixo pH.

A alteração visual sofrida pelo extrato com a mudança de pH percebida na coloração também se refletiu nos resultados de absorvância obtidos. Com a Figura 4, é possível observar que, ao longo do tempo de aquecimento, a absorvância a 490 nm (região de máxima absorção de soluções avermelhadas) apresentou a tendência de aumentar com a diminuição de pH (Figura 4a), enquanto a absorvância a 610 nm (região de absorção de soluções azuladas) apresentou a tendência de diminuir em valores mais extremos de pH (Figura 4b). Esta observação está condizente com deslocamento da cor azul para vermelho com a diminuição do pH.

Figura 3 – Amostras do extrato azulado pH 2 A) sem aquecimento, B) após 120 min de aquecimento a 70°C sem agitação e C) com agitação.

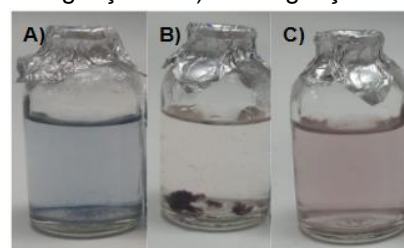
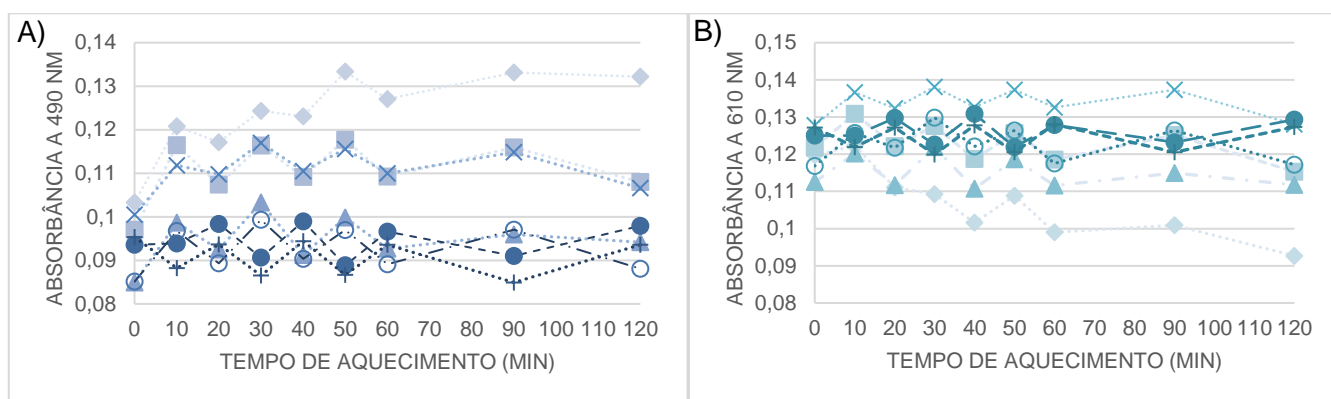


Figura 4 – Variação da absorbância a A) 490 nm e a B) 610 nm em função do tempo das amostras sob aquecimento (70°C)



Legenda: As formas no gráfico representam as amostras tratadas com: ◆ tampão fosfato de potássio pH 2; ■ tampão fosfato de potássio pH 3; ▲ tampão acetato de sódio pH 3,5; × tampão acetato de sódio pH 4,5; ○ tampão acetato de sódio pH 5,5; ● tampão fosfato de potássio pH 6; + tampão fosfato de potássio pH 7.

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos permitiram caracterizar o comportamento do extrato azulado em diferentes pHs após tratamento térmico a 70°C/120 min. Nestas condições, em pH 6 e 7, o extrato azulado se mantém estável em relação à cor e à solubilidade. Entre pH 3,5 a 6, a cor se manteve estável, porém foi observada precipitação no extrato. Em pH abaixo de 3,5, o extrato azulado se mostrou instável tanto em relação à cor quanto à solubilidade.

BIBLIOGRAFIA

- CHELKOWSKI, J.; ZAJKOWSKI, P.; VISCONTI, A. **Bikaverin production by *Fusarium species***. *Mycotoxin Research*, v. 8, p. 73-76, 1992.
- DOS SANTOS, M. C.; BICAS, J. L. **Natural blue pigments and bikaverin**. *Microbiological Research*, v. 244, p. 126653, 2021.
- GALAFFU, N.; BORTLIK, K.; MICHEL, M. **An industry perspective on natural food colour stability**. *Colour additives for foods and beverages*. Woodhead Publishing, 2015. p. 91-130.
- MANIKPRABHU, D.; LINGAPPA, K. **Actinorhodin a natural and attorney source for synthetic dye to detect acid production of fungi**. *Saudi J Biol Sci*. v. 20(2): 163–168. 2013.
- MENDONÇA, M.; DOS SANTOS, M. C.; PEREIRA, A. K.; FILL, T. P.; FORTE, M. B. S.; BICAS, J. L. **Recovery and purification of bikaverin produced by *Fusarium oxysporum* CCT7620**. *Food Chemistry: X*, 12, 100136. 2021.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Natural food pigments and colorants**. *Current Opinion in Food Science*, v. 7, p. 20-26, 2016.
- SEN, T.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. **Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward**. *Frontiers in nutrition*, v. 6, p. 7, 2019.
- SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. **Natural colorants: Food colorants from natural sources**. *Annual review of food science and technology*, v. 8, n. 1, p. 261-280, 2017.