

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DO ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELLI NUNES CLÍMACO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA BETERRABA
POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E MÉTODO DE
*BOOTSTRAP***

Maringá
2019

GABRIELLI NUNES CLÍMACO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA BETERRABA
POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E MÉTODO DE
*BOOTSTRAP***

Trabalho de defesa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Estadual de Maringá.

Área de concentração: Engenharia de processos e produtos na indústria de alimentos

Orientador: Prof^o Dr^o Diogo Rossoni

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Rita Bergamasco

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

C639o Clímaco, Gabrielli Nunes
Otimização da extração de compostos bioativos da beterraba por metodologia de superfície de resposta e método de *Bootstrap* / Gabrielli Nunes Clímaco. -- Maringá, PR, 2019.
41 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rossoni.
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Rita Bergamasco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

1. Engenharia de alimentos. 2. Compostos bioativos. I. Rossoni, Diogo, orient. II. Bergamasco, Rita, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

CDD 23.ed. 664

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por se fazer presente em minha vida, transformando os momentos mais difíceis em experiências que me fizeram crescer, amadurecer e que conseqüentemente me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus pais e meu irmão, por serem meu “porto seguro”, por todo amor, apoio e incentivo, pois foram esses fatores que me deram a oportunidade de chegar até este momento, de superar as dificuldades e seguir firme.

Agradeço também os meus amigos de Maringá, que foram minha família aqui, pois me acolheram e estiveram ao meu lado em todos os momentos, me dando forças pra continuar, e suprimdo a saudade de casa. Aos amigos de Imperatriz e às Amigas da Vida, que mesmo distantes, se fazem tão presente, me incentivando cada vez mais a seguir meus sonhos. À Janaína Mayumi, minha parceira de mestrado, que sempre me ajudou nessa loucura que é a vida na pós-graduação, e juntas conseguimos superar mais esse obstáculo e com certeza, superaremos muitos mais.

Agradeço ao Diogo Rossoni e à Rita de Cássia, por terem me aceito como orientanda e pela dedicação e paciência durante esses dois anos. Sinceramente, eu não poderia ter escolhido “pais científicos” melhores.

Aos meus familiares em geral, por todo carinho e incentivo que me deram ao longo de toda minha vida.

*“E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados insanos por aqueles que
não podiam escutar a música.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Atualmente é possível observar uma demanda do consumidor por produtos mais saudáveis, adicionados de compostos que ajudam a melhorar as funções do corpo, como antioxidantes, antivirais e antimicrobianos, incentivando assim a comunidade científica a se dedicar cada vez mais ao desenvolvimento de formas mais rápidas e eficazes de obtenção. Diante disso, objetivou-se otimizar a extração de compostos bioativos da beterraba (betacianina, betaxantina e ácido betalâmico), utilizando metodologia de superfície de resposta e o método *Bootstrap*. Desenvolveu-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) de segunda ordem (2^2), com 5 repetições no ponto central e 4 pontos axiais, sendo os fatores, tempo e temperatura, e a massa fixada em 0,5g. Para encontrar os intervalos utilizados em cada fator, além da literatura, foi realizado o procedimento de máxima inclinação ascendente. O ponto de ótimo, foi encontrado próximo do ideal estimado, sendo de aproximadamente 28 minutos e 66°C. A partir da análise pelo *Bootstrap*, foi possível construir uma elipse de confiança (95%), onde pode-se observar as quantidades máximas de cada composto, situadas nos intervalos de 20-30 minutos e 60-65°C, 20-30 minutos e 55-65°C, e 20-35 minutos e 60-70°C, para a betacianina, betaxantina e ácido betalâmico respectivamente, comprovando assim a localização do ponto máximo de extração.

Palavras-chave: otimização, compostos bioativos, betalaínas.

ABSTRACT

It is now possible to observe a consumer demand for healthier products, plus compounds that help improve the functions of the body, such as antioxidants, antivirals and antimicrobials, thus encouraging the scientific community to devote itself more and more to the development of faster and more effective forms of procurement. The objective was to optimize the extraction of bioactive compounds from beetroot (betacyanin, betaxanthin and betalamic acid) using response surface methodology and the *Bootstrap* method. A second-order rotational central composite (DCCR) (2^2) was developed, with 5 replicates at the central point and 4 axial points, with the factors time and temperature, and the mass fixed at 0.5g. To find the intervals used in each factor, in addition to the literature, the procedure of maximum slope was performed. The optimum point, was found close to the estimated ideal, being approximately 28 minutes and 66 °C. From the *Bootstrap* analysis, it was possible to construct an ellipse of confidence (95%), where it is possible to observe the maximum amounts of each compound, located in the intervals of 20-30 minutes and 60-65°C, 20-30 minutes and 55 -65°C, and 20-35 minutes and 60-70°C, for betacyanin, betaxanthin and betalamic acid respectively, thus proving the location of the maximum extraction point.

Key words: optimization, bioactive compounds, betalains.



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – PEG/UEM

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Gabrielli Nunes Clímaco perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos em 08 de março de 2019.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Diogo Francisco Rossoni, D.Sc.
Orientador

Prof. Rita de Cássia Bergamasco, D.Sc.
Co-orientador e Membro

Prof. Grasiela Scaramal Madrona, D.Sc.
Membro

Prof. Terezinha Aparecida Guedes, D.Sc.
Membro

SUMÁRIO
CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. OBJETIVO GERAL	9
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	
2.1. Frutas e verduras	10
2.1.1. Beterraba	10
2.1.2. Compostos Bioativos	11
2.1.2.1. Betalaínas	11
2.2. Planejamento experimental	14
2.3. Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	15
2.4. Modelos de primeira ordem	17
2.5. Modelos de segunda ordem	18
2.6. Adequacidade do modelo	20
2.7. <i>Bootstrap</i>	21
REFERÊNCIAS	23

CAPÍTULO 2

Otimização da extração de compostos bioativos da beterraba por metodologia de superfície de resposta e método de *Bootstrap*

1. Introdução	28
2. Materiais e Métodos	29
3. Resultados e Discussão	31
3.1. Ponto de estacionaridade	35
3.2. Gráficos de Superfície de Resposta	36
3.3. Análise pelo método <i>Bootstrap</i>	37
4. Considerações Finais	39
REFERÊNCIAS	40

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Um dos processos bastante utilizados na área de alimentos é a extração, que consiste na remoção e quantificação de compostos a partir de uma matriz alimentícia de interesse. Entretanto, os riscos de segurança, alto consumo de energia, baixa qualidade do produto, risco ambiental e efeitos toxicológicos são fatores encontrados nesse processo, gerando assim a necessidade de um estudo aprofundado sobre formas de como otimizá-lo (CHEN; ZHAO; YU, 2015).

A extração de pigmentos a partir de bases vegetais vem se firmando cada vez mais no mercado, dentro dos setores de suplementos alimentares, nutracêutico, alimentos funcionais e cosmético (SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014). Com base nisso, vários estudos vem sendo realizados com o intuito de otimizar as condições de extração normalmente estudadas, como por exemplo, tempo, temperatura e concentração de solvente, através da metodologia de superfície de resposta (PRAKASH MARAN et al., 2017; SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014; YOLMEH; HABIBI NAJAFI; FARHOOSH, 2014).

Além da metodologia de superfície de resposta, o método *Bootstrap* pode ser também utilizado, uma vez que visa uma reamostragem, a partir dos dados originais, obtendo assim intervalos de confiança (EFRON, 2003), que facilitariam, posteriormente, uma aplicação industrial, como demonstrado nos cálculos de intervalos de confiança para os parâmetros cinéticos de degradação de antocianinas em uva, por exemplo (MISHRA; DOLAN; YANG, 2011).

Como objeto de estudo, foi utilizado a beterraba (*Beta Vulgaris L.*), que é uma leguminosa de raiz, pertencente à família *Chenopodiaceae*, bastante utilizada na produção de sucos, concentrados e pós, além de ser conhecida por apresentar um forte pigmento chamado Betalaína (MEREDDY et al., 2017). Este composto possui boas condições antivirais e antimicrobianas, além de poder ser utilizado como fonte de aminoácidos essenciais (PRAKASH MARAN et al., 2017).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi otimizar a extração dos compostos bioativos da beterraba (betacianina, betaxantina e ácido betalâmico) por meio de metodologia de superfície de resposta e método *Bootstrap*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma extração aquosa dos compostos bioativos da beterraba utilizando um delineamento composto central rotacional de 2 fatores e 5 níveis, incluindo tempo de extração e temperatura como variáveis independentes
- Ajustar um modelo polinomial de segunda ordem aos dados obtidos da extração aquosa
- Aplicar o método *Bootstrap* como forma de otimização da extração.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Frutas e verduras

Nos últimos anos, é notável a mudança dos hábitos alimentares da sociedade, direcionada para o consumo de frutas e vegetais, devido a grande contribuição na ingestão de nutrientes, promovendo assim um impacto expressivo na saúde a longo prazo (MIELGO-AYUSO et al., 2017).

As frutas e vegetais são conhecidos por possuírem nutrientes em grandes quantidades, como os antioxidantes, as vitaminas C e E, flavonóides e carotenóides, oferecendo assim proteção contra problemas cardiovasculares, câncer e até transformações degenerativas devido à idade (DENG et al., 2017).

Nesse contexto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, deve-se ingerir cerca de cinco a oito porções por dia (400 – 600g) de vegetais, para que o risco de deficiência devido à falta de nutrientes e outros problemas relacionados à dieta, seja reduzido (MILLER et al., 2017).

Considerando esses dados, e por ser uma boa fonte de nutrientes, a beterraba vem sendo estudada por vários autores sobre suas funcionalidades e formas de extração de corantes (BAIÃO et al., 2017; CHEN; ZHAO; YU, 2015; MEREDDY et al., 2017; RAVICHANDRAN et al., 2013).

2.1.1 Beterraba

A beterraba (*Beta vulgaris L.*) é um vegetal herbáceo rico em minerais, pertencente à família das *Chenopodiaceae*. É uma raiz tuberosa, originária das regiões temperadas da Europa e Norte da África. Sua raiz pode ser consumida crua, cozida, enlatada, seca ou em pó (FILHO et al., 2011).

Seu consumo representa apenas 2,1% do mercado de hortaliças, uma vez que não há condições ambientais favoráveis para a produção dessa semente no Brasil, necessitando assim de importação, além do risco da entrada de pragas e doenças exóticas via sementes, e a ausência de programas de aprimoramento genético que possibilitem seu melhoramento, acabando por onerar o custo do produto final (NASCIMENTO, 2019).

No ano de 2016, apenas no Paraná foram produzidos 107.3 milhões de toneladas de beterraba, numa área de 3.632 ha, sendo responsável por 3,5% da produção de oleícolas no

estado, tendo como principais núcleos Curitiba (39%), Guarapuava (8%), Ponta Grossa (8%), Apucarana (7%) e Londrina (7%), totalizando 68% do percentual estadual (SALVADOR, 2017). Em nível de Brasil, dados preliminares do IBGE, referentes ao ano de 2017, mostram que foram contabilizadas 24.951 unidades produtoras de beterraba, totalizando 134.810 toneladas (IBGE, 2019).

A beterraba é conhecida pelos seus pigmentos vermelho-arroxeados, denominados betalainas (MEREDDY et al., 2017) presente em grande quantidade, quando comparado com outras fontes naturais (KUMAR; BROOKS, 2018), e por isso, considerada um dos vegetais mais potentes em termos de capacidades antioxidante (ESQUIVEL, 2016). É considerada uma boa fonte de fibra alimentar, carboidratos (Tabela 1), minerais (potássio, sódio, ferro, cobre, magnésio, cálcio, fósforo e zinco), vitaminas (retinol, ácido ascórbico e complexo B), antioxidantes e compostos fenólicos (BAIÃO et al., 2017).

Tabela 1. Composição centesimal da beterraba

Componente	Quantidade (100g)
Umidade	86%
Proteína	1,9g
Lipídios totais	0,1g
Carboidrato	11,1g
Cinzas	0,9g
Valor energético	49kcal

Fonte: (TACO, 2011)

Sua área territorial de plantio é predominante na região Sul, com 11,579 unidades, seguida pela região Sudeste (9,880) e Nordeste (2,605), entretanto, sua maior produção, em toneladas, está contida na região Sudeste (69,015), seguida da região Sul (46,105) e Nordeste (14,686) (IBGE, 2019).

2.1.2 Compostos Bioativos

2.1.2.1 Betalainas

Betalainas são compostos heterocíclicos e pigmentos de nitrogênio hidrossolúveis responsáveis por conferir vários tipos de coloração em flores, vegetais e frutas. Está entre os

quatro pigmentos derivados de vegetais mais importantes utilizados na indústria, para coloração de alimentos (ESQUIVEL, 2016). Encontra-se na parte tuberosa da beterraba, responsável pela coloração vermelho-púrpura, além de possuir função antioxidante e anti-inflamatória (BAIÃO et al., 2017; MARTINS et al., 2017).

As betalaínas dividem-se em duas subclasses: betaxantinas, responsáveis pelas colorações amarelo-alaranjadas, e as betacianinas, responsáveis pelas colorações vermelho-violeta (RAVICHANDRAN et al., 2013). Essa divisão se dá a partir da biossíntese com o ácido betalâmico (Figura 1) (BAIÃO et al., 2017), ou seja, quando há condensação do ácido betalâmico com a ciclo-3,4-di-hidroxifenilalanina (ciclo-DOPA), é formado a betanidina, estrutura básica das betacianinas; e quando o mesmo condensa-se com aminoácidos ou aminas biogênicas, é formada a betaxantina (ESATBEYOGLU et al., 2015).

Herbach; Stintzing; Carle (2006) relataram que a degradação das betacianinas é geralmente acompanhada por mudança marcante na cor resultante da formação de produtos de degradação amarelos, tais como ácido betalâmico (424 nm) e betaxantinas (460-480 nm). Tal degradação pode ser recorrente de diversos processos e condições de armazenamento, como isomerização, desglicosilação, hidrólise, descarboxilação e desidrogenação, afetando também a cor e capacidade de absorção (ESQUIVEL, 2016).

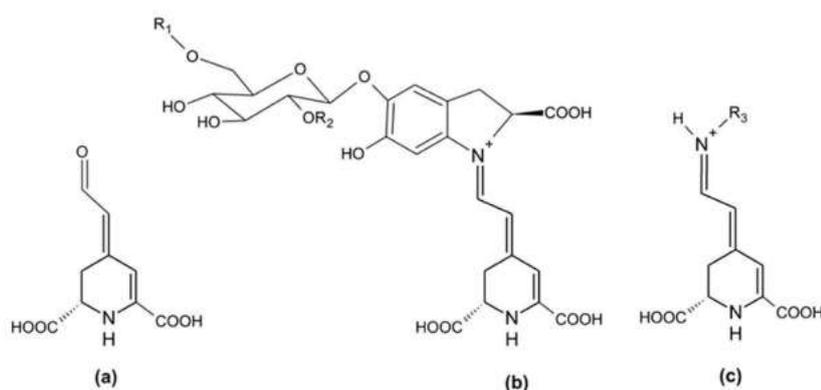


Figura 1. Estrutura geral do ácido betalâmico (a), betacianina (b), betaxantina (c) (BAIÃO et al., 2017).

Atualmente, a beterraba é considerada a principal fonte comercial de betalaína, entretanto a betacianina também pode ser extraída de outras fontes, como a pitaiá, amplamente cultivada na Ásia, Israel e América Latina (GENGATHARAN; DYKES; CHOO, 2016). Além desses, a betacianina também pode ser encontrada em flores (*Portulacaceae*, *Caryophyllales*) e em cogumelos do tipo *Amanita*, *Hygrocybe* *Hygrosporus*. Porém, ainda existem poucos

estudos analisando suas propriedades de cor, quando comparadas às extraídas da beterraba (NEAGU; BARBU, 2014).

Vários fatores podem influenciar a extração das betalaínas da beterraba. Dentre eles estão o pH, atividade de água e exposição à luz, oxigênio, metais, atividades enzimáticas e temperatura, sendo este último fator mais decisivo para sua decomposição, dentro de uma faixa ótima de pH (entre 3 e 7), sendo o 4 e 5 os níveis ótimos (ANTIGO et al., 2017). Seu uso na área alimentícia se dá principalmente por ser livre de toxicidade e alergênicos, quando comparada com corantes artificiais, e como pode atuar numa ampla faixa de pH, torna-se uma alternativa útil às antocianinas, por exemplo, que possuem baixa eficácia em produtos ácidos (ESQUIVEL, 2016).

A extração convencional por solvente é a técnica mais utilizada atualmente, na área de extração de compostos bioativos em escala industrial (BARBA et al., 2016). Entretanto, demanda um longo tempo de extração aliado à altas temperaturas, que podem resultar na degradação do composto, além do uso de grandes quantidades de solvente que, em alguns casos, pode ser nocivo ao ser humano e poluente, necessitando assim de um tratamento antes do descarte (MACHADO et al., 2014).

Por ser um composto solúvel em água, a extração aquosa da betalaína apresenta potencial para se obter uma extração mais eficiente (MEREDDY et al., 2017), e conseqüentemente, de baixo custo. Além deste, existem outros métodos de extração, como campos elétricos pulsantes, ultrassom, HPLC e outros. Tais tecnologias estão sendo estudadas com o intuito de minimizar a utilização de solventes orgânicos, bem como o tempo de tratamento e a temperatura, possibilitando um aumento na transferência de massa, e no rendimento do produto final (BARBA et al., 2016).

Em relação à estabilidade, uma das formas comumente usadas para melhorar esse parâmetro, é a utilização da encapsulação, visto que cria uma barreira entre o material e o ambiente, prevenindo assim a degradação (ANTIGO et al., 2017), além disso, pode possibilitar mudanças físicas no material, na reologia por exemplo, com o intuito de melhorar a solubilidade entre o composto de estudo e a matriz de aplicação (DORDEVIC et al., 2014).

Dessa forma, vários autores estão estudando formas e matrizes para aplicação de corantes naturais, como por exemplo alimentos congelados, produtos lácteos de baixa temperatura, bem como produtos com vida de prateleira curta, tais como iogurtes, pudim, sorvetes, carnes, salsichas (MARTINS et al., 2017). Mesmo sua maior aplicação sendo como

corante natural alimentício (POLTURAK; AHARONI, 2018), autores também tem relatado sobre o uso desses corantes em tecidos (GANESAN; KARTHIK, 2017).

Do ponto de vista alimentício, a aplicação de corantes naturais visa, além do melhoramento da cor do alimento, seu enriquecimento nutricional, devido a adição ou aumento da quantidade de compostos bioativos, como os antioxidantes, proporcionando assim um alimento mais saudável, e suprimindo as necessidades do uso de corantes artificiais. Portanto, é de grande importância uma pesquisa relacionada à melhorias na obtenção da betalaína, visto que a ocorrência de espécies produtoras e plantas comestíveis que contém esse composto, é limitada (POLTURAK; AHARONI, 2018).

2.2 Planejamento experimental

Os experimentos são realizados de forma a analisar o comportamento de um processo ou sistema, sendo ele uma combinação de máquinas, pessoas ou métodos, que transformam uma variável de entrada (normalmente um material) em uma ou mais variáveis de saída ou variáveis resposta (MONTGOMERY, 1976), ou seja, ocasionam mudanças propositalmente na variável de entrada, de forma a avaliar possíveis alterações sofridas pela variável resposta e a razão pelo qual essas alterações ocorreram.

Uma das formas possíveis para realizar tal análise, é através do uso da Metodologia de Superfície de resposta, que consiste num grupo de técnicas matemáticas e estatísticas desenvolvidas com o intuito de avaliar a relação presente entre uma resposta de interesse e um número de variáveis de controle.

Fazendo uso de modelos polinomiais de primeira ordem, que são utilizados na análise de observações obtidas da aplicação de experimentos fatoriais, fatoriais fracionados e de blocos, e modelos de segunda ordem, utilizados na análise de observações de Delineamentos do tipo Composto Central e Box-Behnken (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

Nos casos em que um modelo de primeira ordem não for adequado - não conseguir descrever, de forma significativa, a superfície verdadeira do local -pois, próximo do pico (ponto ótimo), o modelo normalmente exibe uma curvatura maior, se faz necessário o uso da metodologia da máxima inclinação ascendente (ou descendente), em que é possível observar a região onde se encontra o ponto ótimo (máximo ou mínimo) dos dados, e a partir daí, seguir para a aplicação da metodologia de superfície de resposta, utilizando um modelo de segunda ordem, como novos níveis dos fatores ajustados (DEAN; VOSS, 1999).

2.3 Metodologia de superfície de resposta (MSR)

A metodologia de superfície de resposta foi desenvolvida por Box e Wilson, em 1951, com o intuito de otimizar processos de fabricação na indústria química, como por exemplo, obter um maior rendimento, com alta pureza e baixo custo, através da variação de parâmetros como temperatura, pressão, duração de reação e proporção de reagentes (DEAN; VOSS, 1999).

Consiste numa ferramenta matemática e estatística que consegue avaliar simultaneamente a influência de diferentes fatores, e otimizar suas condições experimentais (CHEN; ZHAO; YU, 2015; MONTGOMERY, 1976).

Para se utilizar a metodologia de superfície de resposta como uma forma de otimização, faz-se necessário seguir alguns passos (BASHIR et al., 2015):

- a) Seleção das variáveis independentes mais importantes e seu nível no sistema, através de estudos preliminares;
- b) A escolha do delineamento experimental e realização dos experimentos de acordo com a matriz experimental selecionada;
- c) O gerenciamento matemático-estatístico dos dados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial;
- d) Diagnóstico do modelo – avaliar a estimativa do erro e checar as interações e termos quadráticos;
- e) A verificação da necessidade e possibilidade de realizar um deslocamento em direção à região ótima;
- f) Obtenção dos valores ótimos para cada variável resposta.

Desse modo, tal metodologia pode ser utilizada para otimizar qualquer variável resposta que possa ser influenciada por determinados fatores, como por exemplo, otimizar a extração de betacianina a partir do resíduo da beterraba, utilizando o design Box-Behnken com 4 fatores e 3 níveis (Figura 2) (MARAN; PRIYA, 2016).

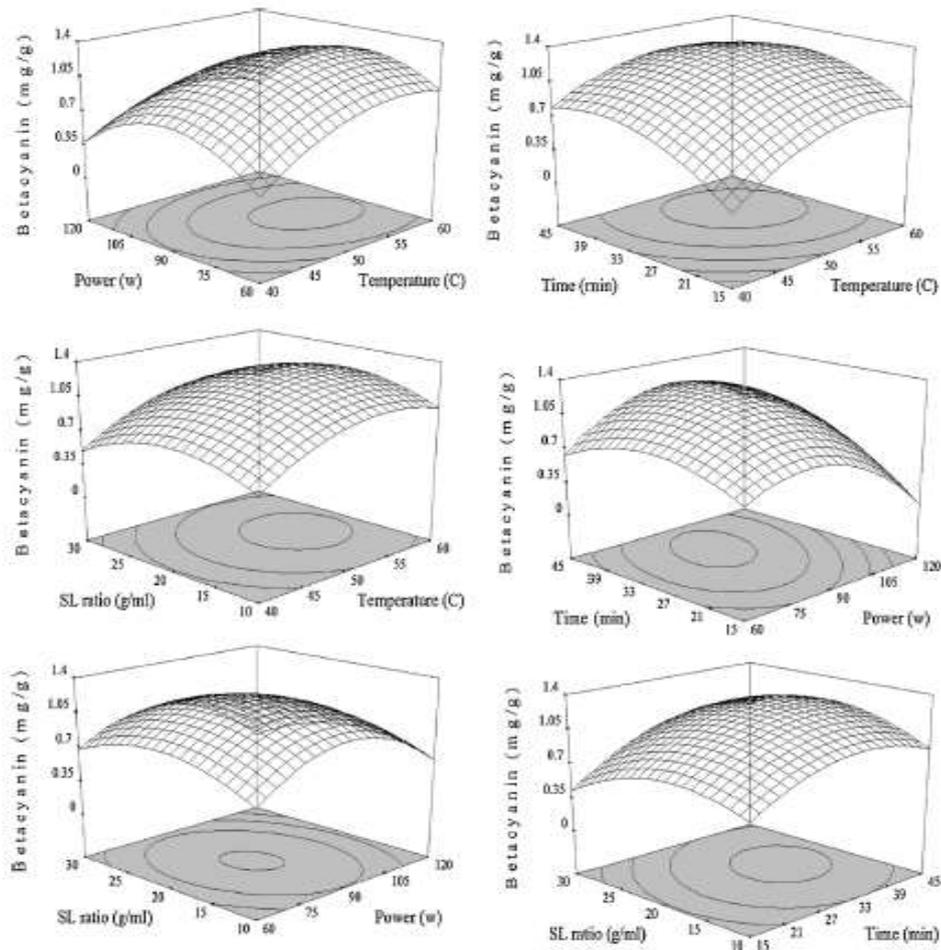


Figura 2. Efeito de variáveis de processo no rendimento de betacianina (MARAN; PRIYA, 2016).

A partir dessas superfícies é possível observar a relação entre os fatores, e os níveis em que se obteve um melhor resultado para a variável resposta, facilitando assim, trabalhos futuros.

De forma geral, pode-se representar a relação entre uma variável resposta (Y) e os fatores, por uma equação do tipo (Equação 1)(SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014):

$$Y = f(x_1, x_2, x_3 \dots) + \varepsilon \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde ε representa o erro aleatório, levando em consideração as variações observadas na variável resposta que não são explicadas pelos fatores x_1, x_2, \dots, x_i . Assim, pode-se definir a função f como sendo uma superfície, quando uma variável resposta pode ser representada graficamente em função de um ou mais fatores em um processo.

Dentre os modelos polinomiais de aproximação, os de primeira e segunda ordem são os mais utilizados na metodologia de superfície de resposta.

2.4 Modelos de Primeira Ordem

De forma geral, o modelo de primeira ordem pode ser descrito de acordo com a Equação (2) (KLEIJNEN, 2015), conhecido também como Modelo de efeito principal, pois apresenta apenas os efeitos principais dos dois fatores (CARLEY; KAMNEVA; REMINGA, 2004).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \varepsilon \quad (\text{Equação 2})$$

Quando se faz necessário conhecer a interação entre esses fatores, adiciona-se outro termo na equação do modelo (Equação 3), conseqüentemente introduzindo curvatura na função de resposta (CARLEY; KAMNEVA; REMINGA, 2004).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \varepsilon \quad (\text{Equação 3})$$

Onde Y representa a variável resposta; x_1 representa uma variável explicativa (fator 1); x_2 representa outra variável explicativa (fator 2); ε é a variável aleatória que representa o erro experimental; $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}$ são os parâmetros do modelo, que são estimados, e que definem a regressão polinomial de primeira ordem.

Entretanto, faz-se uso desse modelo quando o experimentador quer aproximar uma superfície de resposta de uma região relativamente pequena, e que possui pouca curvatura, caso contrário, o modelo apresentará falta de ajuste (DEAN; VOSS, 1999).

Uma das formas de analisar essa interação entre dois ou mais fatores e como eles influenciam a variável resposta, é através dos experimentos fatoriais (CIRILLO, 2015), que analisam todas as combinações possíveis entre os níveis de todos os fatores (MONTGOMERY, 1976). Para cada tipo de experimento, variando os números de fatores (k) e níveis (p), têm-se uma quantidade de tratamentos diferentes, como descrito na Tabela 2.

Os fatores são as variáveis independentes do sistema, como pH, concentração de soluto, massa, tempo, temperatura, dentre outros. Os níveis são os intervalos de variação de cada fator. A variável resposta ou dependente é a variável de interesse e que sofre modificações mediante a presença dos fatores.

Tabela 2. Número de tratamentos para fatoriais 2^k , 3^k e p^k .

Níveis	Fatores			
	k=2	k=3	k=4	k=5
2	$2^2 = 4$	$2^3 = 8$	$2^4 = 16$	$2^5 = 32$
3	$3^2 = 9$	$3^3 = 27$	$3^4 = 81$	$3^5 = 243$
P	p^2	p^3	p^4	p^5

Fonte: CIRILLO (2015)

Dependendo do número de variáveis respostas que se deseja obter, torna-se inviável realizar todas os ensaios de forma homogênea. Por isso, aconselha-se realizar o experimento fatorial em blocos, ou seja, o mesmo seria dividido em dias, por exemplo, e cada dia seria um bloco.

Outro experimento que pode ser utilizado é o fatorial fracionado, conhecido também como fatorial incompleto, quando apenas parte do experimento é realizado através de um conjunto de equações que determina quais efeitos e interações são mais importantes ou mais fáceis de serem analisadas (CIRILLO, 2015).

2.5 Modelos de Segunda Ordem

Um dos planejamentos de experimentos para a utilização de um modelo de segunda ordem comumente utilizado é o Delineamento Composto Central (DCC) (MONTGOMERY, 1976). É aplicado em várias áreas, como alimentícia, química e biológica, devido sua adequação ao modelo e design de experimentos (CHEN; ZHAO; YU, 2015). É composto por um ou mais pontos centrais, que serão executados com réplicas, para uma melhor estimativa do erro puro e cálculo dos pontos axiais (pontos estrela), que se situam a uma distância α de cada aresta, ou nas médias de cada nível (Figura 3a).

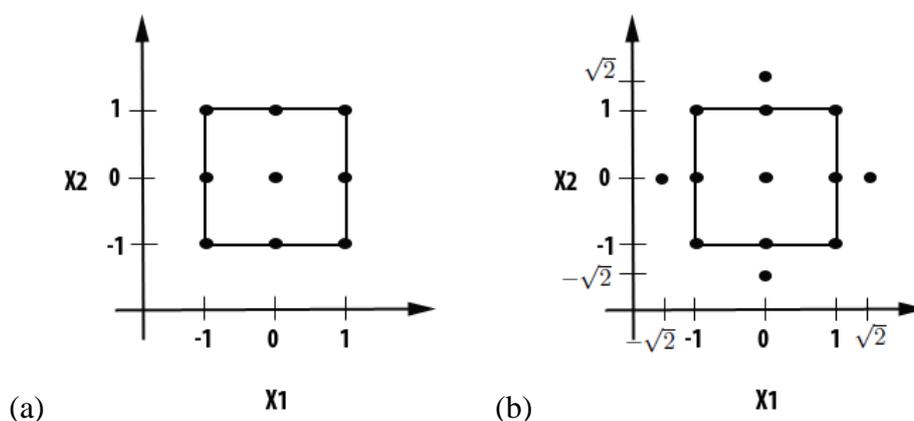


Figura 3. Planejamento de composição central com $\alpha=1$ (a) e $\alpha=\sqrt{2}$ (b).

Observa-se na Figura 3b que os pontos axiais estão localizados para fora da região experimental, sendo este o formato mais utilizado quando $\alpha > 1$. Nesse caso, a distância entre estes e os pontos centrais seria de $\alpha = 1$ (válido apenas para experimentos fatoriais com dois fatores e dois níveis), possibilitando assim realizar teste para efeitos de curvatura cúbicos e quadráticos, e o modelo teria a seguinte forma (Equação 4):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{11} \cdot x_1^2 + \beta_{22} \cdot x_2^2 + \beta_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde Y representa a variável resposta; x_1 representa uma variável explicativa (fator 1); x_2 representa outra variável explicativa (fator 2); ε_{12} é a variável aleatória que representa o erro experimental; $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}, \beta_{11}, \beta_{22}$ são os parâmetros do modelo que são estimados, sendo os dois últimos, responsáveis por definirem a regressão polinomial de segunda ordem. Tal modelo é usado quando a curvatura da superfície de resposta é grande o suficiente a ponto de tornar-se um modelo de primeira ordem (mesmo com as interações) inadequado (CARLEY; KAMNEVA; REMINGA, 2004).

O número total de ensaios para um DCC pode ser expresso pela Equação 5, onde k é a quantidade de variáveis independentes (fatores) e n_0 os pontos centrais (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010):

$$n = 2^k + 2k + n_0 \quad (\text{Equação 5})$$

Outra forma é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde o número de pontos estrelas (axiais) deve ser 2, para cada fator no plano experimental, e o número de pontos centrais, suficientes para estimar a variância. Além disso deve ser construído a partir de um composto central (fatorial 2^k + pontos centrais) que é utilizado para buscar a região ótima de operação.

Outro design comumente utilizado é o Box-Behnken, que é um modelo de metodologia de superfície de resposta giratória e esférica, e consiste em três projetos fatoriais interligados, com todos os pontos localizados na superfície de uma esfera em torno do centro do projeto (SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014). Além destes, pontos centrais devem ser adicionados ao design para que sejam estimados todos os parâmetros do modelo (DEAN; VOSS, 1999).

Para um experimento com 3 fatores, sua representação gráfica pode ser vista de duas formas: Um cubo com ponto central e pontos médios das arestas (Figura 4a) ou uma figura de três designs fatoriais interligados e um ponto central (Figura 4b) (FERREIRA et al., 2007).

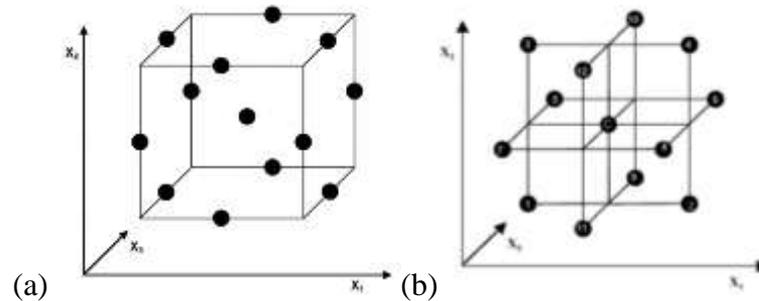


Figura 4. Representação gráfica para um design Box-Behnken de 3 fatores (a) e 3 designs fatoriais 2^2 interligados (b) (FERREIRA et al., 2007).

Além dos propósitos citados acima, a utilização desses tipos de modelos também visa a determinação, através de testes de hipóteses, a significância dos fatores, dentro dos intervalos estabelecidos e os pontos de ótimo, dentro da região de interesse (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

2.6 Adequacidade do Modelo

Independente de qual modelo for usado para analisar os dados, faz-se necessário verificar sua adequacidade, para que os resultados sejam confiáveis.

A aplicação da análise de variância (ANOVA), que compara a variação devido aos tratamentos (fatores) com as causadas pelos erros aleatórios característicos das respostas geradas, possibilita avaliar a significância da regressão utilizada, e contanto que o projeto tenha sido realizado com repetições autênticas, pelo menos em seu ponto central, é válido a análise de Falta de ajuste (*Lack of fit*) (BEZERRA et al., 2008; DEAN; VOSS, 1999), que mostra se o modelo representa bem a resposta média, em função dos níveis dos fatores (DEAN; VOSS, 1999). Sendo assim, para um bom ajuste, os dados devem apresentar uma regressão significativa e ausência de *Lack of fit*.

Outra forma de verificar a adequacidade, é através do coeficiente de determinação (R^2), que estipula a capacidade preditiva do modelo (BAS; BOYACI, 2007). Entretanto, não se pode afirmar que o modelo possui bom ajuste apenas por essa verificação, uma vez que, com a adição

de variáveis ao modelo, seu valor sempre aumentará, independente se essa variável foi significativa ou não, logo, observa-se o R^2 ajustado, que caso apresente grande diferença em relação ao R^2 , há grandes chances de termos não significativos terem sido adicionados ao modelo (MONTGOMERY, 1976).

Assim, mesmo o modelo apresentando ajuste significativo, a análise dos resíduos também pode ser feita com o intuito de verificar se os dados seguem uma distribuição normal ou não, pois é um pressuposto de qualquer modelo linear.

Os resíduos são a diferença entre os valores preditos e observados. São analisados por meio de gráficos de normalidade (Quantil-Quantil) que, para afirmar adequacidade do modelo, os pontos representando os resíduos devem estar dispostos em forma de uma linha reta (BASHIR et al., 2015), ou através do Histograma de resíduos, na qual as barras precisam apresentar simetria, ou seja, seguir aproximadamente a forma de uma curva normal. Como forma de complementação, a normalidade dos resíduos pode ser avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, considerado um dos testes de normalidade mais confiáveis (BATY et al., 2015). Para tal, o valor calculado ($W_{\text{calculado}}$) deve se sobressair ao tabelado (W_{tabelado}), e o p-valor, superior ao nível de significância (α). Feito isso, pode-se afirmar que a amostra provém de uma população normal.

2.7 Bootstrap

O método *Bootstrap*, introduzido por Efron em 1979, é uma técnica de reamostragem, que consiste na obtenção de um “novo” conjunto de dados, a partir da reamostragem do conjunto de dados originais (EFRON, 2003; MATSUYAMA, 2018). Assim, um conjunto de dados $x = (x_1, x_2, x_3 \dots x_n)$ obtido experimentalmente, é reamostrado de forma a obter a amostra *Bootstrap* $x^* = (x_1^*, x_2^*, x_3^* \dots x_n^*)$. A partir do cálculo da média aritmética, repetidas vezes, obtém-se um conjunto de estimadores $(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_3 \dots \bar{x}_n)$, que formam a distribuição *Bootstrap* (SILVA; VIEIRA; NETO, 2018).

O esquema básico desse método é demonstrado na Figura 5, na qual, a partir de uma amostra aleatória original, é feita a reamostragem, com substituição da amostra original, seguido do cálculo das variáveis estatística de interesse. Esse processo é repetido pelo menos 1000 vezes, até obtenção de novos valores para cada variável estatística (NICOLIN et al., 2016). A reamostragem de dados é uma técnica eficaz pois permite quantificar a incerteza a partir dos cálculos dos erros padrões e intervalos de confiança, bem como realizar testes de

significância, fornecendo assim respostas mais precisas do que os outros métodos comumente utilizados, fazendo uso ainda de menos suposições (FILHO, 2010).

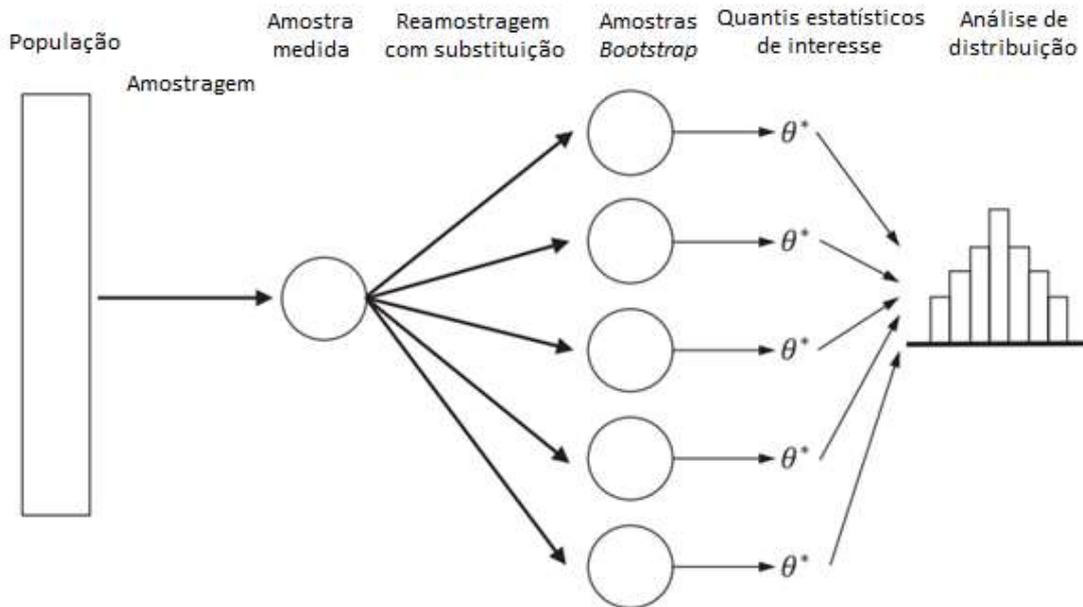


Figura 5. Ilustração esquemática do procedimento do método *Bootstrap* (MATSUYAMA, 2018).

Assim, pode-se afirmar que o método *Bootstrap* é eficaz na análise de dados, uma vez que realiza, por meio da reamostragem, o que seria desejável de ser feito na prática (repetição do experimento várias vezes), mas que, devido à vários fatores como tempo e custo de operação, torna-se inviável. Este fato torna-se interessante, justamente pela pouca incidência de trabalhos no setor alimentício utilizando essa técnica, uma vez que enriqueceria ainda mais o trabalho, gerando também dados de maior confiabilidade.

REFERÊNCIAS

- ANTIGO, J. L. D. et al. Effect of pH on the stability of red beet extract (*Beta vulgaris* L.) microcapsules produced by spray drying or freeze drying. **Food Science and Technology**, v. 2061, n. AHEAD, p. 0–0, 2017.
- BAIÃO, D. S. et al. Nutritional , Bioactive and Physicochemical Characteristics of Different Beetroot Formulations. **Food Additives**, p. 21–43, 2017.
- BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2016.
- BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836–845, 2007.
- BASHIR, M. J. K. et al. Wastewater Treatment Processes Optimization Using Response Surface Methodology (RSM) Compared with Conventional Methods: Review and Comparative Study. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 23, n. 2, p. 244–252, 2015.
- BATY, F. et al. A Toolbox for Nonlinear Regression in R : The Package nlstools. **Journal of Statistical Software**, v. 66, n. 5, p. 1–21, 2015.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.
- CARLEY, K. M.; KAMNEVA, N. Y.; REMINGA, J. Response surface methodology. **CASOS Technical Report**, n. October, p. 1–26, 2004.
- CIRILLO, M. A. Otimização na experimentação: **Aplicações nas engenharias e ciências agrárias**. Editora: UFLA. 2015.
- CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015.
- DEAN, A.; VOSS, D. **Design and Analysis of Experiments**. [s.l.] Springer US, 1999. v. 26
- DENG, L.-Z. et al. Chemical and physical pretreatments of fruits and vegetables: Effects on drying characteristics and quality attributes – a comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, n. December, p. 1–25, 2017.
- DORDEVIC, V. et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Eng Rev**, 2014.
- EFRON, B. Second Thoughts on the Bootstrap. **Statistical Science**, v. 18, n. 2, p. 135–140, 2003.

ESATBEYOGLU, T. et al. Betanin-A food colorant with biological activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 1, p. 36–47, 2015.

ESQUIVEL, P. Betalains. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color**, p. 81–99, 2016.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FILHO, A. S. DA S. INFERÊNCIA EM AMOSTRAS PEQUENAS: MÉTODOS BOOTSTRAP. **Revista de Ciência Exata e Tecnologia**, v. 5, n. 5, p. 115–126, 2010.

FILHO, D. G. DE A. et al. Processamento de produto farináceo a partir de beterrabas submetidas à secagem estacionária. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 207–214, 2011.

GANESAN, P.; KARTHIK, T. Analysis of colour strength, colour fastness and antimicrobial properties of silk fabric dyed with natural dye from red prickly pear fruit. **Journal of the Textile Institute**, v. 108, n. 7, p. 1173–1179, 2017.

GENGATHARAN, A.; DYKES, G. A.; CHOO, W. S. Stability of betacyanin from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and its potential application as a natural colourant in milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 427–434, 2016.

HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalain Stability and Degradation — Structural and Chromatic Aspects. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. 41–50, 2006.

KHURI, A. I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 2, p. 128–149, 2010.

KLEIJNEN, J. P. C. **Design and Analysis of Simulation Experiments**. [s.l.: s.n.].

KUMAR, S.; BROOKS, M. S.-L. Use of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) for Antimicrobial Applications—a Critical Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 17–42, 2018.

MACHADO, A. P. DA F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **FRIN**, p. 9, 2014.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 792–799, 2016.

MARTINS, N. et al. Coloring attributes of betalains: A key emphasis on stability and future applications. **Food and Function**, v. 8, n. 4, p. 1357–1372, 2017.

MATSUYAMA, T. An application of bootstrap method for analysis of particle size distribution. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 6, p. 1404–1408, 2018.

MEREDDY, R. et al. Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology. **Food Chemistry**, v. 215, p. 311–317, 2017.

MIELGO-AYUSO, J. et al. Fruit and vegetables consumption is associated with higher vitamin intake and blood vitamin status among European adolescents. **European Journal of Clinical Nutrition**, n. 1, p. 1–10, 2017.

MILLER, M. G. et al. Role of fruits, nuts, and vegetables in maintaining cognitive health. **Experimental Gerontology**, v. 94, p. 24–28, 2017.

MISHRA, D. K.; DOLAN, K. D.; YANG, L. BOOTSTRAP CONFIDENCE INTERVALS FOR THE KINETIC PARAMETERS OF DEGRADATION OF ANTHOCYANINS IN GRAPE POMACE. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 517, p. 1220–1233, 2011.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 1976.

NEAGU, C.; BARBU, V. Principal component analysis of the factors involved in the extraction of beetroot betalains. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 20, n. 4, p. 311–318, 2014.

NICOLIN, D. J. et al. Study of uncertainty in the fitting of diffusivity of Fick 's Second Law of Diffusion with the use of Bootstrap Method. **Journal of Food Engineering**, v. 184, p. 63–68, 2016.

POLTURAK, G.; AHARONI, A. “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. **Molecular Plant**, v. 11, n. 1, p. 7–22, 2018.

PRAKASH MARAN, J. et al. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1145–S1157, 2017.

RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 670–675, 2013.

SALVADOR, C. A. Olericultura - Análise da Conjuntura Agropecuária. **SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento**, n. 41, p. 18, nov. 2017.

SILVA, C. M.; VIEIRA, J. W.; NETO, N. A. A. Controle estatístico de qualidade usando o método bootstrap. **Scientia Pllena**, v. 14, n. 3, p. 1–9, 2018.

SWAMY, G. J.; SANGAMITHRA, A.; CHANDRASEKAR, V. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 64–74, 2014.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - 4ª edição revisada e ampliada. In: **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas: BookEditora, 2011. p. 161.

YOLMEH, M.; HABIBI NAJAFI, M. B.; FARHOOSH, R. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 155, p. 319–324, 2014.

United States Department of Agriculture. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference (Internet). 2013**. Disponível em: <from:<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list>>. Acesso em: 20 Junho de 2018.

CAPÍTULO 2

Otimização da extração de compostos bioativos da beterraba por metodologia de superfície de resposta e método de *Bootstrap*

RESUMO

Atualmente é possível observar uma demanda do consumidor por produtos mais saudáveis, adicionados de compostos que ajudam a melhorar as funções do corpo, como antioxidantes, antivirais e antimicrobianos, incentivando assim a comunidade científica a se dedicar cada vez mais ao desenvolvimento de formas mais rápidas e eficazes de obtenção. Diante disso, objetivou-se otimizar a extração de compostos bioativos da beterraba (betacianina, betaxantina e ácido betalâmico), utilizando metodologia de superfície de resposta e o método *Bootstrap*. Desenvolveu-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) de segunda ordem (2^2), com 5 repetições no ponto central e 4 pontos axiais, sendo os fatores, tempo e temperatura, e a massa fixada em 0,5g. Para encontrar os intervalos utilizados em cada fator, além da literatura, foi realizado o procedimento de máxima inclinação ascendente. O ponto de ótimo, foi encontrado próximo do ideal estimado, sendo de aproximadamente 28 minutos e 66°C. A partir da análise pelo *Bootstrap*, foi possível construir uma elipse de confiança (95%), onde pode-se observar as quantidades máximas de cada composto, situadas nos intervalos de 20-30 minutos e 60-65°C, 20-30 minutos e 55-65°C, e 20-35 minutos e 60-70°C, para a Betacianina, Betaxantina e Ácido Betalâmico respectivamente, comprovando assim a localização do ponto máximo de extração.

Palavras-chave: otimização, compostos bioativos, betalaínas.

ABSTRACT

It is now possible to observe a consumer demand for healthier products, plus compounds that help improve the functions of the body, such as antioxidants, antivirals and antimicrobials, thus encouraging the scientific community to devote itself more and more to the development of faster and more effective forms of procurement. The objective was to optimize the extraction of bioactive compounds from beetroot (betacyanin, betaxanthin and betalamic acid) using response surface methodology and the *Bootstrap* method. A second-order rotational central composite (DCCR) (2^2) was developed, with 5 replicates at the central point and 4 axial points, with the factors time and temperature, and the mass fixed at 0.5g. To find the intervals used in each factor, in addition to the literature, the procedure of maximum slope was performed. The optimum point, was found close to the estimated ideal, being approximately 28 minutes and 66 °C. From the *Bootstrap* analysis, it was possible to construct an ellipse of confidence (95%), where it is possible to observe the maximum amounts of each compound, located in the intervals of 20-30 minutes and 60-65°C, 20-30 minutes and 55 -65°C, and 20-35 minutes and 60-70°C, for Betacyanin, Betaxanthin and Betalamic Acid respectively, thus proving the location of the maximum extraction point.

Key words: optimization, bioactive compounds, betalains.

1. Introdução

Atualmente, é notável que a busca por alimentos saudáveis cresce a cada dia, fazendo com que a comunidade científica se dedique cada vez mais a aumentar o conhecimento sobre esses produtos, comumente conhecidos como alimentos funcionais (DELGADO-ANDRADE, 2017).

Um dos motivos para esse crescimento está na confiabilidade do consumidor diante do produto, uma vez que a quantidade de nutrientes e compostos bioativos presentes auxilia em várias funções do organismo, como problemas estomacais e intestinais, por exemplo (KRAUS; ANNUNZIATA; VECCHIO, 2017).

A cor de um alimento é um dos fatores mais importantes para a escolha do consumidor (CARDOSO-UGARTE et al., 2014; NGAMWONGLUMLERT; DEVAHASTIN; CHIEWCHAN, 2017), por isso o uso de pigmentos naturais, não somente na área alimentícia, mas também na indústria cosmética, vem sendo difundido cada vez mais, devido a toxicidade de alguns corantes sintéticos (MARAN; PRIYA, 2016). Além de auxiliar na cor, os corantes naturais são sequestrantes de radicais livres, prevenindo assim a oxidação das moléculas, e possuem também propriedades antioxidantes, antivirais e antimicrobianas (SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014a).

Dentre eles, encontra-se a betalaína, pigmento vermelho-arroxeadado conhecido principalmente por estar presente, em grande quantidade, na beterraba (*Beta Vulgaris L.*), legume de raiz consumido mundialmente e proveniente da família *Chenopodiaceae* (MEREDDY et al., 2017). Este composto possui características antivirais e antimicrobianas, além de poder ser utilizado como fonte de aminoácidos essenciais (PRAKASH MARAN et al., 2017). Além disso, a beterraba é utilizada na produção industrial de sucos, concentrados e pós, como também no setor de confeitaria (MARAN; PRIYA, 2016).

Dentre as formas de extração desse composto está a maceração, centrifugação ou extração sólido-líquido, a partir da beterraba moída (BASTOS; GONÇALVES, 2017), e por ser um composto polar, a água é bastante utilizada como solvente (CARDOSO-UGARTE et al., 2014), além do fato de não apresentar toxicidade.

Baseado nisso, vários estudos vem sendo realizados com o intuito de otimizar as condições de extração de corantes naturais, variando-se como por exemplo, tempo, temperatura e concentração de solvente, através da metodologia de superfície de resposta (PRAKASH MARAN et al., 2017; SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014a; YOLMEH;

HABIBI NAJAFI; FARHOOSH, 2014). Para tais estudos, faz-se necessário a utilização de experimentos, que consistem em um teste ou série de testes realizados, nos quais diferentes condições de processo são aplicadas à uma variável de interesse, com o intuito de observar e identificar as mudanças ocorridas (MONTGOMERY, 1976).

A partir disso, é possível observar, graficamente, esses resultados, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, que consiste numa ferramenta matemática e estatística que consegue avaliar simultaneamente a influência de diferentes fatores, e otimizar suas condições experimentais (CHEN; ZHAO; YU, 2015).

Além da metodologia de superfície de resposta, o método *Bootstrap* pode ser também utilizado, uma vez que visa uma reamostragem, a partir dos dados originais, sendo possível a obtenção de intervalos de confiança para estatísticas de interesse (EFRON, 2003), que facilitariam, posteriormente, uma aplicação industrial (MISHRA; DOLAN; YANG, 2011).

Assim, o objetivo deste estudo foi otimizar a extração de compostos bioativos da beterraba (betacianina, betaxantina e bécidobetalâmico), utilizando metodologia de superfície de resposta e o método *Bootstrap*.

2. Materiais e Métodos

A matéria-prima utilizada foi obtida no comércio local da cidade de Maringá, localizada no Paraná, sudoeste do Brasil, no dia da análise.

A beterraba foi lavada em água corrente, descascada (descartando a casca) e ralada. A extração foi conduzida segundo Kushwaha et al., (2017), com algumas modificações. Uma massa da polpa da beterraba, previamente pesada, foi adicionada em um erlenmeyer contendo 50 ml de água destilada. O material foi colocado em banho-maria, sem agitação, onde variou-se o tempo e temperatura de extração. Após a extração, o material foi filtrado em papel de filtro (0,45µm), para obtenção do extrato.

Os ensaios foram realizados de forma aleatória, diminuindo assim os efeitos da variabilidade inexplicáveis nas respostas, devido a fatores externos.

A quantificação dos compostos bioativos da beterraba (quantidade total de pigmento) foi determinada por espectrofotometria, de acordo com a Equação 1 (STINTZING et al., 2005).

$$(mg/100 g \text{ beterraba fresca}) = \frac{AxMMxDFx10^2}{\varepsilon Lx C_a} \quad (\text{Equação 1})$$

em que A é o valor da absorbância nos comprimentos de onda 430, 480 e 536 nm, para ácido betalâmico, betaxantina e betacianina, respectivamente, DF é o fator de diluição, L é o comprimento do caminho da cubeta (1 cm) e C_a é a concentração sólido/solvente (g/ml).

A massa molar (MM) e o coeficiente de extinção molar (ϵ) do ácido betalâmico (MM =212 g/mol; ϵ =24000 M⁻¹ cm⁻¹), betaxantinas (MM =308 g/mol; ϵ =48000 M⁻¹ cm⁻¹) e betacianinas (MM =550 g/mol; ϵ =60000 M⁻¹ cm⁻¹) foram aplicadas para quantificar os respectivos pigmentos (SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014a).

Um planejamento fatorial 2², acrescido de 6 repetições no ponto central, foi realizado de forma a encontrar um intervalo real para os fatores (Tempo, Temperatura e Massa), que apresentasse o ponto de máximo do composto em análise. Os fatores foram definidos de acordo com a literatura (SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014a), sendo os intervalos de 42 a 62 minutos, 41 a 61°C e 1,5 a 2,5g de beterraba. Os teores de betacianina, betaxantina e ácido betalâmico foram as variáveis respostas observadas.

Após a obtenção das variáveis resposta para cada ponto do planejamento, foi realizado o procedimento de máxima inclinação ascendente, de forma a encontrar o pico máximo de extração.

De posse dos resultados referentes ao teste de máxima inclinação ascendente, desenvolveu-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) de segunda ordem (2²) (Tabela 1), com 5 repetições no ponto central e 4 pontos axiais, sendo os fatores, tempo e temperatura, e a massa fixada em 0,5g.

Tabela 1. Fatores, intervalo e níveis independentes utilizados para Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Fatores	Níveis codificados				
	-1.414	-1	0	1	1.414
Tempo (min)	16	20	30	40	44
Temperatura (°C)	50	55	65	75	80

Neste caso, o conteúdo de betacianina foi utilizado como variável resposta, visto que é o composto presente em maiores quantidades, e responsável pela cor vermelha do extrato. Vale ressaltar que o DCCR foi elaborado tendo como base os resultados obtidos para a variável betacianina no método de máxima inclinação ascendente.

Os resultados foram analisados utilizando a metodologia de superfície de resposta, com base em um modelo polinomial de segunda ordem, e o método *Bootstrap*.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Rstudio (RStudio Team 2018).

A modelagem de dados começou com um modelo de segunda ordem, que incluiu termos lineares, quadráticos e de interação. As adequações dos modelos foram analisadas em termos de R^2 , R^2 ajustado e da significância do *Lack of fit*. Usando a análise de variância (ANOVA), os termos significativos no modelo foram calculados para cada resposta e tabelas ANOVA foram criadas. A partir dos modelos de regressão obtidos, os coeficientes de regressão foram utilizados para os cálculos estatísticos para gerar gráficos de superfície de resposta. Além disso, foram produzidos Gráficos Quantil-Quantil, e teste de Shapiro-Wilk, para avaliar se os erros seguem uma distribuição normal.

A partir do modelo ajustado, sendo Y, os dados obtidos experimentalmente, o algoritmo do *Bootstrap* para um modelo de regressão linear segue os seguintes passos (DAVISON; HINKLEY, 1997) :

1. Considerar $x_1^* = x_1, x_2^* = x_2 \dots x_k^* = x_k$.
2. Reamostrar os dados com substituição do ε^* a partir do $\varepsilon - \bar{\varepsilon}$
3. A nova amostra será $Y_{new} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1^* + \hat{\beta}_2 x_2^* + \hat{\beta}_{11} x_1^{*2} + \hat{\beta}_{22} x_2^{*2} + \hat{\beta}_{12} x_1^* x_2^* + \varepsilon^*$
4. Obter as estimativas de interesse
5. Voltar ao passo 1 repetir o processo pelo menos umas 1000 vezes
6. Parar

Para uma maior confiança nos resultados, os dados foram reamostrados 2000 vezes e em cada superfície, estabelecido um ponto de máximo, referente ao maior rendimento. Com a sobreposição das superfícies, foi possível a obtenção de uma elipse de confiança com 95% de confiança para os máximos, ou seja, uma região, dentro dos níveis de tempo e temperatura pré-estabelecidos, onde é possível a obtenção do máximo rendimento na extração do composto.

3. Resultados e Discussão

Os resultados do conteúdo de betacianina, betaxantina e ácido betalâmico (mg/100g) obtidos no DCCR para as 2 variáveis em estudo (tempo e temperatura) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Delineamento experimental para as duas variáveis independentes utilizadas no processo e as respostas experimentais obtidas.

Ensaio	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Betacianina (mg/100g)	Betaxantina (mg/100g)	Ácido Betalâmico (mg/100g)
1	20	55	79,565	89,705	63,953
2	40	55	56,452	59,097	55,915
3	20	75	48,216	30,671	28,001
4	40	75	53,441	34,200	42,046
5	30	65	88,422	84,422	66,603
6	30	65	85,063	70,736	67,663
7	30	65	83,077	77,151	65,985
8	30	65	84,299	78,178	61,745
9	30	65	76,816	79,717	64,395
10	30	65	82,772	82,112	58,830
11	16	65	57,475	35,355	24,910
12	44	65	62,516	38,500	35,598
13	30	50	76,358	45,815	29,415
14	30	80	50,691	33,815	40,368

Para a betacianina, o rendimento variou de 48,216 a 88,420 mg/100g, tendo seu máximo encontrado no ponto central (ensaios 5 a 10), na condição de 30 minutos e 65°C de extração. O mesmo pode ser observado para o ácido betalâmico, na qual mostrou maior rendimento também no ponto central, variando de 58,830 a 67,663 mg/100g. A betaxantina, mesmo apresentando resultado similar, com os maiores pontos na região central, teve seu pico máximo (89,705mg/100g) no ensaio 1, na condição de 20 minutos e 55 °C.

Analisando a influência da alta temperatura, o menor rendimento tanto para a betacianina quanto para a betaxantina, foi observado no ensaio 3, com 20 minutos e 75 °C, sendo de 48,216 mg/100g e 30,671 mg/100g, respectivamente.

A análise da variância (ANOVA) para os compostos extraídos da beterraba é apresentada na Tabela 3.

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar falta de ajuste não significativa (p-valor > 0,05) com o modelo usado para a betacianina, e um valor de R² de 0,942. Já para a betaxantina e ácido betalâmico, observou-se falta de ajuste significativa (p-valor < 0,05) com R² de 0,8101 e 0,6924, respectivamente. Entretanto, a análise somente do coeficiente de determinação (R²) não justifica a falta de ajuste do modelo, uma vez que mede a redução da variabilidade da

resposta usando as variáveis regressoras no modelo; logo, um alto valor não necessariamente implica num bom ajuste (BAS; BOYACI, 2007).

Tabela 3. ANOVA para a betacianina, betaxantina e ácido betalâmico.

BETACIANINA					
	GL	SQ	QM	F- valor	Pr(>F)
FO (x1, x2)	2	638,53	319,27	15,7421	0,001685
TWI (x1, x2)	1	200,76	200,76	9,8988	0,013673
PQ (x1, x2)	2	1797,80	898,90	44,3222	4,695 ⁻⁵
Resíduo	8	162,25	20,28		
Falta de ajuste ("Lack of fit")	3	89,60	29,87	2,0557	0,224845
Erro puro	5	72,65	14,53		
R ²	0,942				
R ² ajustado	0,9058				
BETAXANTINA					
	GL	SQ	QM	F- valor	Pr(>F)
FO (x1, x2)	2	1336,8	668,38	4,2794	0,054482
TWI (x1, x2)	1	291,3	291,33	1,8653	0,209177
PQ (x1, x2)	2	3701,9	1850,95	11,8510	0,004055
Resíduo	8	12,495	156,19		
Falta de ajuste ("Lack of fit")	3	11,380	397,33	17,0091	0,004690
Erro puro	5	111,5	22,30		
R ²	0,8101				
R ² ajustado	0,6974				
ÁCIDOBETALÂMICO					
	GL	SQ	QM	F- valor	Pr(>F)
FO (x1, x2)	2	203,12	101,56	0,7781	0,491156
TWI (x1, x2)	1	121,92	121,92	0,9341	0,362114
PQ (x1, x2)	2	2025,26	1012,63	7,7581	0,013393
Resíduo	8	1044,20	130,52		
Falta de ajuste ("Lack of fit")	3	988,34	329,45	29,4893	0,001322
Erro puro	5	55,86	11,17		
R ²	0,6924				
R ² ajustado	0,5501				

FO: Polinômio de Primeira ordem; TWI: Interação de 2 sentidos; PQ: Modelo quadrático.

É interessante notar que tanto o modelo linear (FO) quanto o quadrático (PQ) foram significativos para a extração da betacianina. Contudo, para as variáveis betaxantina e ácido betalâmico, somente o modelo quadrático foi significativo ($p < 0,05$).

Observando a estimativa dos coeficientes (Tabela 4), nota-se que a temperatura

apresentou significância no conteúdo de betacianina extraída, bem como a interação entre tempo e temperatura, e seus termos quadráticos. Este fato pode ser comprovado analisando a Tabela 3, na qual é possível observar um aumento na quantidade do composto na região central (pontos centrais), porém nota-se também sua degradação, quando exposta à altas temperaturas por um longo período de tempo.

Tabela 4. Estimativa dos coeficientes para a betacianina, betaxantina e ácido betalâmico.

BETACIANINA				
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Pr (> t)
(Intercepto)	83,409	1,838	45,36	6,155 ^{-11 a}
x1 (Tempo)	-1,345	1,592	-0,844	0,422
x2 (Temperatura)	-8,832	1,592	-5,547	5,428 ^{-4 a}
x1:x2	7,084	2,251	3,146	0,013 ^a
x1^2	-12,29	1,657	-7,416	7,49 ^{-5a}
x2^2	-10,52	1,657	-6,351	2,202 ^{-4 a}
BETAXANTINA				
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Pr (> t)
(Intercepto)	78,71	5,102	15,42	3,097 ^{-7 a}
x1 (Tempo)	-2,82	4,418	-0,640	0,539
x2 (Temperatura)	-12,61	4,418	-2,854	0,021 ^a
x1:x2	8,53	6,248	1,365	0,209
x1^2	-17,13	4,599	-3,725	0,005 ^a
x2^2	-15,69	4,599	-3,411	0,009 ^a
ÁCIDO BETALÂMICO				
	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Pr (> t)
(Intercepto)	64,20	4,664	13,76	7,487 ^{-7 a}
x1 (Tempo)	2,640	4,039	0,653	0,531
x2 (Temperatura)	-4,292	4,039	-1,062	0,319
x1:x2	5,520	5,712	0,966	0,362
x1^2	-13,24	4,205	-3,150	0,013 ^a
x2^2	-10,92	4,205	-2,599	0,031 ^a

^a Fator significativo $p < 0,05$

Pela estimativa dos coeficientes observa-se que tanto o tempo quanto a temperatura apresentam efeitos negativos na variável resposta, ou seja, o maior conteúdo de betacianina é extraído em menores tempos e temperatura mais baixas, visto que este pode sofrer degradação, quando exposta à altas temperaturas e por um longo período de tempo. Porém, a interação tempo x temperatura causa um efeito positivo no conteúdo extraído.

Em relação a betaxantina, nota-se que a temperatura se mostrou significativa ($p < 0,05$), similar ao ocorrido com a betacianina, além dos termos quadráticos do tempo e temperatura. Já para o ácido betalâmico, os fatores simples não foram significativos, apenas os termos quadráticos do tempo e temperatura.

Para analisar a normalidade dos resíduos, foram feitos, gráficos Quantil-Quantil (Figura 1) e teste de Shapiro-Wilk.

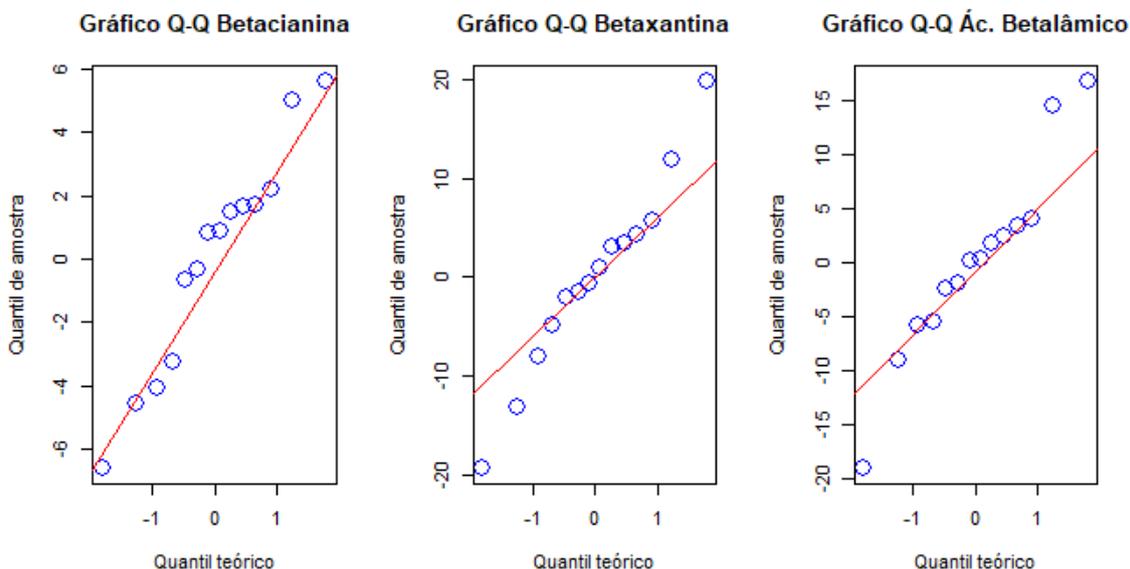


Figura 1. Gráficos Quantil-Quantil das variáveis betacianina, betaxantina e ácido betalâmico, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 1, nos gráficos Quantil-Quantil os pontos encontram-se bastante próximos de uma reta, demonstrando assim indícios de normalidade.

Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para os três compostos, e foram obtidos os valores-p de 0.95071, 0.97719 e 0.95023 para a betacianina, betaxantina e ácido betalâmico respectivamente, logo pode-se afirmar que os resíduos de todos os compostos podem ser considerados normais a 5% de significância.

3.1 Ponto de estacionaridade

O ponto de estacionaridade pode estar localizado de três formas, em uma superfície de resposta, sendo um ponto de máximo, de mínimo ou de sela (MONTGOMERY, 1976). Para a betacianina, o ponto de estacionaridade está presente em -0,1944 e -0,4484, gerando um ponto de ótimo para dados próximos do ideal estimado: Tempo \approx 28 minutos e Temperatura \approx 66°C.

Resultado similar pode ser observado para os outros dois compostos, na qual o ponto estacionário encontra-se próximo do ponto onde foi observado o maior rendimento, ou seja, nos pontos centrais (30 minutos e 65°C), sendo \approx 28 minutos e \approx 66°C para a betaxantina e \approx 30 minutos e \approx 63°C para o ácido betalâmico. Nesses pontos, foi possível a obtenção de

83,40mg/100g de betacianina, 78,71mg/100g de betaxantina e 64,20mg/100g de ácido betalâmico.

3.2 Gráficos de Superfície de Resposta

De posse dos resultados obtidos, foram construídos gráficos de superfície de resposta (Figura 2) para os três compostos extraídos, de forma a constatar, visualmente, a interação entre os dois fatores analisados e possibilitar a visualização do ponto ótimo de extração.

Observando a Figura 2A, nota-se claramente o efeito da temperatura na extração da betacianina, na qual os melhores resultados foram observados em temperaturas próximas ao ponto central (aproximadamente 65°C), com tempo variando de 20 – 30°C.

Em relação à betaxantina, também pode-se dizer que os melhores resultados foram obtidos em temperatura e tempo próximos ao ponto central (Figura 2B), provavelmente devido a degradação que ocorre quando é exposta à elevadas temperaturas.

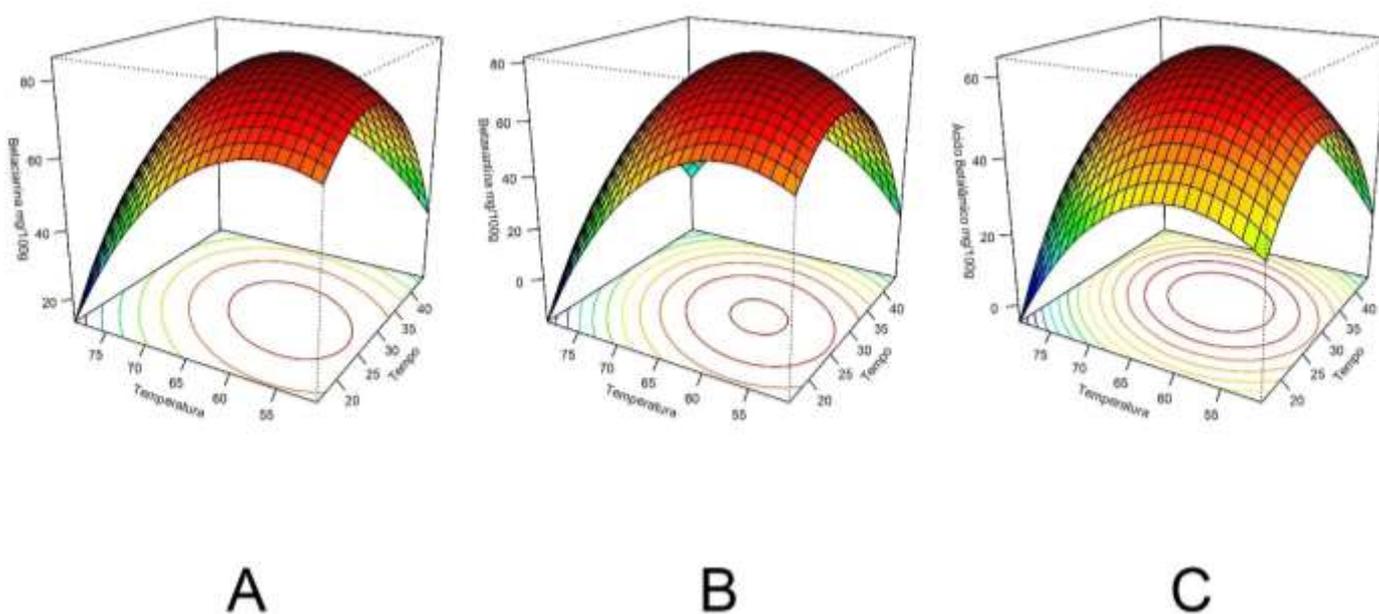


Figura 2. Superfícies de resposta do (A) betacianina, (B) betaxantina e (C) ácido betalâmico, pelas condições de extração Tempo x Temperatura

Alguns autores relataram que a temperatura influenciou significativamente no conteúdo de betaxantina extraída da beterraba, apresentando comportamento diretamente proporcional,

até certo ponto, apresentando o efeito inverso depois, devido degradação do composto (RAVICHANDRAN et al., 2013; SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014a).

Para o ácido betalâmico, pode-se constatar que a temperatura e o tempo influenciam na sua extração, sendo o primeiro, um dos fatores mais críticos com relação à estabilidade das betalaínas (BASTOS; GONÇALVES, 2017). Assim, pode-se dizer que os melhores resultados foram observados em tempo e temperaturas médias, próximas ao ponto central (30 minutos e 65°C).

De forma geral, a temperatura atua de forma a suavizar o tecido do vegetal, perturbando a interação entre seus constituintes, como compostos fenólicos e carboidratos por exemplo, aumentando assim a sua solubilidade, e conseqüentemente possibilitando uma melhor extração (MARAN; PRIYA, 2016; SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014a).

Estudo realizado com extrato da beterraba, obtido a partir da extração aquosa, utilizando um delineamento Box-Behnken com 3 fatores e 3 níveis, mostrou que o teor de betalaína aumenta de forma diretamente proporcional ao aumento da temperatura entre 40-70°C, sofrendo redução, à medida que a temperatura se eleva (SWAMY; SANGAMITHRA; CHANDRASEKAR, 2014b). Logo, pode-se perceber a influência da temperatura na extração desse composto, bem como sua sensibilidade à altas temperaturas, como observado no estudo realizado.

3.3 Análise pelo método *Bootstrap*

Primeiramente, foi realizada a reamostragem dos dados, conforme pode ser observado na Figura 3, como forma de demonstrar o que o método é capaz de realizar.

Pode-se observar que as novas superfícies de betacianina reamostradas são muito semelhantes àquelas geradas pelos dados experimentais, uma vez que esses valores estão muito próximos dos valores previstos, além de afirmar a viabilidade dessa abordagem para a extração dos compostos bioativos da beterraba. Vale ressaltar que a reamostragem dos dados foi feita para os três compostos, 2000 vezes cada.

Também foi possível denotar que a região de máximo se localizou na região central, ou seja, em torno do zero, tanto para o tempo quanto para a temperatura, uma vez que esse intervalo mostrado no gráfico (eixo X e Y) significa os níveis codificados do delineamento. Isso apenas comprova o que foi analisado anteriormente, que o maior rendimento é obtido na região onde foi delimitado os pontos centrais do delineamento, sendo 30 minutos e 65°C.

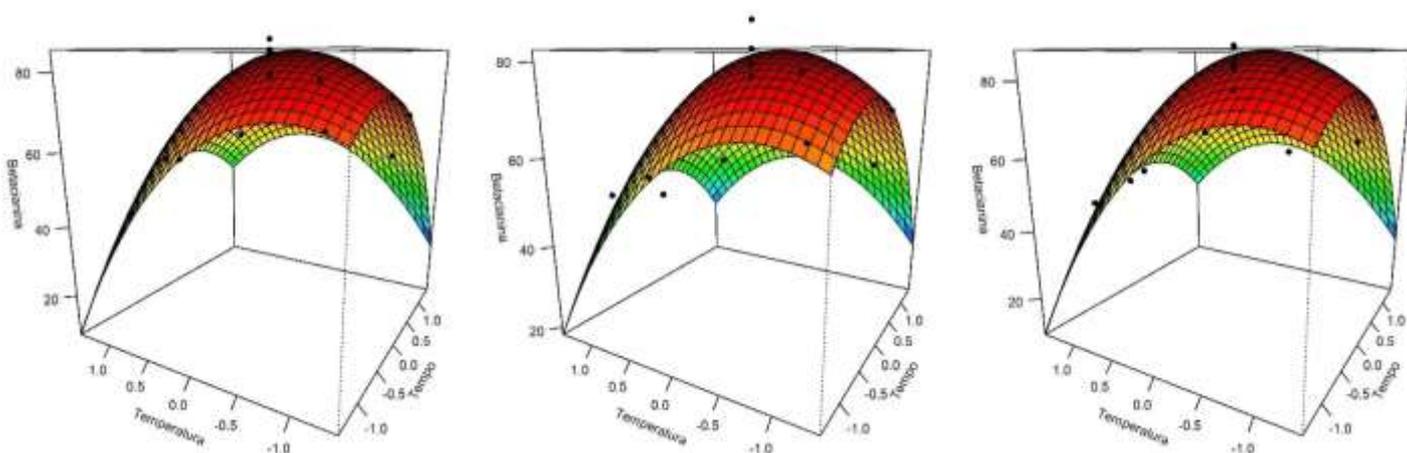


Figura 3. Superfícies com dados reamostrados referentes à betacianina, pelas condições de extração Tempo x Temperatura

A partir dos dados experimentais (Tabela 3), foi possível obter um ponto de ótimo, utilizando a metodologia de superfície de resposta, logo, para cada superfície nova gerada, novos pontos de ótimo também foram obtidos, criando assim uma distribuição bidimensional de ótimos (Figura 4), da qual foi obtida uma elipse de confiança (95%) onde foi possível obter quantidades máximas de cada composto.

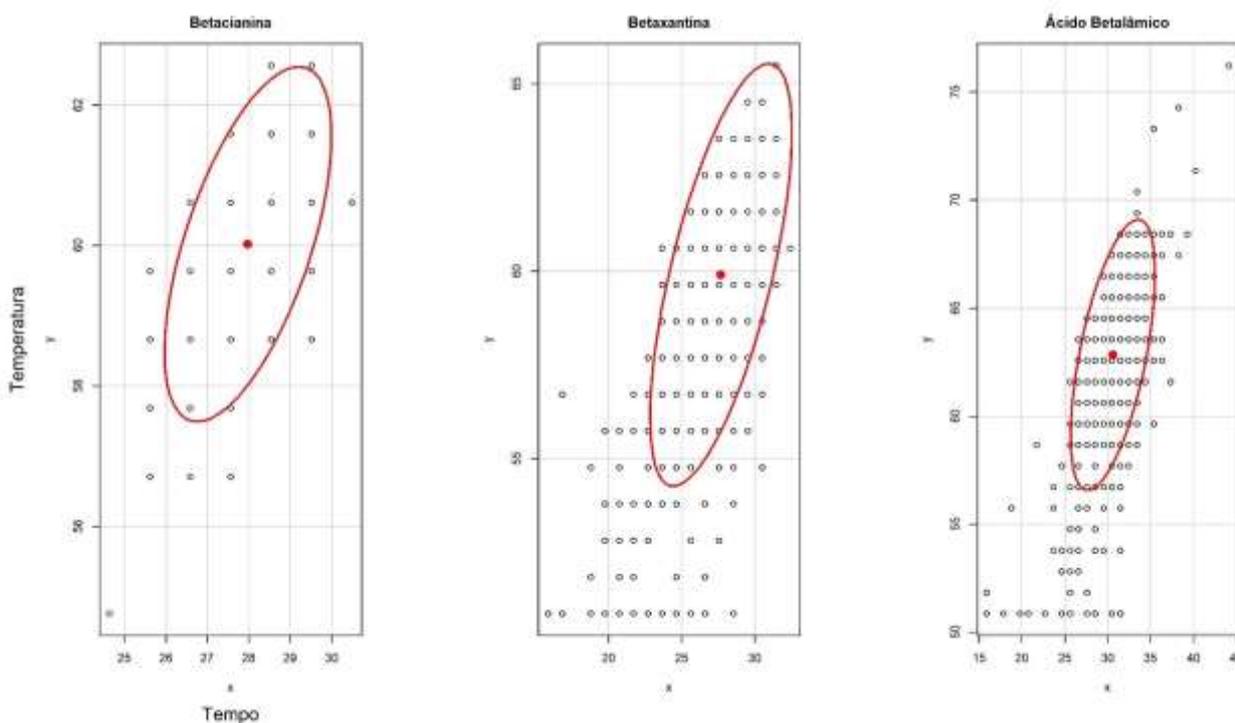


Figura 4. Elipse de confiança (95%) para o ácido betalâmico, pelas condições de extração Tempo x Temperatura

Similar codificação foi utilizada na Figura 4 onde os eixos X e Y representam o tempo, variando de 20 a 40 minutos e temperatura, de 65 a 76°C.

Observando as três figuras, nota-se que o elipse de confiança está realmente presente próximo do ponto central, situando-se entre 20-30 minutos e 60-65°C para a betacianina, 20-30 minutos e 55-65°C para a betaxantina, e 20-35 minutos e 60-70°C para o ácido betalâmico.

4. Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos, foi possível afirmar que o modelo proposto pode representar os três compostos analisados pois, a partir do teste de normalidade, pode-se afirmar que os resíduos são provenientes de uma distribuição normal. Foi feito um estudo de máxima inclinação ascendente apenas para a betacianina, pois é o composto presente em maior quantidade, e com isso, foi possível obter um coeficiente de determinação ($R^2 > 0,942$) e falta de ajuste não significativa, diferindo assim dos outros compostos. Para tal, o melhor rendimento (88,422 mg/100g) foi observado nas condições de 30 minutos e 65°C, e o ponto de estacionaridade foi encontrado por aproximadamente um tempo de 28 minutos e uma temperatura de 66°C, que é caracterizada próxima àquela obtida experimentalmente. Regiões de ótimo foram obtidas pelo método Bootstrap, situando-se entre 20-30 minutos e 60-65°C para betacianina, 20-30 minutos e 55-65°C para betaxantina e 20-35 minutos e 60-70°C para ácido betalâmico ácido.

REFERÊNCIAS

- BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836–845, 2007.
- BASTOS, E. L.; GONÇALVES, L. C. P. Microwave-Assisted Extraction of Betalains. **Water Extraction of Bioactive Compounds**, p. 245–268, 2017.
- CARDOSO-UGARTE, G. A. et al. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (Beta vulgaris). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 276–282, 2014.
- CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015.
- DAVISON, A. C.; HINKLEY, D. V. **Bootstrap Methods and their Application**. United States of America: Cambridge University Press 1997, 1997.
- DELGADO-ANDRADE, C. Editorial overview: Functional foods and nutrition. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. 1, p. 115–123, 2017.
- EFRON, B. Second Thoughts on the Bootstrap. **Statistical Science**, v. 18, n. 2, p. 135–140, 2003.
- KRAUS, A.; ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Sociodemographic Factors Differentiating the Consumer and the Motivations for Functional Food Consumption. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 36, n. 2, p. 116–126, 2017.
- KUSHWAHA, R. et al. Optimization of Different Variable for Eco-friendly Extraction of Betalains and Phytochemicals from Beetroot Pomace. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.
- MARAN, J. P.; PRIYA, B. Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 792–799, 2016.
- MEREDDY, R. et al. Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (Beta vulgaris L.) using membrane separation technology. **Food Chemistry**, v. 215, p. 311–317, 2017.
- MISHRA, D. K.; DOLAN, K. D.; YANG, L. BOOTSTRAP CONFIDENCE INTERVALS FOR THE KINETIC PARAMETERS OF DEGRADATION OF ANTHOCYANINS IN GRAPE POMACE. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 517, p. 1220–1233, 2011.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 1976.

NGAMWONGLUMLERT, L.; DEVAHASTIN, S.; CHIEWCHAN, N. Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3243–3259, 2017.

PRAKASH MARAN, J. et al. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1145–S1157, 2017.

RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 670–675, 2013.

STINTZING, F. C. et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 442–451, 2005.

SWAMY, G. J.; SANGAMITHRA, A.; CHANDRASEKAR, V. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 64–74, 2014a.

SWAMY, G. J.; SANGAMITHRA, A.; CHANDRASEKAR, V. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 64–74, 2014b.

YOLMEH, M.; HABIBI NAJAFI, M. B.; FARHOOSH, R. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 155, p. 319–324, 2014.