

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**EM ALIMENTOS**

Bruna Nichelle Lucas

**EXTRAÇÃO SEM SOLVENTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**  
**DE MIRTILO ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

**Santa Maria, RS**

**2018**

**Bruna Nichelle Lucas**

**EXTRAÇÃO SEM SOLVENTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO  
ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia em Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Co-orientador: Prof. Dr. Roger Wagner

Santa Maria, RS

2018

Lucas, Bruna Nichelle  
Extração sem solvente de compostos bioativos de  
mirtilo assistida por ultrassom / Bruna Nichelle Lucas.-  
2018.  
64 p. ; 30 cm

Orientador: Juliano Smanioto Barin  
Coorientador: Roger Wagner  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. Ultrassom 2. Química verde 3. Extração sem solvente  
4. Compostos bioativos 5. Mirtilo I. Smanioto Barin,  
Juliano II. Wagner, Roger III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da unsm. dados fornecidos pelo  
autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca  
central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt watta csa 10/1728.

Bruna Nichelle Lucas

## EXTRAÇÃO SEM SOLVENTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILLO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia em Alimentos**.

Aprovado em 02 de março de 2018:



Juliano Semáncio Barin, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)



Milene Teixeira Barcia, Dr (UFSM)



Bruna Tischer, Dr (UFRGS)

Santa Maria, RS

2018

## **Agradecimentos**

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA) e ao Núcleo de Tecnologia dos Alimentos (NTA), pelo aprendizado e a oportunidade da realização do mestrado.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e ao incentivo a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin, pela orientação do trabalho, pela oportunidade, confiança, amizade, por proporcionar conhecimento e oportunidades para o crescimento profissional.

Ao Prof. Roger Wagner, co-orientador, pela disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso, pela contribuição nas atividades de mestrado e amizade.

As Profas. Dras. Bruna Tischer e Milene Teixeira Barcia, pela participação na banca examinadora e pelas contribuições feitas para aprimoramento do trabalho.

Ao Laboratório de química analítica (LAQUIA), em Especial ao Prof. Dr. César Augusto Bizzi e Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello, pela disponibilidade nas análises do TOF e pelo empréstimo do ultrassom e as meninas que ajudaram muito Gabrielle, Sindy, Morgana e Mariele.

As colegas do NTA pela amizade, colaboração e apoio. Em especial as colegas de grupo Alessandra, Daniele, Flávia, Keiti, Mônica e Sandra, pela amizade, companheirismo, apoio, motivação e pela ajuda em todos os momentos.

As amigas e colegas de aula Caroline e Greice, por sempre estarem presentes nessa trajetória, pela amizade e pela ajuda.

A toda minha família, vó, tias e primas pelo apoio e reconhecimento.

Ao meu melhor amigo, companheiro de vida e noivo Augusto B. de Castro, por sempre estar presente, por todo amor, carinho, companheirismo, amizade, lealdade, compreensão, pela paciência, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis desta trajetória e por alegrar todos os meus dias. Te amo para todo o sempre.

Aos meus pais Gilson e Carina, por todo o incentivo, preocupação, pelos ensinamentos que sempre me proporcionaram e me proporcionam, pelo amor, carinho, compreensão e por proporcionarem condições de ter os melhores estudos. Vocês sempre serão a minha base, o meu suporte, para alcançar meus sonhos e objetivos. Obrigada por tudo, amo vocês.

A minha irmã Isadora, pela amizade, carinho, paciência, por me ouvir, por todo apoio, incentivo e por torcer para meu crescimento. Te amo.

A todos que de alguma forma contribuíram e ajudaram para execução deste trabalho.

A deus por me guiar, proteger e iluminar o meu caminho.

**Muito obrigada!**

**RESUMO**  
**EXTRAÇÃO SEM SOLVENTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO**  
**ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Autora: Bruna Nichelle Lucas

Orientador: Juliano Smanioto Barin

As técnicas convencionais de extração de compostos bioativos de frutas empregam longos períodos de extração e elevado consumo de solventes tóxicos. No entanto, há interesse crescente na obtenção de extratos mais seguros, menos tóxicos e que sejam amigáveis ao meio ambiente. A extração assistida por ultrassom é uma técnica inovadora na área da química verde, a qual visa obtenção de extratos ativos e não oferece riscos a natureza e ao operador, sendo uma técnica de extração simples, rápida, e reprodutível de extração. Desta forma, o presente trabalho visa avaliar o efeito da extração assistida por ultrassom sem uso de qualquer solvente na obtenção de compostos fenólicos totais de mirtilo. Para tanto, o processo foi otimizado através da metodologia de superfície resposta, avaliando tempo, peso de amostra e amplitude, afim de obter as melhores condições de extração. Com base na metodologia de resposta, as melhores condições encontradas foram 15 g de amostra por um tempo de extração de 7 min e com amplitude do equipamento de 50%, resultando em um valor de fenólicos totais de  $197,58 \pm 0,63$  mg de GAE.100g<sup>-1</sup>. Além disso, o método proposto foi comparado com o método de extração por micro-ondas hidrodifusão por gravidade (MHG), convencional (sem uso de solvente) e extração assistida por ultrassom com banho refrigerado, nos parâmetros de teor de fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais, capacidade antioxidante e composição fenólica. A extração assistida por ultrassom sem solvente apresentou maiores rendimentos (no geral cerca de 63%) em comparação aos outros métodos sem solvente, mostrando-se um método de extração inovador, eficiente e amigável ao meio ambiente.

**Palavras chaves:** ultrassom, química verde, extração sem solvente, compostos bioativos, mirtilo.

## ABSTRACT

### SOLVENT-FREE EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF ULTRASOUND ASSISTED BLUEBERRY

Author: Bruna Nichelle Lucas

Advisor: Juliano Smanioto Barin

Conventional techniques for extracting bioactive fruit compounds employ long periods of extraction and high consumption of toxic solvents. However, there is growing interest in extracting safer, less toxic and environmentally friendly extracts. Ultrasonic assisted extraction is an innovative technique in the field of green chemistry, which seeks to obtain active extracts and offers no risks to nature and the operator, being a simple, fast and reproducible extraction technique. Thus, the present work aims to evaluate the effect of ultrasonic assisted extraction without using any solvent to obtain total phenolic compounds of blueberry. For that, the process was optimized through the surface response methodology, evaluating time, sample weight and amplitude, in order to obtain the best extraction conditions. Based on the response methodology, the best conditions found were 15 g of sample for a time of extraction of 7 min and with amplitude of the equipment of 50%, resulting in a total phenolic value of  $197.58 \pm 0.63$  mg of GAE.100g<sup>-1</sup>. In addition, the proposed method was compared with the microwave extraction method (MHG), conventional (without solvent use) and ultrasonic assisted extraction with refrigerated bath, in the parameters of total phenolic content, monomeric anthocyanins antioxidant capacity and phenolic composition. Ultrasound-assisted extraction without solvent showed higher yields (generally about 63%) compared to other solvent-free methods, showing an innovative, efficient and environmentally friendly extraction method.

**Keywords:** ultrasound, green chemistry, solvent-free extraction, bioactive compounds, blueberry.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1 MIRTILO .....	14
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	15
<b>3.2.1 Antocianinas</b> .....	17
3.4 QUÍMICA VERDE E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS .....	19
<b>3.4.1 Micro-ondas</b> .....	21
<b>3.4.2 Ultrassom</b> .....	23
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	59
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

O mirtilo, conhecido do inglês como *blueberry*, é uma espécie nativa do hemisfério norte e uma das frutas mais populares na Europa. Esse fruto é fonte de compostos bioativos com elevada atividade antioxidante, que é relatada, frequentemente, como maior em comparação com outras frutas (p. ex., morango, framboesa e amora) e outros vegetais. O grande interesse pelo mirtilo se deve ao seu elevado teor de compostos fenólicos, que são considerados metabólitos secundários de plantas, popularmente conhecidos por seus benefícios para saúde e redução dos riscos de certas doenças. Assim, diversas atividades benéficas têm sido relatadas, como anti-inflamatórias (COBAN et al., 2015), antioxidantes (HUANG et al., 2012; CASTREJON et al., 2008), efeito em diabetes (LIU et al., 2015), antihipertensivas (RODRIGO et al., 2012), antimicrobianas (DAGLIA, 2012) e anticancerígenas (PALLER et al., 2013; WANG & STONER, 2008). Entre os principais compostos bioativos presentes no mirtilo, encontram-se os flavonóides, antocianinas e polifenóis, tais como ácido clorogênico, quercetina, caempferol, miricetina, catequina, epicatequina e ácidos hidroxicinâmicos (HWANG et al., 2014).

Nos últimos anos, a procura por alimentos funcionais tem sido impulsionada, principalmente, pela crescente preferência dos consumidores por alimentos naturais (CHEMAT et al., 2017; CHEMAT, VIAN, & CRAVOTTO, 2012). Contudo, o consumo de frutas *in natura* ou de produtos elaborados com as mesmas é limitado, pois há restrição com relação ao período de colheita e armazenamento. Desta forma, o fornecimento contínuo de produtos que possam conter os compostos bioativos do mirtilo fica limitado e muitas vezes o fruto precisa ser processado para assegurar sua utilização por maior período. Nesse sentido, o processo de extração pode ser utilizado de forma a obter os compostos bioativos de interesse separados dos demais componentes do fruto. Assim, um extrato rico em compostos bioativos pode ser obtido, sendo facilmente processado e armazenado. Cabe ressaltar que, desta forma, é possível se obter estes compostos até mesmo de resíduos de frutas, que podem ser processados para tanto.

Atualmente, os processos para recuperação destes compostos valiosos são efetuados através de procedimentos tradicionais de extração, tais como Soxhlet, maceração e agitação com solventes, que empregam longos períodos de extração,

além do uso de solventes orgânicos que devem ser recuperados ao final do processo (BARBA et al. 2016). Nesse sentido, o interesse na obtenção de extratos mais naturais e sustentáveis aumentou, impulsionado pela crescente demanda dos consumidores por ingredientes naturais obtidos sem produtos químicos tóxicos e que não provoquem riscos ambientais, sendo uma oportunidade para o desenvolvimento de tecnologias amigáveis ao meio ambiente (TIWARI, 2015).

Desta forma, as tendências recentes nas técnicas de extração levam em consideração a obtenção de compostos bioativos de materiais vegetais com o uso de solventes alternativos, água ou mesmo nenhum solvente. A “extração verde” de produtos naturais, baseia-se na descoberta e planejamento de processos de extração que reduzam o consumo de energia e que permitam o uso de solventes alternativos vindos de fontes naturais renováveis (CHEMAT, VIAN & CRAVOTTO, 2012). Desta forma, os extratos podem ser obtidos de forma a reduzir, ou mesmo eliminar, os problemas desde o início do processo de extração. O conceito de química verde é fundamental para sustentabilidade, minimizando os impactos ambientais e garantindo recursos disponíveis para as futuras gerações (ANASTAS, 2000).

Dentre as diversas alternativas inovadoras para “extração verde” de compostos bioativos, as principais tecnologias emergentes são a extração assistida por ultrassom (CHEMAT et al., 2017), extração com fluido supercrítico (SILVA ET AL., 2016), extração assistida por micro-ondas, extração por líquido pressurizado (MUSTAFA & TURNER, 2011) e campo elétrico pulsado (SOLIVA-FORTUNYA et al., 2009). A extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *ultrasound-assisted extraction*) pode ser considerada uma extração limpa, ecológica e com várias vantagens, como maior penetração de solvente no material celular, menor tempo de processamento, maior rendimento e reprodutibilidade, baixo consumo de solvente, alta capacidade de processamento e menor consumo de energia. Além disso, o equipamento para aplicação do ultrassom é relativamente fácil de usar, versátil e requer baixo investimento em comparação com as outras técnicas de extração (SHIRSATH, SONAWANE & GOGATE, 2012). Desta forma, o ultrassom pode ser considerado uma tecnologia de extração verde e limpa de moléculas e biomateriais, incluindo óleos essenciais, compostos fenólicos, antocianinas e produtos químicos finos (p. ex., corantes e pigmentos) (TIWARI, 2015).

Atualmente, há diversas pesquisas sobre a extração assistida por ultrassom que buscam reduzir o uso de solventes e ainda obter um maior rendimento de compostos bioativos, através de otimizações para avaliar o tipo e volume de solvente, de forma a extrair uma maior quantidade de compostos de interesse em um menor volume de solventes cada vez menos tóxicos. Em todos esses processos, o efeito do tempo de extração com ultrassom foi avaliado (JIANGA, YANG & SHI, 2017; D'ALESSANDRO et al. 2014; SOUZA et al. 2016; HANI et al. 2017; XU et al. 2017). Para extração assistida por ultrassom de mirtilo encontram-se autores como He et al. (2016) que investigaram o efeito da temperatura, tempo de sonicação e a relação sólido-líquido, para atingir os melhores rendimentos para compostos fenólicos e antocianinas, além de Machado et al. (2017), que avaliaram o efeito da extração assistida por ultrassom e também extração líquida pressurizada na recuperação de antocianinas de resíduos de *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* e *Eugenia brasiliensis*. Porém, ambos autores propuseram o uso de solventes orgânicos na extração assistida por ultrassom. Desta forma, no presente trabalho é proposta a extração de compostos bioativos de mirtilo assistida por ultrassom sem adição de qualquer solvente, aproveitando apenas a água presente *in situ* no próprio fruto. Cabe ressaltar que essa estratégia de sonicação direta do fruto sem adição de solvente não foi encontrada na literatura para outros frutos, o que reforça o ineditismo do estudo realizado.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Desenvolver método de extração verde de compostos bioativos do mirtilo, através da extração assistida por ultrassom sem solvente.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Avaliar as melhores condições de extração verde assistida por ultrassom para compostos fenólicos do mirtilo aplicando delineamento experimental;
- Obter extrato do mirtilo, determinar a quantidade de antocianinas monoméricas totais e compostos fenólicos totais e determinar capacidade antioxidante pelo método de ORAC;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato de mirtilo.
- Comparar o método proposto com outros métodos de extração verde, como extração convencional sem solvente (usando água do próprio fruto como solvente), extração por micro-ondas sem solvente e extração por ultrassom com banho refrigerado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MIRTILO

O mirtilo é conhecido como uma das frutas frescas mais antioxidantes já estudada devido ao alto teor de polifenóis da casca e da polpa. O fruto é originário do hemisfério norte e faz parte do gênero *Vaccinium* e da família *Ericaceae*, que pertence a um grupo das pequenas frutas, junto com os morangos, framboesas e amora que são amplamente usados nas indústrias alimentares para a fabricação de sucos e outros produtos (PAYNE, 2005; PRICE et al., 1995). Os frutos apresentam coloração azul intensa, recobertos de ceras e sua polpa tem sabor doce-ácido (SEVERO, et al., 2008). Se consumido fresco, o mirtilo apresenta inúmeras propriedades benéficas à saúde, que estão relacionadas aos compostos bioativos que auxiliam na prevenção de doenças como câncer, problemas cardiovasculares, catarata, degeneração muscular e disfunções da imunidade (PERTUZATTI, 2009; CONCENÇO et al., 2014).

O mirtilo (figura 1) é rico em compostos fenólicos, que são substâncias antioxidantes que auxiliam no combate aos radicais livres e na prevenção de doenças degenerativas, o que leva o fruto a ser conhecido como o “fruto da longevidade” (PAYNE, 2005). Além das antocianinas, o mirtilo apresenta, também, compostos fenólicos tais como o ácido clorogênico, quercetina, catequina e resveratrol. Estes compostos, juntamente com o ácido ascórbico, contribuem para a elevada atividade antioxidante observada (GIOVANELLI e BURATTI, 2008).

Figura 1 - Aspecto visual da fruta de mirtilo.



Fonte: (RUFATO & ANTUNES, 2016)

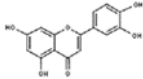
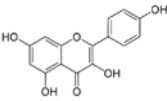
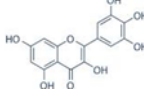
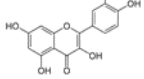
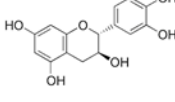

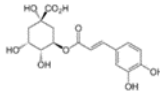
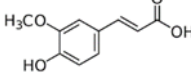
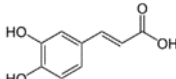
No Brasil, a produção de mirtilos ainda é muito pequena, pois é uma fruta pouco conhecida, devido ao seu custo elevado para consumo. As primeiras cultivares foram introduzidas em 1983 pela EMBRAPA clima temperado em Pelotas (RS) e, atualmente, as plantações estão localizadas principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Dentre as áreas cultivadas, cerca de 75% da produção do Brasil encontra-se no Rio Grande do Sul, na região de Vacaria, produzindo cerca de 6 a 10 toneladas por hectare (RUFATO & ANTUNES, 2016). Há perspectivas promissoras no cultivo de mirtilo no Brasil, tanto para consumo interno como para exportação, pois além da comercialização da fruta fresca, o processamento para incorporação em produtos alimentícios está em desenvolvimento crescente (MORAES et al., 2007).

### 3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes, sendo estruturas variáveis, caracterizando-se como compostos multifuncionais. Estes são considerados metabólitos secundários de plantas, produzidos através dos mecanismos de defesa em condições de estresse, tais como ferimentos, infecções, luz ultravioleta ou mesmo incidência solar excessiva (ANGELO & JORGE, 2007; COSTA et al., 2015). Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998). As principais fontes destes compostos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas como mirtilo, uva, ameixa, amora entre outras (PIMENTEL, FRANCKI & GOLLUCKE, 2005).

Existem em geral, cerca de 8000 compostos fenólicos identificados, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, tocoferóis e antocianinas (MUCHUWETI et al., 2007). A tabela 1 mostra a estrutura de alguns compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais. Além da contribuição para as propriedades sensoriais como cor, odor, sabor amargo ou adstringência, os compostos fenólicos também contribuem para a estabilidade oxidativa dos alimentos, além de apresentarem diversas funções biológicas e fisiológicas benéficas para a saúde humana (MUCHUWETI et al., 2007; COSTA et al., 2015).

Tabela 1 - Estruturas químicas de alguns compostos fenólicos de diferentes grupos comumente encontrados em frutas e vegetais.

Fenólicos	Grupo de Fenólicos	Estrutura Química
Luteolina	Flavonoíde	
Caempferol	Flavonoíde	
Miricetina	Flavonoíde	
Quercetina	Flavonoíde	
Catequina	Flavonoíde	
Ácido gálico	Ácido fenólico	
Ácido clorogênico	Ácido fenólico	
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	
Ácido cafeico	Ácido fenólico	

Fonte: Adaptado (ChemID Advanced Database, 2015).

Essa classe de compostos se destaca pela elevada atividade antioxidante, a qual apresenta papel fundamental na redução da oxidação lipídica em tecido vegetal e animal, resultando no aumento da qualidade nos alimentos (COSTA et al., 2015). Este mecanismo de ação antioxidante ocorre através da interrupção de radicais livres, ou seja, os fenóis atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e extintores de oxigênio singlete (RAMARATHANAM, OSAWA & OCHI, 1995). Apesar das vantagens relacionadas aos compostos fenólicos, esses compostos são altamente sensíveis a vários fatores ambientais, como luz e calor (PARISI, POUCCI, RESTUCCIA, IEMMA & PICCI, 2014).

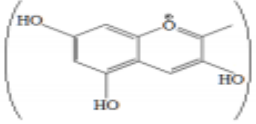
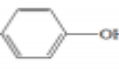
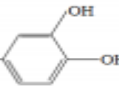
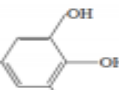
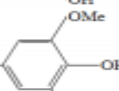
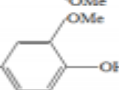
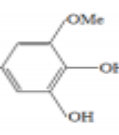


### 3.2.1 ANTOCIANINAS

As antocianinas podem ser classificadas como um dos maiores grupos de pigmentos solúveis em água e, juntamente com a clorofila, podem ser consideradas como um dos mais importantes grupos de pigmentos de origem vegetal (LOPES et al., 2007). O termo antocianina é de origem grega (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro), criado por Marquart em 1853 para referir-se aos pigmentos azuis das flores (BROUILLARD, 1982 apud MARÇO & POPPI, 2008). As antocianinas são agentes naturais que desempenham diversas funções nas plantas como ação antioxidante, proteção contra a luz e defesa. Quando adicionada aos alimentos, confere coloração e previne a oxidação de lipídeos em sistemas biológicos (LOPES et al., 2007).

Atualmente já foram encontradas mais de 635 antocianinas, sendo que algumas estão presentes em diversos alimentos como a cianidina, delphinidina, perlagonidina, peonidina, petunidina e malvidina (tabela 2), que são as responsáveis por inúmeras tonalidades de cores encontradas em flores, frutas e folhas (ANDERSEN & JORDHEIN, 2008; KONG et al. 2003). As diferenças entre as inúmeras antocianinas estão relacionadas ao número de grupos hidroxílicos nas moléculas, grau de metilação destes compostos, natureza e número de açúcares ligados à molécula e posição dessas ligações (VILLIERS et al., 2009; OREN-SHAMIR, 2009)

Tabela 2 - Antocianinas comumente encontradas nos alimentos

Estrutura do cátion flavílio	Estrutura do anel B	Nome	Glicosídeo encontrado em:
		Pelargonidina	Morango, amora vermelha e bananeira
		Cianidina	Jaboticaba, figo, cereja, uva, cacau, ameixa, jabolão, amora
		Delphinidina	Berinjela, romã e maracujá
		Malvidina	Uva, feijão
		Peonidina	Uva, cereja
		Petunidina	Frutas diversas, petúnias

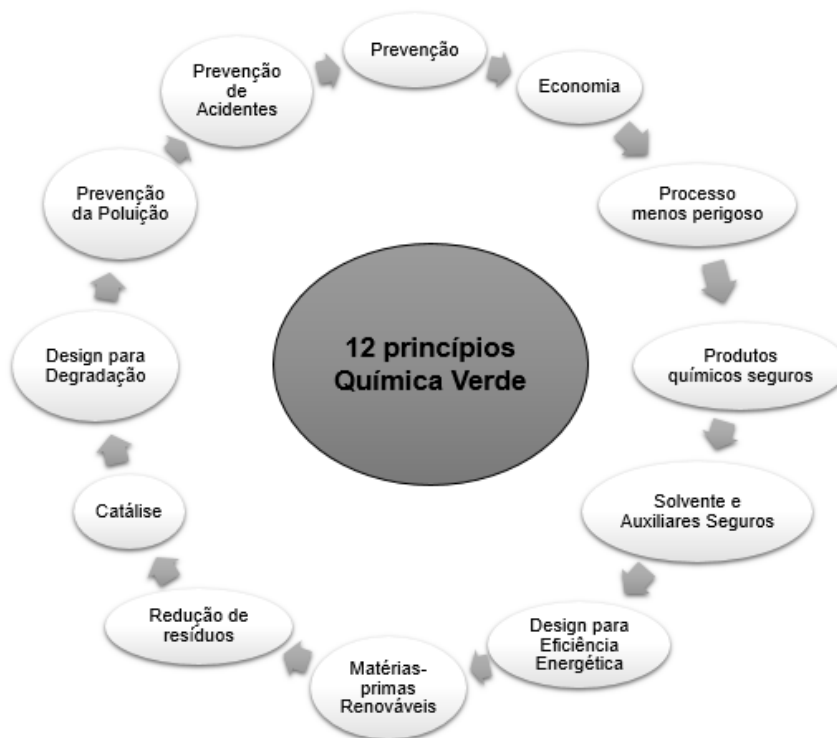
Fonte: (BOBBIO & BOBBIO, 1995 apud LOPES et al. 2007)

A estabilidade das antocianinas é afetada por diversos fatores devido a sua alta suscetibilidade à degradação em função do pH, temperatura, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solvente, presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos (REIN, 2005). Em soluções aquosas, as antocianinas apresentam diferentes estruturas em função do pH e normalmente são estáveis em pH entre 1,5 e 3. Em meio extremamente ácido (pH entre 1 e 2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílio ( $AH^+$ ). Para valores de pH entre 2 e 4, há predominância de bases quinoidais, que conferem a coloração azul. Com o aumento do pH, acima de 7, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores (HE & GIUSTI, 2010).

### 3.4 QUÍMICA VERDE E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O termo “química verde” está relacionado com “*design* de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” e representa uma tentativa de desenvolver métodos para gerenciar riscos químicos e ambientais (explosão, inflamabilidade e declínio na camada de ozônio) (LANCASTER, 2010; ANASTAS & WARNER, 1998). O conceito de química verde é fundamental para sustentabilidade, pois visa a redução dos impactos ambientais e a garantia da preservação dos recursos naturais para gerações futuras (WARNER, CANNON & DYE, 2004). Desta forma, a química verde vem fazendo com que os profissionais passem a desenvolver produtos e processos de uma forma mais eficiente para saúde humana e com menor risco ao meio ambiente (ANASTAS & EGHBALI, 2010). A química verde pode ser descrita através de seus 12 princípios (figura 1), descrito por Anastas e Warner, em 1998. Estes princípios consistem em minimizar a geração de resíduos, reduzir toxicidade de produtos, diminuir consumo de energia e aumentar o uso de produtos reciclados (LANCASTER, 2010).

Figura 1 - Esquema dos 12 princípios da química verde



Fonte: Adaptado (ANASTAS & WARNER, 1998).

As extrações de produtos naturais, atualmente, buscam enquadrar-se na química verde, através de extrações verdes, que podem ser definidas como: “extração verde baseia-se na descoberta e planejamento de processos de extração que reduzam o consumo de energia, permitam o uso de solventes alternativos vindos de produtos naturais renováveis de forma a garantir segurança e alta qualidade nos extratos” (CHEMAT, VIAN & CRAVOTTO, 2012). O grande interesse se encontra no desenvolvimento de métodos de extração mais sustentáveis e não tóxicos, impulsionados pela demanda de consumidores por alternativas mais verdes e ingredientes mais seguros (TIWARI, 2015).

Diversas alternativas inovadoras às técnicas convencionais foram propostas para extração de diversos compostos, como extração supercrítica de fluídos (SILVA ET AL., 2016), campo elétrico pulsado (TIWARI, 2015), extração assistida por ultrassom (CHEMAT et al. 2017) e extração assistida por micro-ondas (CHEMAT et al. 2015). São técnicas que apresentam elevado potencial para reduzir ou eliminar o uso de solventes tóxicos e, ao mesmo tempo, melhorar a eficiência dos processos e atingir maiores rendimentos de extração e qualidade dos extratos (TIWARI, 2015). Dentre as principais técnicas encontradas na literatura, destacam-se a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por micro-ondas. A extração por ultrassom, traz avanços atraentes do ponto de vista da química verde, pois em geral propicia melhores rendimentos, tempos de extrações reduzidos e a possibilidade de utilização da água como solvente (SILLANA, PHAM & SHRESTHA, 2011). A extração por micro-ondas também se enquadra na técnica de extração verde por apresentar um processamento rápido, podendo ser realizada até mesmo sem o uso de solventes (CHEMAT et al. 2015).

Tendo em vista a comparação dos resultados obtidos no trabalho com o uso de ultrassom com aqueles da extração assistida por micro-ondas sem solvente, segue uma breve revisão sobre esta última. Assim, os demais métodos não foram cobertos e maiores informações sobre fluido supercrítico, extração por líquido pressurizado e campo elétrico pulsado podem ser obtidas nas seguintes referências (SILVA ET AL., 2016; MUSTAFA & TURNER, 2011; SOLIVA-FORTUNYA et al., 2009).

### 3.4.1 Micro-ondas

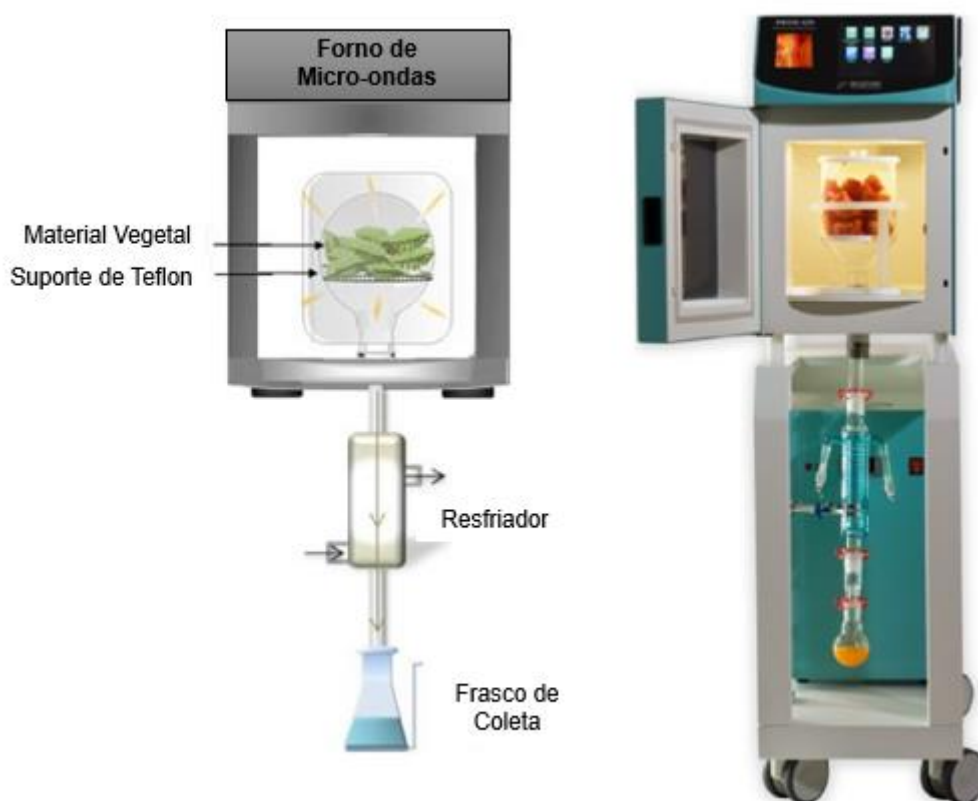
As micro-ondas são ondas eletromagnéticas não-ionizantes que são largamente utilizadas para o aquecimento de alimentos. Existem dois mecanismos principais envolvidos na transformação de energia eletromagnética em calor: rotação de dipolo e condução iônica. O mecanismo de aquecimento por condução iônica ocorre pela migração de íons que são orientados pelo campo eletromagnético. A resistência ao deslocamento desses íons origina perdas de energia que acabam aquecendo o meio (CHANDRASEKARAN, RAMANATHAN & BASAK, 2013). O outro mecanismo de aquecimento, a rotação de dipolo, se dá através do alinhamento das moléculas com o campo elétrico aplicado (CHANDRASEKARAN, RAMANATHAN & BASAK, 2013). Quando o campo elétrico é removido, as moléculas voltam a ficar desorientadas e então a energia que foi absorvida para a orientação dos dipolos é dissipada na forma de calor, com o conseqüente aumento da temperatura. Na presença de água o aquecimento com micro-ondas é facilitado, devido à natureza dipolar da água. As micro-ondas aquecem, assim, sem contato com a amostra, promovem um aquecimento mais eficaz e seletivo, como também, aceleram a transferência de energia (CHEMAT et al. 2015).

A radiação micro-ondas tem capacidade de penetrar diretamente na amostra, devido a interação da radiação com sua fração polar. A extração assistida por micro-ondas livre de solvente está baseada simplesmente na interação da água *in situ* presente na amostra com a radiação micro-ondas. A absorção da energia pela água resulta no aumento da pressão no interior da célula e vaporização do líquido, o que resulta na ruptura da parede celular dos vegetais e aumento na porosidade capilar dos tecidos, assim como também rápida difusão dos compostos para o meio (LI et al., 2013; CHEMAT & CRAVOTTO, 2013).

A extração assistida com micro-ondas livre de solvente (SFME, do inglês *solvent-free microwave extraction*) é uma técnica sustentável e alcança, em grande parte, os objetivos da química verde. Um dos principais processos utilizados nesse sentido empregam a chamada extração por hidrodifusão e gravidade com micro-ondas (MHG, do inglês *microwave hydrodiffusion and gravity*). Este sistema proposto por Vian et al, 2008, é uma tecnologia inovadora que possui grande potencial para diversas aplicações, como extração de óleos essenciais, compostos fenólicos e pigmentos de materiais vegetais. Esta técnica consiste em colocar o material vegetal

dentro de um forno de micro-ondas, sem adição de nenhum solvente ou água. O aquecimento da água interna do material vegetal permite a destruição das células do material contendo os compostos bioativos. Várias substâncias, incluindo a água interna na planta, são liberadas e transferidas para fora do material vegetal (CHEMAT & LUCCHESI, 2008). Este fenômeno é conhecido por hidrodifusão, que permite que os compostos sejam liberados do material vegetal e deixem o reator através de um frasco perfurado. As substâncias voláteis são condensadas continuamente e recolhidos em um balão receptor posicionado abaixo do micro-ondas, representado na figura 2. (CHEMAT et al. 2015).

Figura 2 - Extração livre de solvente por micro-ondas e hidrodifusão por gravidade.



Fonte: Adaptado (CHEMAT et al., 2015).

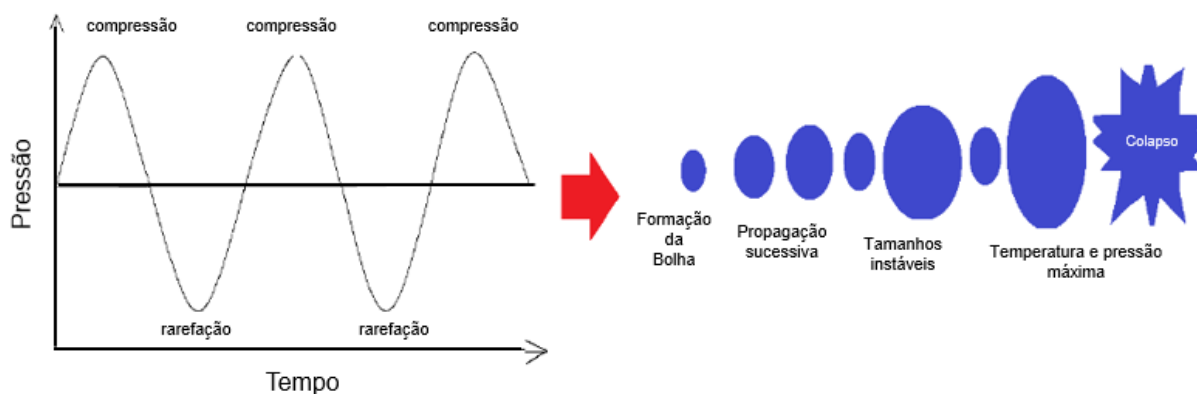
O uso de micro-ondas aumenta a difusão dos metabólitos secundários, o rompimento dos tecidos e a permeabilidade celular. A extração por MHG tem como principal vantagem ser uma técnica amigável ao meio ambiente, pois pode ser realizada sem uso de solvente, apenas sob efeito da radiação micro-ondas e a gravidade da terra (CHEMAT, VIAN & FERNANDEZ, 2012). Na literatura os

trabalhos encontrados são voltados mais para a extração de óleos essenciais (VIAN, FERNANDEZ, VISINONI & CHEMAT, 2008; FARHAT et al. 2010; PÉRINO-ISSARTIER, GINIES, CRAVOTTO & CHEMAT, 2013; CHEN, HU, YAO & LIANG, 2016; BOUSBIA et al. 2009). Para extração de compostos bioativos não-voláteis por MHG, há trabalhos avaliando a recuperação de flavonoides de cebola, (ZILL-E-HUMA, VIAN, MAINGONMAT & CHEMAT, 2009) e extração de óleo essenciais e polifenóis de casca de laranja (BOUKROUFA et al. 2015). Ainda, a MHG tem sido usada como um método alternativo para processamento de suco de morango (TURK et al. 2017) e suco de ameixa (CENDRES et al. 2012), porém não foram encontrados trabalhos relacionado a extração por MHG de mirtilo.

### 3.4.2 Ultrassom

O ultrassom é uma onda mecânica, com frequência acima da audição humana (de 16 KHz a 1 MHz) e que necessita de um meio para se propagar (SORIA & VILLAMIEL, 2010). No processo de sonicação, ondas longitudinais são geradas no momento em que a onda sonora se choca com o meio líquido, criando regiões de compressão e rarefação com consequentes mudanças de pressão (PICÓ, 2013). Estas mudanças de pressão proporcionam a formação de cavidades no meio do líquido e bolhas de gás. As bolhas crescem até atingirem um ponto crítico (figura 3) em que se tornam instáveis e colapsam violentamente, liberando grande quantidade de energia (CHEMAT, ZILL-E-HUMA & KHAN, 2011).

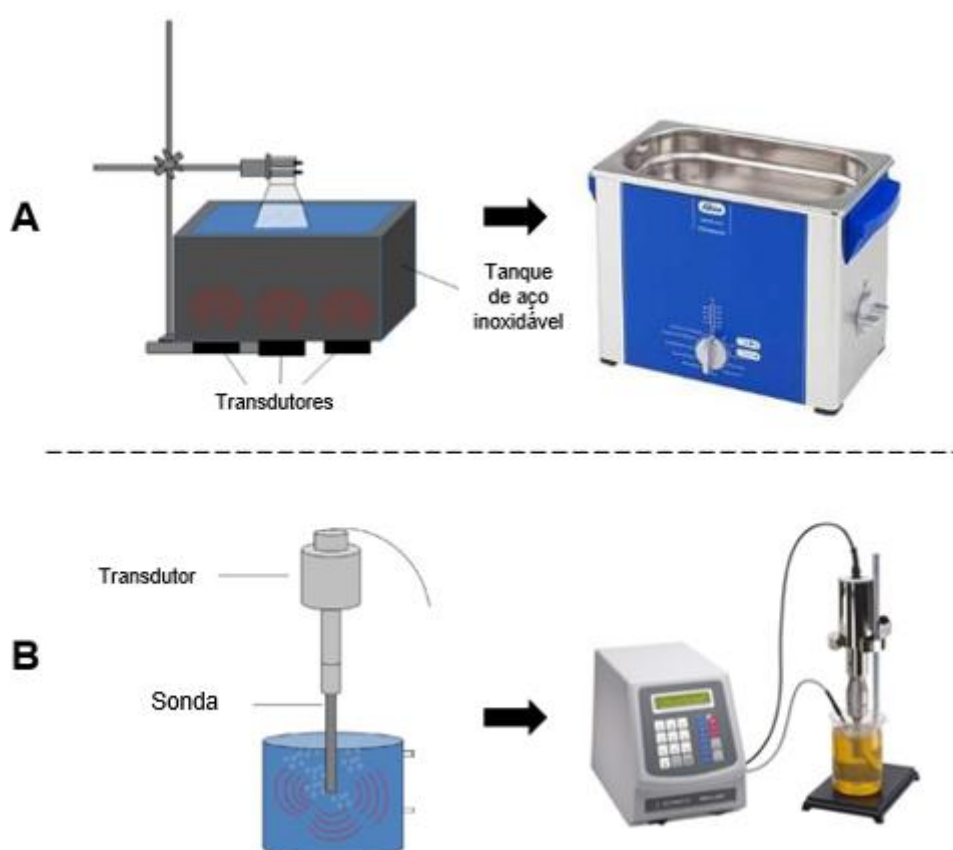
Figura 3 - Ilustração da mudança no tamanho e colapso das bolhas durante a aplicação do ultrassom.



Fonte: (TORRES et al. 2017).

A cavitação acústica é induzida em frequências baixas, devido à geração, crescimento e colapso das bolhas, proporcionando a liberação de uma grande quantidade de energia (ALZAMORA et al., 2011). Desta forma, a aplicação do ultrassom de baixa frequência (16 – 100 kHz) é utilizada para promover/induzir processos de extração, utilizando banhos ultrassônicos ou sondas de imersão (AWAD et al., 2012). Existem dois tipos principais de transdutores para aplicações ultrassônicas: piezoelétricos e magnetostritivos (figura 4). Ambos transdutores estão presentes em equipamentos comercialmente disponíveis para fins de extração e operam em várias frequências (FROST, 2012).

Figura 4 – Sistemas Ultrassônicos. (A) banho de ultrassom, (B) sonda de ultrassom.



Fonte: Adaptado (CHEMAT et al., 2017.)

Os banhos ultrassônicos transmitem ondas de som em um recipiente cheio de líquido (normalmente água) e funcionam geralmente com uma frequência única. Apresentam um arranjo em que os transdutores não entram em contato direto com a amostra, sendo a fonte mais disponível e barata de radiação ultrassônica. Já a sonda de imersão entra em contato direto com a amostra e proporciona uma

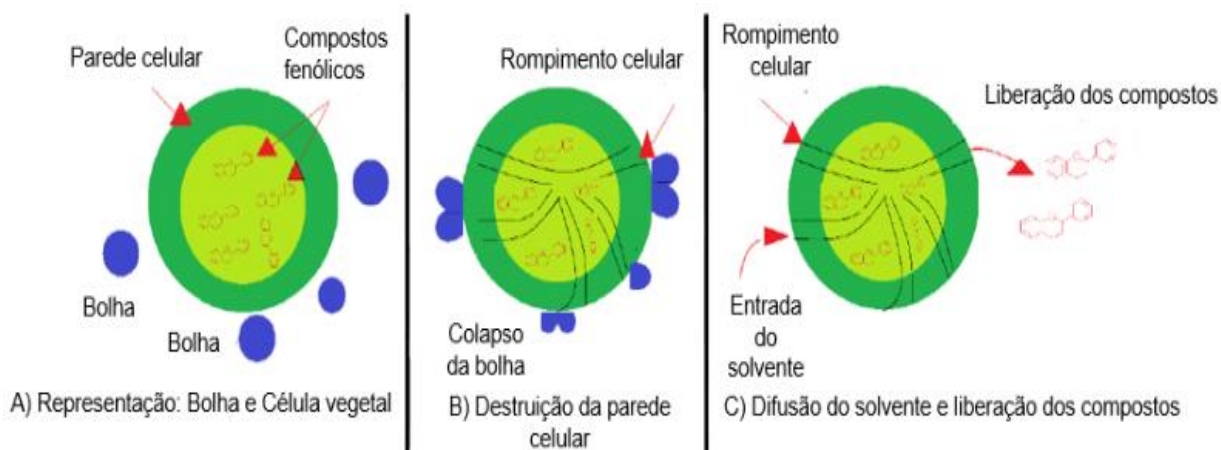


intensidade ultrassônica que é em geral cerca de 100 vezes maior do que fornecido pelos banhos (RAMADAN, SAMEOTO & EVOY, 2014). As sondas são poderosos sistemas para extração sólido-líquido, pois na presença de um solvente adequado, a eficiência de extração é aprimorada evitando perdas de energia (SANTOS & CAPELO, 2007).

### 3.4.2.1 Extração Assistida por Ultrassom

Durante a extração de compostos de origem vegetal por ultrassom, altas forças de cisalhamento são geradas oriundas da implosão de bolhas de cavitação na superfície dos vegetais (CHEMAT et al., 2017). O processo de extração por ultrassom melhora o contato sólido-líquido, devido ao fenômeno da cavitação acústica. Ao entrar em contato com o material vegetal, o solvente (água), sob aplicação do ultrassom, penetra no material vegetal. As forças de cisalhamento podem facilitar este processo e, ainda, pode colaborar para a destruição das estruturas celulares das plantas que contém os metabólitos de interesse, facilitando, assim, a liberação dos componentes para o solvente de extração (DAMYEH, NIAKOUSARI & SAHARKHIZ, 2016), como representado na figura 5.

Figura 5 - Gráfico que representa o colapso das bolhas de cavitação e liberação de metabólitos secundários (compostos fenólicos) do material vegetal em 3 etapas. (a) representação da célula vegetal e das bolhas de cavitação; (b) colapso das bolhas e ruptura da parede celular; (c) difusão do solvente e liberação dos compostos bioativos para o meio.



Fonte: Adaptado (TORRES et al. 2017).

A estrutura da célula vegetal é bombardeada por microjatos causados pela implosão de bolhas de cavitação próximas à interface sólido-líquido atingindo a superfície da célula, ocorrendo a introdução do solvente mais facilmente no interior das células do material vegetal, que resulta no intumescimento das células e, por conseguinte, aumenta a transferência de massa nos capilares (CARES et al., 2010). Desta forma, pode-se dizer que o efeito mecânico do ultrassom promove a liberação dos componentes das células por meio de perturbações, colisões de partículas e distorções nas paredes celulares, causando danos na parede celular, até sua ruptura. Esses efeitos melhoram a difusão e, logo, o processo de extração (BOTH et al., 2015; CHEMAT, ZILL-E-HUMA & KHAN, 2011).

Recentemente, alguns trabalhos na literatura foram publicados envolvendo a extração de compostos bioativos de frutas assistida por ultrassom (tabela 3). Foram investigadas a cinética de extração assistida por ultrassom de antocianinas e polifenóis do resíduo do bagaço de Arônia, no qual os autores avaliaram o tempo de extração, temperatura e composição do solvente (D'ALESSANDRO et al. 2014).

Tiwati et al. (2010) avaliaram o efeito da amplitude e tempo de extração em uma sonda com frequência fixa de 20 kHz com pulso de 5 s ligado e 5 s desligado na extração de antocianinas a partir de suco de uva vermelha. Como resultado, um elevado grau de preservação de antocianinas durante a sonicação foi observado, tornando a sonicação uma técnica capaz de promover a extração de compostos bioativos e assegurar a preservação dos mesmos no processamento de sucos de frutas. A extração de compostos fenólicos e antocianinas por ultrassom também foi avaliada por Rodrigues et al. (2015), os quais analisaram o efeito da concentração de solvente, do pH e do tempo na extração da casca de jabuticaba. As melhores condições experimentais obtidas, utilizando banho de ultrassom, foram com um tempo de extração de 10 min em uma solução de etanol 46% (v/v), acidificado em pH 1. A extração resultou em 4,8 mg. g<sup>-1</sup> de antocianinas monoméricas em casca seca e seus resultados mostraram que a extração pode ser realizada através de um processo simples. Esses autores obtiveram melhores rendimentos de extração pelo método de ultrassom e observaram os principais fatores que influenciaram na extração de compostos bioativos (fenólicos e antocianinas) foram tempo de extração, temperatura, solvente de extração e proporção amostra/solvente.

Em relação ao mirtilo, há publicações avaliando a extração assistida por ultrassom, utilizando sonda, na composição fenólica e teor de antocianinas de bagaço de mirtilo, por He et al. (2016). Neste trabalho, os autores avaliaram o efeito da temperatura, concentração de solvente e tempo de extração, através do emprego metodologia de superfície resposta e obtiveram como condições ótimas uma temperatura de extração de 61 °C, uma relação sólido-líquido de 21,7 mL.g<sup>-1</sup> e tempo de sonicação de 23,67 min, relatando um maior rendimento de compostos fenólicos e antocianinas em comparação ao método convencional. Otimização da extração de antocianinas de mirtilo por extração ultrasônicas por moagem de células utilizando superfície resposta foi analisada por Jiang, Yang & Shi, 2017, onde os autores avaliaram quatro variáveis, incluindo a relação solução e sólido, potência de extração, tempo de repouso e tempo de extração, as condições ótimas foram determinadas como sendo a proporção sólido de 25:1 mL.g<sup>-1</sup>, potência de extração de 1500 W, tempo de repouso foi de 3 s e tempo de extração de 40 min, o experimento obteve como rendimento 2,89 mg.g<sup>-1</sup> de antocianinas em relação a extração assistida com ultrassom convencional. Contudo, não há trabalhos de mirtilo que avaliaram o efeito da extração por ultrassom sem uso de solventes.

Tabela 3 - Trabalhos selecionados encontrados na literatura sobre a extração de compostos bioativos de frutas assistida por ultrassom.

Amostra	Proporção amostra/solvente	Solvente	Sistema	Frequência	Potência (W)	Tempo (min)	Referência
Arônia	7,5 g em 300 mL de solvente	0–50% metanol em água	Sonda	30,8 kHz	50–100	0–240	D'Alessandro et al. 2014
Casca de Jaboticaba	500 mg em 10 mL de solvente	3–46% etanol em água	Banho	25 kHz	150	6–73	Rodrigues et al. 2015
Mirtilo, cerejas	50 g de amostra na proporção 1:10	Metanol, Etanol e Acetona (60–80%) em água	Banho	30/40 kHz	185	20–60	Wang et al. 2016
Mirtilo	25:1 mL.g <sup>-1</sup>	Água	Sonda	20-25 kHz	1500	40	Jiang, Yang & Shi, 2017
Mirtilo, Vinho de bagaço	15-25 mL.g <sup>-1</sup>	70% etanol em água	Sonda	n.i	400	15–35	He et al. 2016
Suco Uva	80 mL de suco	n.i	Sonda	20 kHz	n.i	0–10	Tiwari et al. 2010

#### **4. DISCUSSÃO**

Neste item estão descritos, na forma de manuscrito, os experimentos que foram feitos com base no enfoque do trabalho, o qual consiste na otimização da extração assistida por ultrassom de mirtilo.

Manuscrito: **Extração sem solvente de compostos bioativos de mirtilo assistida por ultrassom**

1 **Extração sem solvente de compostos bioativos de mirtilo assistida**  
2 **por ultrassom**

3

4 (Manuscrito formatado para submissão ao periódico *Food Chemistry*)

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

## 26 **Resumo**

27 As técnicas convencionais de extração de compostos bioativos de frutas empregam  
28 longos períodos de extração e elevado consumo de solventes tóxicos. No entanto,  
29 há interesse crescente na obtenção de extratos mais seguros, menos tóxicos e que  
30 sejam amigáveis ao meio ambiente. A extração assistida por ultrassom é uma  
31 técnica inovadora na área da química verde, que visa obtenção de extratos ativos e  
32 sem oferecer riscos a natureza e ao operador, sendo uma técnica simples, rápida, e  
33 reproduzível de extração. Desta forma, o presente trabalho visa avaliar o efeito da  
34 extração assistida por ultrassom sem uso de qualquer solvente na obtenção de  
35 compostos fenólicos totais de mirtilo. Para tanto, o processo foi otimizado através da  
36 metodologia de superfície resposta, avaliando tempo, peso de amostra e amplitude,  
37 afim de obter as melhores condições de extração. Com base na metodologia de  
38 resposta, as melhores condições encontradas foram 15 g de amostra por um tempo  
39 de extração de 7 min e com amplitude do equipamento de 50%, resultando em um  
40 valor de fenólicos totais de  $197,58 \pm 0,63$  mg de GAE.100g<sup>-1</sup>. Além disso, o método  
41 proposto foi comparado com micro-ondas hidrodifusão por gravidade (MHG),  
42 convencional sem solvente e extração assistida por ultrassom com banho  
43 refrigerado, nos parâmetros de teor de fenólicos totais, antocianinas monoméricas  
44 totais, capacidade antioxidante e composição fenólica. A extração assistida por  
45 ultrassom sem solvente apresentou maiores rendimentos (no geral cerca de 63%)  
46 em comparação aos outros métodos sem solvente, mostrando-se um método de  
47 extração inovador, eficiente e amigável ao meio ambiente.

48 **Palavras chaves:** ultrassom, extração sem solvente, compostos fenólicos,  
49 antocianinas, capacidade antioxidante, mirtilo.

50



## 51 INTRODUÇÃO

52 O mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) é um fruto amplamente conhecido em todo o  
53 mundo, sendo uma espécie originária da América do Norte e da Europa (Rimando et  
54 al., 2004). O fruto tem grande interesse comercial, devido ao seu elevado teor de  
55 compostos fenólicos, os quais são considerados metabólitos secundários da planta.  
56 Estes compostos apresentam benefícios a saúde em termos de redução de certas  
57 doenças em virtude de sua atividade anti-inflamatória (Coban et al., 2015),  
58 antioxidante (Huang et al., 2012), anti-hipertensiva (Rodrigo et al., 2012),  
59 antimicrobiana (Wang & Stoner, 2008) e anticancerígena (Paller et al., 2013), assim  
60 como por melhorar os índices glicêmicos em pacientes portadores de diabetes.  
61 Dentre os compostos fenólicos que apresentam capacidade antioxidante no mirtilo,  
62 destacam-se o ácido clorogênico, ácido gálico, ácido caféico, quercetina,  
63 kaempferol, miricetina e catequina (Sciarappa, Wang & Camp, 2008).

64 O consumo de alimentos contendo ingredientes naturais vem crescendo, em  
65 grande parte, pela preferência dos consumidores por produtos que não façam uso  
66 de aditivos alimentares sintéticos e que apresentem propriedades funcionais  
67 (Chemat et al., 2017; Chemat, Vian, & Cravotto, 2012). Neste sentido, o mirtilo tem  
68 atraído a atenção em virtude da presença de elevada concentração de compostos  
69 fenólicos e o consequente efeito benéfico à saúde, além da possibilidade de atuar na  
70 preservação de alimentos frente à oxidação.

71 Atualmente, o processo de obtenção de compostos fenólicos é feito  
72 empregando-se técnicas convencionais de extração, tais como maceração com  
73 solventes orgânicos ou misturas destes com água. Contudo, o uso de solventes  
74 orgânicos pode impactar a qualidade dos extratos, uma vez que resíduos podem  
75 permanecer nos mesmos. Além disso, há a geração de resíduos do processo  
76 extrativo que devem ser tratados para correta disposição. Neste contexto, diversos  
77 estudos têm sido desenvolvidos visando a obtenção de compostos bioativos através  
78 de técnicas que minimizam o uso de solvente ou utilizem solventes menos tóxicos,  
79 as quais possibilitam a modernização de processos convencionais, tornando-os mais  
80 ecológicos, limpos e seguros (Chemat et al. 2015).

81 Recentemente, foram propostos métodos mais eficientes para extração  
82 compostos bioativos a partir de materiais vegetais, dentre os quais destacam-se a

83 extração assistida por ultrassom (Chemat et al., 2017), campo elétrico pulsado e  
84 micro-ondas (Mustafa & Turner, 2011). É importante mencionar que o emprego  
85 destes métodos inovadores permite a realização de extrações de forma muito  
86 eficiente, com menor tempo envolvido nas extrações, maior seletividade de extração  
87 dos compostos de interesse e diminuição dos custos operacionais envolvidos  
88 (Chemat et al. 2015).

89 A aplicação do ultrassom tem aumentado exponencialmente nas últimas  
90 décadas, devido a capacidade de melhorar a eficiência de extração em virtude da  
91 maior transferência de massa e por promover de forma mais fácil a ruptura da  
92 parede celular de materiais vegetais. Durante o processo de extração de compostos  
93 bioativos por ultrassom, altas forças de cisalhamento são geradas oriundas da  
94 implosão de bolhas de cavitação na superfície dos vegetais, ocasionando a  
95 destruição das estruturas celulares que contém os metabólitos de interesse,  
96 facilitando, assim, a liberação dos componentes para o solvente de extração  
97 (Chemat et al., 2017). Além disso, o ultrassom é uma técnica de extração limpa e  
98 ecológica, relativamente fácil de ser utilizada, versátil, flexível e normalmente requer  
99 baixo investimento (Tiwardi, 2015; Soria & Villamiel, 2010; Xu et al., 2017).

100 Na literatura foram encontrados trabalhos envolvendo a extração de  
101 compostos bioativos de frutas assistida por ultrassom como a cinética de extração  
102 assistida por ultrassom de antocianinas e polifenóis do resíduo do bagaço de Arônia  
103 (D'Alessandro et al. 2014) e a extração por ultrassom de antocianinas a partir de  
104 suco de uva vermelha (Tiwari et al. 2010). Ainda, pode-se destacar a extração de  
105 fenólicos e antocianinas de jabutibaca, que foi avaliada por Rodrigues et al. (2015).

106 Em relação ao mirtilo, há publicações avaliando a extração assistida por  
107 ultrassom de compostos fenólicos e antocianinas de bagaço de mirtilo, como  
108 estudado por He et al. (2016). Neste trabalho, os autores avaliaram o efeito da  
109 temperatura, concentração de solvente e tempo de extração, através do emprego  
110 metodologia de superfície resposta. A otimização da extração de antocianinas de  
111 mirtilo por foi analisada por Jiang, Yang & Shi (2017), onde os autores avaliaram  
112 quatro variáveis, incluindo a relação solução e sólido, potência de extração, tempo  
113 de repouso e tempo de extração. Esses autores obtiveram melhores rendimentos de  
114 extração pelo método de ultrassom e observaram que os principais fatores que

115 influenciaram na extração de compostos bioativos (fenólicos e antocianinas) foram  
116 tempo de extração, temperatura, solvente de extração e proporção  
117 amostra/solvente.

118 Considerando o grande potencial biológico de extratos do mirtilo e a carência  
119 de trabalhos relacionados ao desenvolvimento e uso de métodos de extração isenta  
120 de qualquer tipo de solvente, o presente trabalho teve por objetivo propor uma nova  
121 metodologia para extração de compostos fenólicos de mirtilo. Para tanto, foi feita a  
122 avaliação de alguns parâmetros importantes durante a extração assistida por  
123 ultrassom, tais como peso, tempo e amplitude empregando a metodologia de  
124 superfície resposta com o intuito de obter o maior rendimento de compostos  
125 fenólicos totais. Além disso, o teor de fenólicos totais, antocianinas monoméricas  
126 totais e capacidade antioxidante (ORAC) da extração assistida por ultrassom sem  
127 solvente foram comparadas com método convencional, assim como a extração livre  
128 de solvente por micro-ondas e hidrodifusão por gravidade (MHG, do inglês  
129 *microwave hydrodiffusion and gravity*) e extração assistida por ultrassom sem  
130 solvente com refrigeração. Os compostos fenólicos provenientes dos extratos  
131 obtidos nas condições otimizadas e pelos métodos de comparação foram  
132 identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência UPLCq-Tof  
133 MS/MS.

134

135

## 136 MATERIAL E MÉTODOS

### 137 Amostra e Reagentes

138 Amostras de mirtilo foram adquiridas *in natura* no mês de setembro de 2017  
139 em mercado local da cidade de Santa Maria, RS, as quais foram mantidas sob  
140 refrigeração ( $5 \pm 2^\circ \text{C}$ ) até o momento das extrações. Após as extrações, os  
141 produtos obtidos foram filtrados e armazenados em freezer ( $-18 \pm 1^\circ \text{C}$ ) para posterior  
142 análise.

143 Água destilada foi utilizada para aferição do volume dos extratos. Para a  
144 análise de capacidade antioxidante pelo método de capacidade de absorção do  
145 radical oxigênio (ORAC, do inglês *oxygen radical absorbance capacity*), foi utilizado  
146 metanol (Vetec, Brasil), fluoresceína sódica (Synth, Brasil), gerador de radical  
147 peroxila (2,2'-azobis-2-metil-amidinopropano dihidroclorato, AAPH, Sigma-Aldrich,  
148 EUA), antioxidante padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido  
149 carboxílico 97%, Trolox, Sigma-Aldrich, EUA) e Tampão fosfato em pH 7,4,  
150 utilizando fosfato de potássio monobásico anidro e fosfato de potássio dibásico  
151 anidro. Para as demais análises foi utilizado carbonato de Sódio (Impex, Brasil) e  
152 reagente Folin Ciocauteau (Alphatec, EUA), foram usados para determinação da  
153 concentração de compostos fenólicos totais. Cloreto de potássio (Vetec, Brasil) e  
154 acetato de sódio (Synth, Brasil) foram utilizados para análise de antocianinas  
155 monoméricas totais. Para identificação e quantificação durante a análise dos  
156 compostos fenólicos, foram utilizados padrões de rutina, catequina, ácido gálico,  
157 ácido clorogênico, quercetina e kaempferol (pureza de aproximadamente 97%,  
158 Sigma-Aldrich, EUA), os quais foram diluídos em metanol contendo ácido fórmico  
159 (Sigma-Aldrich, EUA).

160

### 161 Equipamentos

162 Para obtenção de extratos do mirtilo foi utilizado um equipamento de  
163 ultrassom com frequência de 20 kHz e potência máxima de 750 W (Modelo VCX  
164 750, Sonics & Materials, USA) com sonda de 13 mm. A extração por MHG (Modelo  
165 NEOS-GR, Milestone, Itália) foi feita utilizando frequência de 2450 MHz e potência  
166 máxima de 1600 W, acoplado a um banho ultratermostático (SL 152/10, Solab,

167 Brasil) para resfriamento do sistema durante a extração. A extração dos compostos  
168 fenólicos pelo método convencional foi feita empregando um agitador magnético  
169 com aquecimento (Thelga, Brasil). Para determinação de compostos fenólicos totais  
170 foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis (modelo 8453, Agilent Technologies, EUA). A  
171 identificação e quantificação dos compostos fenólicos presente nos extratos foi feita  
172 através de um cromatógrafo líquido (Acquity UPLC) e espectrômetro de massa com  
173 tempo de voo (modelo XEVO G2 Q-TOF, Waters, EUA), filtro 0,20 µm (cromafil,  
174 Macherey-Nagel, Alemanha), e coluna C-18E (Phenomenex, EUA). A análise da  
175 capacidade antioxidante dos extratos foi realizada em leitor de microplacas  
176 SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Água ultrapurificada usando  
177 Milli-Q (Beadford, MA, USA) foi usada para diluição das amostras para análise  
178 cromatográfica.

179

## 180 **Delineamento Experimental**

181 Metodologia de superfície de resposta

182 A metodologia de superfície de resposta (RSM) com *design* de composto  
183 central foi conduzida de forma a obter o máximo teor de compostos fenólicos totais  
184 no extrato de mirtilo obtido por extração assistida por ultrassom sem solvente. Foram  
185 selecionadas as seguintes variáveis independentes: peso de amostra (X1, g), tempo  
186 de extração (X2, min) e amplitude de ultrassom (X3, %). As variáveis independentes  
187 e seu códigos e níveis são exibidos na tabela 1, sendo que a matriz do projeto  
188 rotativo de composto central para 3 variáveis envolve 19 modelos de experimentos  
189 (Tabela 2). Foram utilizadas 5 repetições para avaliar o erro puro. A variação da  
190 quantidade de compostos fenólicos totais (y) versus as três variáveis X1, X2 e X3,  
191 foram exibidas usando um modelo polinomial de segunda ordem dado pela seguinte  
192 equação:

193

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

194

**Equação 3.**

195 onde  $y$  é o valor previsto;  $\beta_0$  é uma constante;  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes de  
 196 regressão linear, quadrática e interativa do modelo, respectivamente  $X_i$  e  $X_j$  são as  
 197 variáveis independentes.

198 Com base na análise de variância (ANOVA, do inglês *analysis of variance*),  
 199 foram determinados os coeficientes de regressão dos termos individuais, lineares,  
 200 de interação e quadráticos. A análise de regressão e as tramas de superfície  
 201 resposta foram planejadas para determinar as condições ideais para a quantidade  
 202 de compostos fenólicos totais (TPC).

203 **Tabela 1:** Variáveis independentes do processo de extração por ultrassom

Variables	Units	Symbol	Levels of codes				
			$\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
Weight	g	$x_1$	5	15	30	45	55
Time	min	$x_2$	2	3	5	7	8
Ampleness	%	$x_3$	23	30	40	50	57

204

205 **Tabela 2.** Desenho experimental para avaliar as variáveis do ultrassom na extração  
 206 de compostos fenólicos de mirtilo.

Run	Independent variables			Response	
	Weight (g)	Time (min)	Ampleness (%)	TCP (mg 100g <sup>-1</sup> )	Power (W)
1	15	3	30	50	83
2	15	3	50	95	84
3	15	7	30	157	38
4	15	7	50	197	40
5	45	3	30	21	244
6	45	3	50	55	240
7	45	7	30	72	104
8	45	7	50	135	114
9	5	5	40	44	17
10	55	5	40	70	184
11	30	2	40	30	242
12	30	8	40	96	69
13	30	5	23	50	97
14	30	5	57	140	109
15	30	5	40	124	103

16	30	5	40	63	102
17	30	5	40	116	103
18	30	5	40	102	102
19	30	5	40	104	107

207

## 208 **Capacidade Antioxidante**

209 A atividade de desativação do radical peroxil dos compostos fenólicos foi  
 210 determinada de acordo com Ou et al. (2001). Para tanto, 25 µL de amostra e 150 µL  
 211 de uma solução de fluoresceína 81 nM foram transferidos para microplacas de 96  
 212 poços (SPL Life Science, Gyeonggi-do, Coreia). Após o tempo de incubação (10  
 213 min, 37 °C), foram adicionados 25 µL de uma solução de AAPH recentemente  
 214 preparada na concentração de 152 mmol L<sup>-1</sup>, sendo que a fluorescência foi  
 215 imediatamente monitorada em 520 nm (comprimento de onda de excitação: 485  
 216 nm). O decaimento da intensidade do sinal de fluorescência foi determinada a cada  
 217 minuto por um período de 90 min. A capacidade antioxidante foi determinada usando  
 218 a área sob curva (AUC) e os resultados foram comparados com uma curva de  
 219 calibração padrão de Trolox (de 8 a 96 µmol L<sup>-1</sup>) e expresso como equivalentes  
 220 Trolox (µmol/grama de fruta fresca).

221

## 222 **Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais**

223 A quantidade de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinada em  
 224 triplicata pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Chandra & Mejia,  
 225 2004). Uma alíquota de 1 mL de cada extrato foi misturada com 0,25 mL de  
 226 reagente de Folin-Ciocalteu, permanecendo em repouso durante 5 min antes da  
 227 adição de 2 mL de carbonato de sódio a 20% (m/V). A solução permaneceu em  
 228 repouso por mais 10 min antes da determinação da absorvância em 750 nm. Uma  
 229 curva de calibração entre 0,001 a 0,030 mg mL<sup>-1</sup> de ácido gálico foi feita para  
 230 obtenção da concentração de compostos fenólicos totais nos extratos, a qual foi  
 231 expressa como miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de fruta  
 232 fresca (mg GAE.100 g<sup>-1</sup> de fruta fresca).

233

## 234 **Determinação de antocianinas totais**

235 A quantidade de antocianinas totais do extrato foi determinada pelo método  
 236 do pH diferencial, descrito por Giusti e Wrolstad (2001). Uma alíquota de 600 µL de  
 237 cada extrato foi diluída com 2,4 mL de solução de cloreto de potássio 0,025 mol L<sup>-1</sup>  
 238 pH 1,0 e com tampão acetato de sódio 0,4 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,5. As soluções diluídas  
 239 permaneceram em repouso durante 15 min e a absorvância de cada amostra foi  
 240 determinada em 520 e 700 nm. O teor de antocianinas foi calculado utilizando a  
 241 seguinte equação:

$$242 \quad \text{Teor de antocianinas (mg/100g de fruta fresca)} = (A \times PM \times GD \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

243 **Equação 1.**

244 Onde: A= absorvância ( $A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}$ )<sub>pH 1,0</sub> - ( $A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}$ )<sub>pH 4,5</sub>, PM= peso  
 245 molecular da antocianina predominante na amostra, cianidinina-3-glucosídeo, GD=  
 246 grau de diluição,  $\epsilon$ = absortividade molar (26900).

247

#### 248 **Extração sem solvente assistida por ultrassom**

249 Amostras de mirtilo foram colocadas em béqueres com capacidade total de  
 250 100 mL. A aplicação do ultrassom foi efetuada diretamente no próprio fruto, ou seja,  
 251 nenhum tipo de preparo de amostra ou solvente foi utilizado para extração. Os  
 252 parâmetros tempo (2-8 min), peso de amostra (5-55 g) e amplitude de ultrassom (23-  
 253 57%) foram avaliados. A fim de medir a potência acústica real aplicada, foi utilizada  
 254 a Equação 2 para estimar a energia transferida para a amostra.

$$255 \quad P = m \cdot C_p \cdot \frac{dT}{dt}$$

256 **Equação 2.**

257 Onde,  $C_p$  é a capacidade calorífica da amostra ( J kg<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),  $m$  é a massa de amostra  
 258 (kg) e  $Dt/dt$  é o aumento da temperatura (K) por segundo.

259 A extração assistida por ultrassom com refrigeração foi realizada para avaliar  
 260 o efeito da temperatura durante a extração. Para tanto, 15 g de mirtilo partidos ao  
 261 meio foram adicionados a um béquer de 100 mL imerso em um banho refrigerado de  
 262 forma a manter a temperatura da amostra em torno de 20 °C, sem utilização de  
 263 solvente. A amostra foi submetida ao ultrassom com uma frequência de 20 kHz,



264 amplitude de 57% e tempo de 7 min. Após extração, as amostras foram filtradas e  
265 aferidas em balão volumétrico de 25 mL com água.

266

### 267 **Extração por MHG**

268 Uma porção de 50 g de mirtilo foi pesada e submetida ao aquecimento por  
269 micro-ondas usando uma potência de 4 W por grama de fruta (200 W) por 15 min,  
270 sendo que a temperatura foi monitorada por um sensor infravermelho externo.  
271 Durante a extração por MHG ocorre uma interação direta entre a radiação micro-  
272 ondas com a água do fruto, favorecendo a liberação de compostos presos dentro  
273 das células do material vegetal, onde acabam naturalmente sendo removidos por  
274 difusão com a água, sendo recolhidos na parte inferior do sistema devido ao efeito  
275 da gravidade da terra. Após extração, as amostras foram filtradas e aferidas em  
276 balão volumétrico de 25 mL com água.

277

### 278 **Extração Convencional**

279 A extração convencional foi realizada a fim de comparar os resultados obtidos  
280 com aqueles do método proposto em termos de concentração de compostos  
281 fenólicos. Para tanto, 15 g de amostra foram partidas ao meio e pesadas em um  
282 bquer o qual foi submetido ao processo de extração utilizando um agitador  
283 magnético, uma velocidade de 200 rpm, com aquecimento para aquecer e agitar a  
284 amostra à uma temperatura de 80 °C durante 7 min e como solvente foi utilizado a  
285 água proveniente do próprio fruto. Após extração, as amostras foram filtradas e  
286 aferidas em balão volumétrico de 25 mL com água.

287

### 288 **Caracterização dos compostos fenólicos do mirtilo**

289 O preparo dos extratos de mirtilo foi feito de acordo com as condições usadas  
290 por Fang, Yu & Prior, 2002, com algumas modificações. O extrato concentrado foi  
291 filtrado utilizando uma membrana com diâmetro de poro de 0,20 µm, o qual foi  
292 submetido a passagem por um cartucho C18-E 55µm (500 mg.3 mL<sup>-1</sup>), após  
293 ativação com 2 mL metanol e 2 mL de água. Posteriormente, foi feita a lavagem do

294 cartucho com 2 mL água. Os compostos fenólicos retidos pelo cartucho foram  
295 eluídos com metanol 50% (v/v) e metanol 100%, sendo que as duas frações foram  
296 combinadas, a fim de obter a concentração total dos analitos.

297 Os extratos obtidos foram diluídos em uma mistura de metanol:H<sub>2</sub>O na  
298 proporção 1:1, contendo 100 µL de NH<sub>4</sub>OH 200 mmol L<sup>-1</sup>, e analisadas por infusão  
299 direta usando *electrospray* no modo negativo (ESI<sup>-</sup>). O controle e aquisição de dados  
300 foram feitos usando o software MassLynx V 4.1. Para as análises, foi utilizada uma  
301 alça de amostragem de 250 µL carregada de amostra à uma vazão de infusão de 20  
302 µL min<sup>-1</sup>. As condições de ionização incluíram tensão capilar de 2,0 Kv, cone de  
303 amostragem 20V, cone de extração 3,0 V, fonte 150 °C, dissolvatação 400 °C, vazão  
304 de N<sub>2</sub> no cone de amostragem 10 L h<sup>-1</sup>, vazão de N<sub>2</sub> da dessolvatação 500 L h<sup>-1</sup> e  
305 faixa de massa monitorada 50 a 1000 Da.

306 Durante as análises por UPLC-qTOF-MS/MS, foi feito o uso de uma coluna  
307 com diâmetro interno de 1,8 µM (Acquity UPLC HSS T3) empregando os seguintes  
308 parâmetros de gradiente de eluição: (A) H<sub>2</sub>O com ácido fórmico 0,1% e (B) metanol ,  
309 sendo que as condições de eluição UPLC foram otimizadas pelo seguinte modo:  
310 gradiente linear de (A) 95% e 5% (B) (0–0,5 min), (A) 80% e (B) 20% (0,5–3,0 min),  
311 (A) 50% e (B) 50% (7,0–11,0 min), (A) 20% e (B) 80% (11,0–11,5 min), (B) 100%  
312 (11,5–13,0 min), (A) 95% e (B) 5% (13,0–15,0 min). A vazão foi ajustada em 0,4 mL  
313 min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna 25 °C, temperatura do amostrador 25 °C e volume de  
314 injeção 5 µL.

315 Para a quantificação dos compostos fenólicos, foram preparadas soluções de  
316 referência na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> para confecção das curvas de  
317 calibração. Os limites de quantificação (LQ) dos métodos foram calculados e os  
318 valores obtidos foram de 0,125 µg g<sup>-1</sup>, 0,063 µg g<sup>-1</sup>, 0,125 µg g<sup>-1</sup>, 0,063 µg g<sup>-1</sup>, 0,125  
319 µg g<sup>-1</sup>, 1,250 µg g<sup>-1</sup> e 0,063 µg g<sup>-1</sup> para ácido gálico, catequina, ácido clorogênico,  
320 ácido caféico, rutina, quercetina e kaempferol, respectivamente quando o extrato foi  
321 obtido por MHG. Para as extrações por ultrassom, convencional e ultrassom  
322 refrigerado os LQ's encontrados foram 0,417 µg g<sup>-1</sup>, 0,208 µg g<sup>-1</sup>, 0,417 µg g<sup>-1</sup>, 0,208  
323 µg g<sup>-1</sup>, 0,417 µg g<sup>-1</sup>, 4,167 µg g<sup>-1</sup> e 0,208 µg g<sup>-1</sup> para ácido gálico, catequina, ácido  
324 clorogênico, ácido caféico, rutina, quercetina e caempferol, respectivamente

325

## 326 **Análise Estatística**

327 Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados  
 328 experimentais foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e teste de  
 329 Tukey com nível de confiança de 5%, usando o *software* “Statistica 7 (Statsoft,  
 330 Tulsa, Ok, EUA, 2004).

331

## 332 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 333 **Análise da Metodologia da superfície de resposta**

#### 334 Ajuste do modelo

335 Para ajuste do modelo, foram utilizados os valores de conteúdo de compostos  
 336 fenólicos totais em extratos obtidos de 19 experimentos. Os dados obtidos a partir  
 337 do projeto de compostos central foram adaptados às equações polinomiais de  
 338 segunda ordem. O significado dos coeficientes dos modelos foi determinado pela  
 339 análise de variância (ANOVA). A tabela 3 ilustra os coeficientes significativos e  
 340 valores de  $p$  correspondentes que são inferiores a 0,05, indicando o efeito  
 341 considerável dos coeficientes na respectiva variável de resposta. Deste modo, os  
 342 resultados mostraram que, para a variável resposta, o peso de amostra e o tempo  
 343 de extração têm efeitos quadráticos significativos ( $p < 0,05$ ). Todos os coeficientes  
 344 lineares foram significantes ( $p < 0,05$ ) para determinação de compostos fenólicos  
 345 totais, porém não apresentou efeito considerável de interação entre as variáveis.

346 **Tabela 3:** Resultados da análise de variância para o modelo de resposta quadrática

	<b>Sum of Square</b>	<b>Degress of freedom</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>p</b>
$X_1$	1910,14	1	1910,14	17,2812	0,025311
$X_1^2$	2142,18	1	2142,18	19,3806	0,021732
$X_2$	14668,76	1	14668,76	132,7101	0,001404
$X_2^2$	1196,82	1	1196,82	10,8278	0,046058
$X_3$	8712,31	1	8712,31	78,8213	0,003013
Lack of Fit	8338,86	9	926,54	8,3825	0,053539
Pure Error	331,60	3	110,53		
Total SS	36943,31	17			

347

348 A validade do modelo foi confirmada usando ANOVA, sendo que a mesma é  
 349 mostrada resumidamente na Tabela 4, indicando que o modelo ajustou-se  
 350 adequadamente aos dados experimentais. Além disso o coeficiente de determinação

351 ( $R^2$ ) foi de 0,7653, indicando correlação efetiva entre os valores previstos e os reais.  
 352 Com relação ao coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  adj) o mesmo apresentou  
 353 valor de 0,6675, indicando que os valores experimentais podem ser previstos  
 354 significativamente pelo modelo.

355 **Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) dos modelos polinomiais de segunda  
 356 ordem para o conteúdo de fenólicos totais.

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean Square	F Value	F tab
Regression	28272,85	98,53	2356,07	3,26	2,8
Residual	8670,45	12	722,53		
Fack of fit	8338,85	9	926,53		
Pure error	331,59	3	110,53		
Total	36943,31	18			

357

358 Análise de superfície de resposta do conteúdo de compostos fenólicos totais

359 O modelo matemático que correlaciona o conteúdo de fenólicos totais em  
 360 termos de variáveis independentes é dado pela Equação 4.

$$361 \quad Y = -175,196 + 2,630 x_1 - 0,057 x_1^2 + 45,499 x_2 - 2,837 x_2^2 + 2,514 x_3$$

362

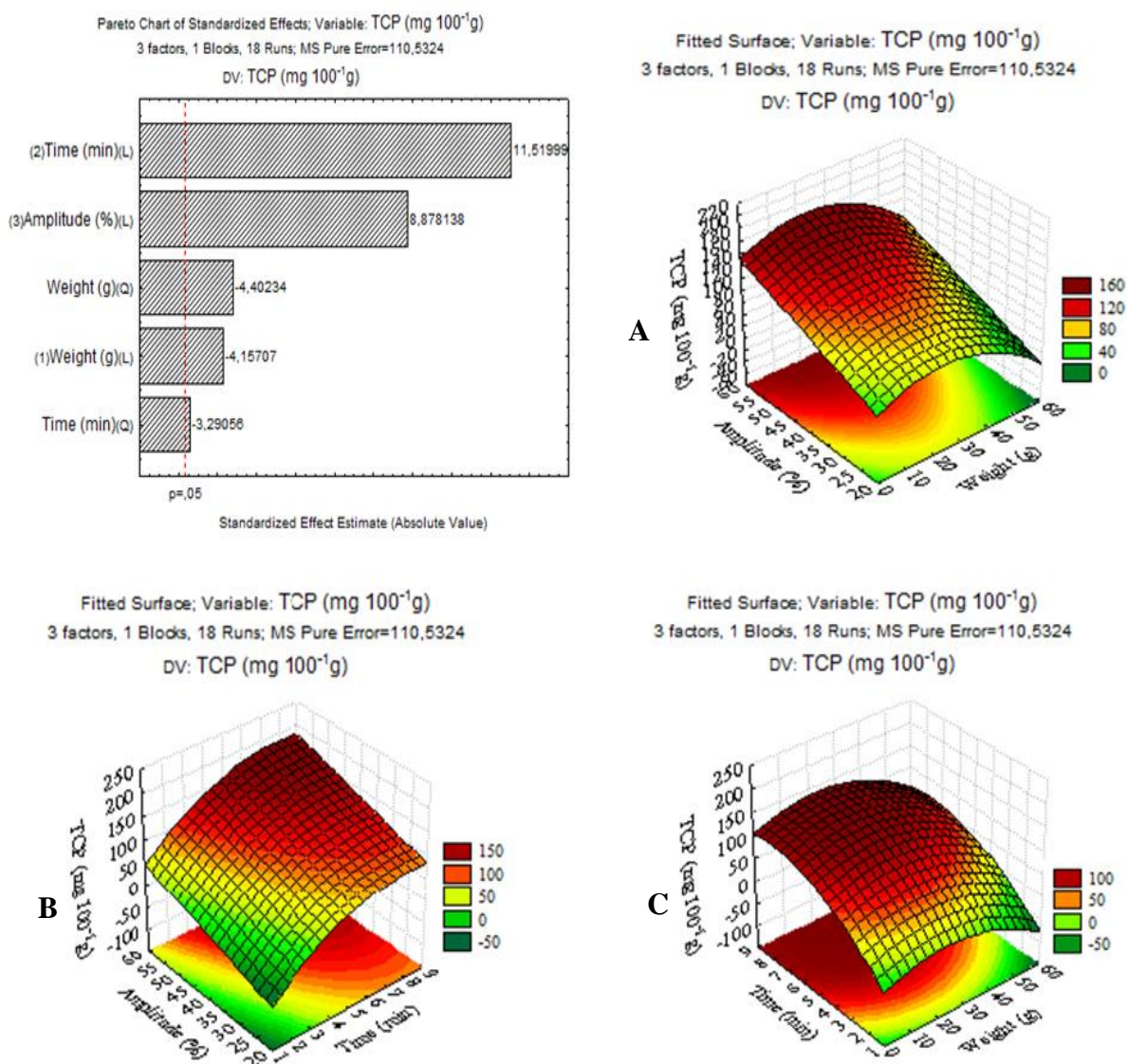
**Equação 4.**

363 Conforme indicado na tabela 4, a análise de variância do conteúdo de  
 364 fenólicos totais apresentou uma correlação positiva, em virtude do bom coeficiente  
 365 de determinação obtido ( $R^2 = 0,7653$ ). Além disso, pode-se observar que o valor de  
 366 F é superior ao tabelado ( $F_{calc} = 3,26 > F_{tab}(12,9) = 2,8$ ), indicando que o resultado  
 367 obtido para o modelo tem um efeito significativo na resposta total de conteúdo  
 368 fenólico ( $p < 0,05$ ).

369 A superfície de resposta tridimensional (3D), como parte importante da  
 370 equação de regressão, pode expor as interações entre as variáveis e determinar os  
 371 níveis ótimos (Figura 2). Um aumento considerável no teor de fenólicos totais foi  
 372 observado com o aumento da amplitude e do tempo de extração. Em contrapartida,  
 373 o aumento de compostos fenólicos pode ser observado quando um peso de amostra  
 374 menor foi utilizado.

375

376 **Figura 2:** Superfície resposta (3D) do conteúdo de compostos fenólicos totais em  
 377 função: (A) amplitude e peso, (B) amplitude e tempo e (C) tempo e peso.



378

379 As condições ótimas finais de extração foram obtidas quando o peso de  
 380 amostra foi de 15 g, tempo de extração por ultrassom foi de 7 min e amplitude de  
 381 50%. Para verificar a precisão do modelo de resposta, os experimentos foram  
 382 realizados nas condições ideais onde se obteve rendimento de  $195,9 \pm 1,6$  mg  
 383 GAE.100 g<sup>-1</sup> de fruta fresca, o qual foi próximo ao rendimento previsto de  $197,6 \pm 0,6$   
 384 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> de fruta fresca. Foi feita a avaliação do efeito da energia, tendo em  
 385 vista que o mesmo é um parâmetro importante para avaliar o poder real do  
 386 tratamento. Uma maior transferência de energia (242,6 W) foi obtido no tratamento  
 387 para amplitude de 40%, 2 min e 30 g de amostra, mas que no entanto, não  
 388 promoveu os melhores efeitos na extração de compostos fenólicos.

389 **Compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e capacidade**  
390 **antioxidante (ORAC)**

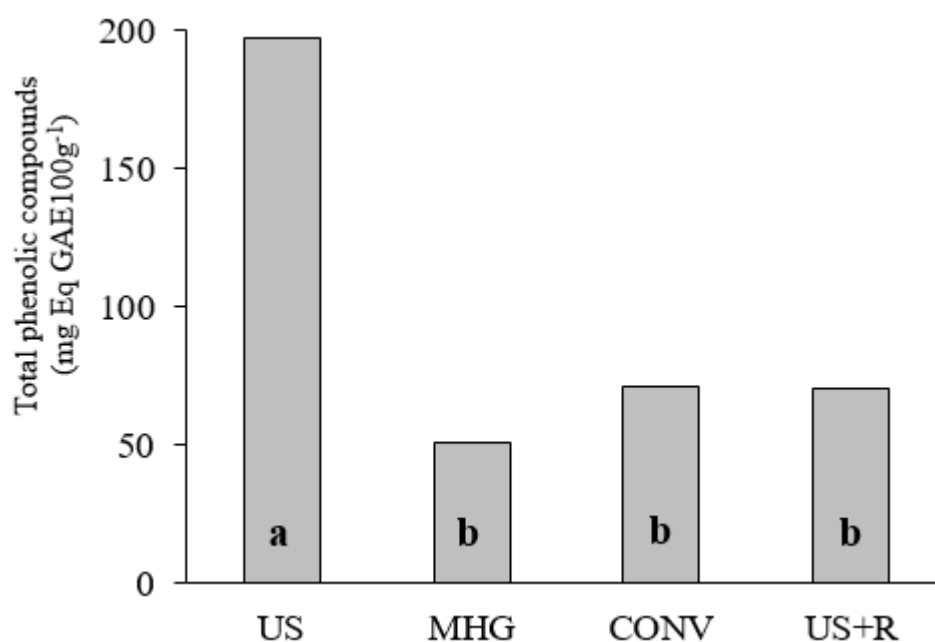
391 Para estimar e validar a eficiência do ultrassom na extração sem solvente de  
392 antioxidantes de mirtilo, foi feita uma comparação do teor de compostos fenólicos  
393 entre os métodos de extração com ultrassom sem solvente (US), MHG, extração  
394 convencional sem solvente (CONV) e extração com ultrassom refrigerado (US+R).

395 Como pode ser visto na Figura 3, o teor de compostos fenólicos totais foi  
396 maior na extração por ultrassom sem solvente ( $195,9 \pm 1,6$  mg de GAE.100g<sup>-1</sup>),  
397 seguido por extração convencional sem solvente ( $71,2 \pm 1,07$  mg de GAE.100g<sup>-1</sup>),  
398 ultrassom refrigerado ( $70,1 \pm 1,02$  mg de GAE.100g<sup>-1</sup>) e MHG ( $50,9 \pm 1,61$  mg de  
399 GAE.100g<sup>-1</sup>). Valores mais elevados pela extração sem solvente também foram  
400 observados por Boukroufa et al 2015, que avaliaram a extração sem solvente de  
401 resíduos de cascas de laranja por ultrassom, MHG e método convencional. Os  
402 autores observaram que a extração assistida por ultrassom apresentou uma  
403 melhoria de 30% no rendimento de fenólicos totais em relação a extração  
404 convencional (41,23 para 58,55 mg GAE.100g<sup>-1</sup>). Pingret et al. (2012), também  
405 obtiveram um aumento considerável para extração assistida por ultrassom de  
406 polifenóis de bagaço de maçã utilizando água como solvente em relação ao método  
407 convencional.

408 Para obter uma extração mais eficiente de compostos fenólicos é necessário  
409 que as estruturas e as células dos vegetais sejam rompidas o mais completamente  
410 possível. Desta forma, foi possível observar um aumento considerável da extração  
411 por ultrassom sem solvente (63,6%) em comparação ao método convencional. Isso  
412 se deve, principalmente, devido ao ultrassom aumentar a difusidade intra-partícula,  
413 ou seja, aumenta a acessibilidade do solvente para a estrutura interna da partícula e  
414 também reduz o tamanho de partícula do substrato, conseqüentemente, aumentando  
415 a eficiência de extração.

416

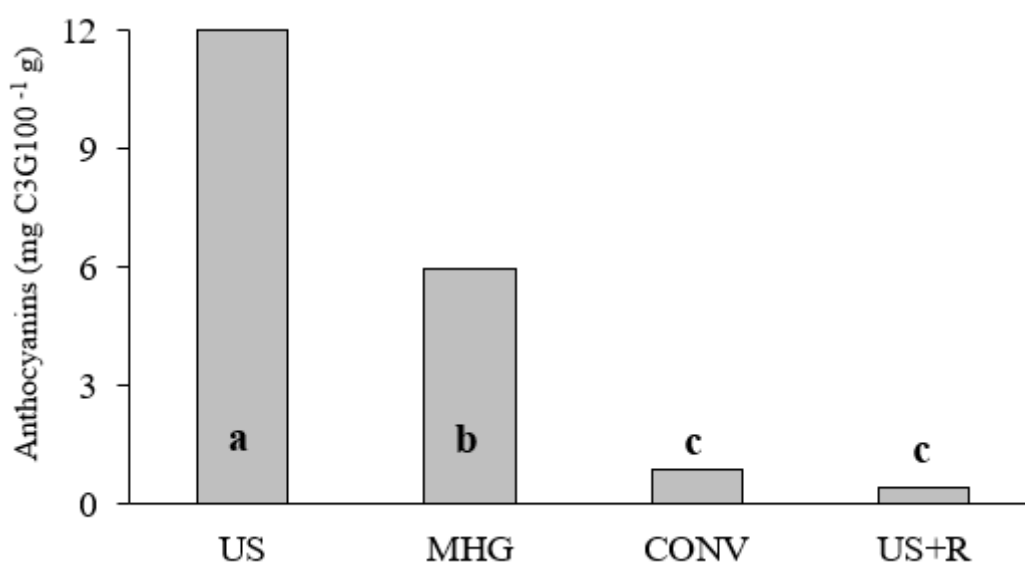
417 **Figura 3:** Concentração compostos de fenólicos totais para os diferentes métodos  
 418 de extração verde.



419

420 Os resultados obtidos para antocianinas totais são mostrados na Figura 4.  
 421 Como pode ser observado, a maior concentração também foi obtida pelo método  
 422 empregando ultrassom sem solvente ( $11,90 \pm 0,76$  mg de C3G.100g<sup>-1</sup>), seguida por  
 423 MHG ( $5,96 \pm 0,42$  mg de C3G.100g<sup>-1</sup>), extração convencional sem solvente ( $0,84 \pm$   
 424  $0,02$  mg de C3G.100g<sup>-1</sup>) e ultrassom refrigerado ( $0,93 \pm 0,001$  mg de C3G.100g<sup>-1</sup>).

425 **Figura 4:** Teor de antocianinas monoméricas totais para os diferentes métodos de  
 426 extração verde.



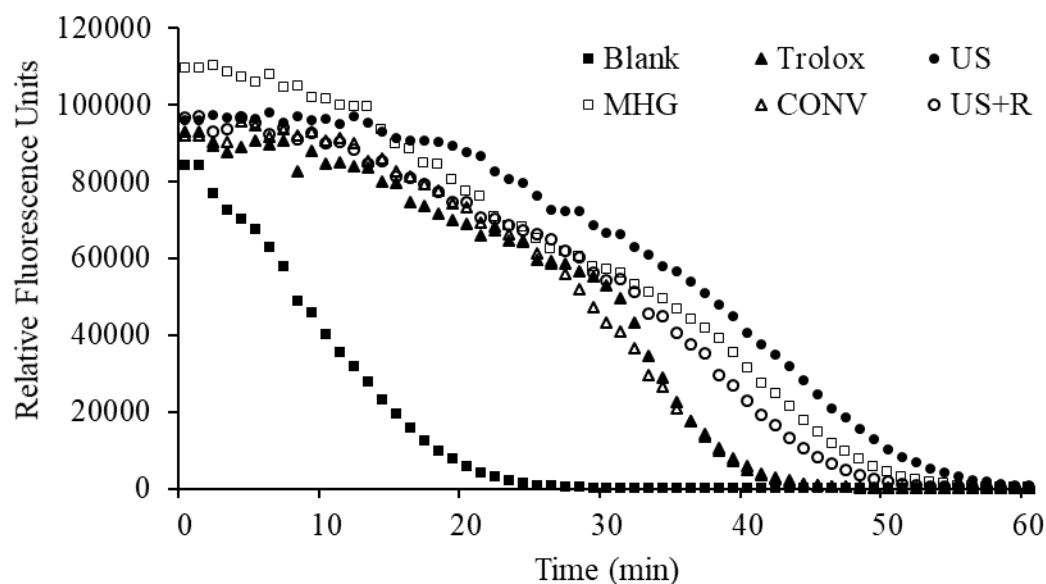
427

428 Tiwari et al. (2010) obteve  $13,39 \pm 0,64$  mg de C3G. $100g^{-1}$  para extrato de  
429 suco de uva sonicado, o que indicou um aumento de 2% em relação aos métodos  
430 convencionais, mostrando a maior eficiência quando a energia ultrassônica foi  
431 empregada. Já Cendres et al. (2012) obteve maior rendimento para extração por  
432 microondas por hidrodifusão e gravidade ( $9,8$  mg de C3G. $100g^{-1}$ ) na condição de  $1$   
433 W  $g^{-1}$  para extrato obtido de suco de ameixa.

434 A capacidade antioxidante do extrato é de grande importância comercial,  
435 sendo que os resultados obtidos para este parâmetro (Figura 5) nos extratos de  
436 mirtilo, mostraram-se melhores quando o método proposto por ultrassom sem  
437 solvente foi aplicado ( $2055 \pm 10$   $\mu\text{mol Eq Trolox.}100g^{-1}$ ), como também apresentou  
438 diferença estatística entre os outros métodos de extração testados. Entretanto, os  
439 demais métodos investigados mostraram-se adequados para a extração de uma boa  
440 parcela destes compostos, sendo que foram obtidos valores para MHG, extração  
441 convencional sem solvente e ultrassom refrigerado de  $1452 \pm 8$ ,  $1395 \pm 17$  e  $1240 \pm$   
442  $1$   $\mu\text{mol Eq Trolox.}100g^{-1}$ , respectivamente. Utilizando a mesma biomassa, Kraujalytė  
443 et al. 2015, avaliaram as propriedades antioxidantes de sucos de blueberrys de  
444 diferentes genótipos e obtiveram valores entre  $421 - 4568$   $\mu\text{mol Eq Trolox.}100g^{-1}$ .  
445 Diaconeasa et al. 2015, avaliaram a capacidade antioxidante de sucos de mirtilo  
446 obtidos pelo método convencional e obtiveram resultados de  $2325$   $\mu\text{mol Eq}$   
447  $\text{Trolox.}100g^{-1}$ , os quais comportaram-se de forma similar com os encontrados no  
448 presente estudo. Seeram et al. 2008, também avaliaram a capacidade antioxidante  
449 de sucos de mirtilo pelo método de ORAC onde obtiveram resultados de  $1450$  a  
450  $2390$   $\mu\text{mol Eq Trolox.}100g^{-1}$ , mostrando que os valores encontrados nestes estudos  
451 são similares aos obtidos pelo presente trabalho.

452



453 **Figura 5:** Decaimento da fluoresceína em função do tempo.

454

455 Diversos autores relatam um aumento significativo nos extratos de sucos  
 456 sonicados em relação a composição bioativa e no teor de antocianinas totais em  
 457 comparação com métodos convencionais (Vilkhu et al, 2008; Masuzawa, Ohdaira &  
 458 Ide, 2000; Cocito, Gaetano & Delfini, 1995). Esse aumento significativo obtido pela  
 459 extração sem solvente assistida por ultrassom em comparação aos outros métodos  
 460 é atribuído ao fenômeno de cavitação, o qual aumenta a transferência de massa  
 461 através das forças de cisalhamento e reduz o tamanho das partículas de substato  
 462 pelas erosões e pelos choques violentos dos microjatos na casca da fruta, facilitando  
 463 a liberação do conteúdo celular (Chemat, Zill-e-Huma & Khan, 2011).

464 Toma et al. (2001) demonstrou que a fragmentação dos materiais vegetais  
 465 ocorreu durante a sonicação, a qual ocasionou uma hidratação melhorada de matriz  
 466 devido ao ultrassom. Também foi observado um aumento no rendimento de extração  
 467 de amostras sonicadas em comparação as amostras não sonicadas. No presente  
 468 trabalho observou-se que o extrato de mirtilo obtido por extração assistida por  
 469 ultrassom refrigerado apresentou os menores rendimentos. Isto, pode estar  
 470 relacionado ao efeito combinado de ultrassom e temperatura, pois quando maiores  
 471 temperaturas foram utilizadas um maior rendimento em comparação com a extração  
 472 por ultrassom com banho refrigerado foi obtido (Palma et al. 2013). Geralmente, o  
 473 aumento da temperatura conduz ao aumento do rendimento de extração de  
 474 compostos biativos, no caso do ultrassom, alguns autores descrevem o efeito

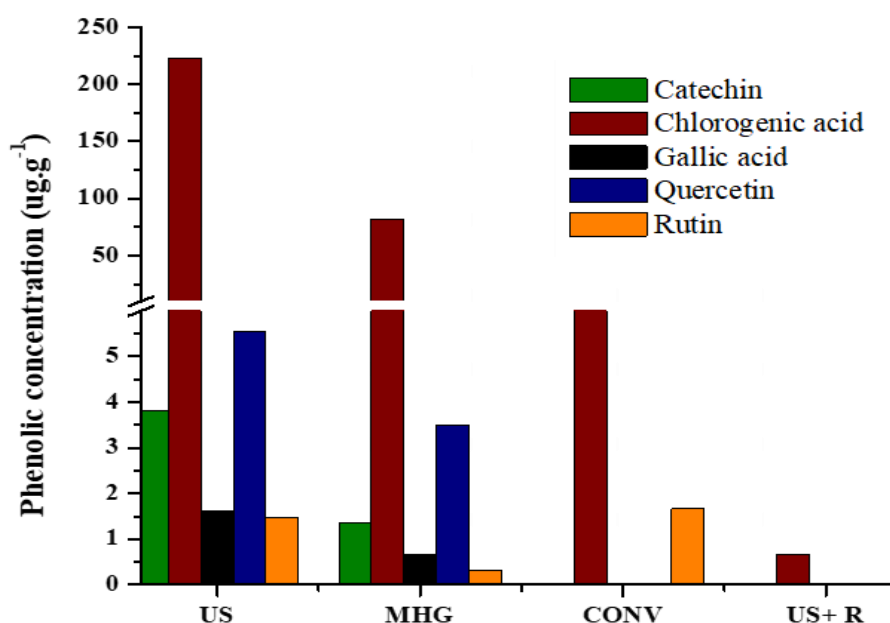
475 benéfico da elevação da temperatura de 20 °C para 70 °C, para extração de  
 476 compostos fenólicos em comparação com amostras de uva não sonicadas (Shirsath,  
 477 Sonawane & Gogate, 2012)

478

#### 479 **Identificação e quantificação dos compostos fenólicos de mirtilo**

480 Os compostos fenólicos encontrados nos extratos obtidos pelos métodos de  
 481 extrações do mirtilo foram determinados por UPLC-qTOF-MS/MS. A concentração  
 482 dos compostos encontrados foi expressa em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de amostra fresca e estão  
 483 mostrados na Figura 6. De acordo com os resultados obtidos, o ácido clorogênico foi  
 484 o composto majoritário para os quatros métodos de extração o qual possui elevada  
 485 capacidade antioxidante. Os maiores valores deste composto majoritário foram  
 486 obtidos pelo método proposto por extração assistida por ultrassom ( $223 \pm 7 \mu\text{g g}^{-1}$ ),  
 487 seguido por MHG ( $82 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$ ), CONV ( $8 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e ultrassom refrigerado ( $0,65 \pm$   
 488  $0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ ). O ácido clorogênico já foi reportado em outros trabalhos como  
 489 composto fenólico majoritário em mirtilos, sendo que as concentrações encontradas  
 490 em sucos reportadas na literatura permanecem entre 210 a  $850 \mu\text{g g}^{-1}$  (Brambilla et  
 491 al. 2008; Moze et al. 2011; Rodrigues-Mateos et al. 2012).

492 **Figura 6:** Concentração de compostos fenólicos no extrato de mirtilo obtido pelos  
 493 diferentes métodos de extração.



494

495 Foram encontrados também no extrato de mirtilo quercetina (US 5,56  $\mu\text{g g}^{-1}$  e  
496 MHG 3,50  $\pm$  0,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), catequina (US 3,80  $\pm$  0,03  $\mu\text{g g}^{-1}$  e MHG 1,37  $\pm$  0,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ),  
497 ácido gálico (US 1,63  $\pm$  0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$  e MHG 0,67  $\pm$  0,03  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e rutina (convencional  
498 1,66  $\pm$  0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$ , US 1,47  $\pm$  0,16  $\mu\text{g g}^{-1}$  e MHG 0,33  $\pm$  0,03  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). A quercetina e a  
499 rutina já foram encontradas em outros trabalhos que estudaram o mirtilo, indicando  
500 similaridade entre os estudos (Riihinen, Jaakola, Karenlampi & Hohtola, 2008; Moze  
501 et al. 2011; Taruscio, Barney & Exon, 2004).

502 Moze et al. (2011) avaliaram o teor de compostos fenólicos de *bilberry* e  
503 *blueberries*. Neste estudo, foram, encontrandos nos extratos de diversos genótipos  
504 de mirtilo obtidos pelo convencional utilizando metanol como solvente de extração  
505 compostos como catequina (1-3  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), quercetina (7-12  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), rutina ( 1-4  $\mu\text{g g}^{-1}$ ),  
506 ácido clorogênico (210-297  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), ácido gálico (54-85  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Vale destacar que os  
507 valores encontrados de rutina, catequina e ácido clorogênico no presente estudo,  
508 apresentam grande similaridade com os dados observados pelo autor. Por outro  
509 lado, a concentração de ácido gálico foi muito abaixo do encontrado na literatura.  
510 Este fato, pode estar relacionado a solubilidade do composto, onde, de acordo com  
511 Daneshfar, Ghaziaskar e Homayun, (2008) quando avaliaram a solubilidade do ácido  
512 gálico em metanol, etanol, água e acetato de etil, mostraram a maior solubilidade do  
513 ácido gálico em metanol a uma temperatura de 20 a 60 °C. Deste modo, é possível  
514 observar que o presente no trabalho foram obtidas concentrações comparáveis com  
515 a literatura em relação a presença de ácido clorogênico, quercetina, catequina e  
516 rutina, pelo fato desses compostos serem solúveis em água em temperatura mais  
517 elevada (Shimoi et al. 2003; Ibanez et al. 2003; Herrero et al 2005).

518

## 519 **Conclusão**

520 O método proposto neste trabalho mostrou-se uma alternativa adequada e de  
521 alta eficiência para a extração verde de compostos fenólicos por ultrassom sem uso  
522 de solventes. As condições otimizadas pelo uso do *design* de composto central e  
523 superfície de resposta indicou que usando 15 g de amostra, 7 min de tempo de  
524 extração e amplitude de 50% proporcionaram as maiores concentrações de  
525 compostos fenólicos e melhores características de extratos foram obtidos. Em  
526 comparação aos métodos por MHG, extração convencional e ultrassom refrigerado, o

527 método proposto permitiu a obtenção de maiores rendimentos de extratos com maior  
528 teor de antocianinas monoméricas totais (92% maior em relação aos métodos  
529 convencional e ultrassom refrigerado e 49% maior em comparação ao MHG),  
530 compostos fenólicos totais (aumento de cerca de 67%), capacidade antioxidante  
531 (aproximadamente 33%) e concentração de fenólicos (aumento de 63% na  
532 concentração de ácido clorogênico em comparação ao método por MHG). Desta  
533 forma, a extração assistida por ultrassom sem solvente pode ser considerada como  
534 um método econômico, eficiente e uma alternativa viável para aplicação na área de  
535 alimentos.

## Referências

- Alzamora, S. M.; Guerrero, S. N.; Schenk, M.; Raffellini, S.; López-Malo, A. (2011) Inactivation of microorganisms. *Ultrasound Technologies for food and bioprocessing*, v. 321-343.
- Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J., & Serna-Saldívar, S. O. (2015). Antiinflammatory glycosylated flavonoids as therapeutic agents for treatment of diabetes-impaired wounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(23), 2456–2463.
- Awad, T. S.; Moharram, H.A.; Shaltout, O. E.; Asker, D.; Youssef, M. M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, v. 48, p. 410-427.
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 49, p. 96–109.
- Boukroufa, M., Boutekedji, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F. (2015) Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 24, p. 72-79.
- Brambilla, A., Lo Scalzo, R., Bertolo, G., Torreggiani, D. (2008) Steam-bleached highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice: Phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2643-2648.
- Castrejon, A.D.R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L.W., Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry* v. 109, 564–572.
- Cendres, A., Chemat, F., Page, D., Bourvellec, C. L., Markowski, J., Zbrzezniak, M., Renard, C. M.G.C., Plochanski, W. (2012) Comparison between microwave

hydrodiffusion and pressing for plum juice extraction. *Food Science and Technology*, v. 49, p. 229-237.

Chandra, S., Meija, G. E. (2004) Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 52 (11), p. 3583-3589.

Chemat, F. Zill-e-Huma, Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.18, p. 813-35.

Chemat, F. Vian, M. A., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Science*, v. 13, p. 8615-8627.

Chemat, F. Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., Vorobiev, E. (2015) Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 157-168.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 540-560.

Coban, J., Dogan-Ekici, I., Aydin, A.F., Betul-Kalaz, E., Dogru-Abbasoglu, S., Uysal, M., 2015. Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. *Metab. Brain Dis.* 30 (3), 793–802.

Cocito, C., Gaetano, G., & Delfini, C. (1995). Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound. *Food Chemistry*, v. 52, p. 311-320.

Damyeh, M. S.; Niakousari, M.; Saharkhiz, M. J. (2016) Ultrasound pretreatment impact on *Prangos ferulacea* Lindl. and *Satureja macrosiphonia* Bornm. essential oil extraction and comparing their physicochemical and biological properties. *Industrial Crops and Products*, v. 87, p. 105-115.

Daneshfaz, A., Ghaziaskar, H. S., Homayoun, N. (2008) Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. *Journal of Chemical & Engineering*, v. 53, p. 776-778.

Diaconeasa, Z., Ranga, F., Rugina, D., Leopold, L., Pop, O., Vodnar, D., Cuibus, L., Socaciu, C. (2015) Phenolic Content and Their Antioxidant Activity in Various Berries Cultivated in Romania. *Food Science and Technology*, v. 72, p. 99-103.

Fang, N., Yu, S. & Prior, R. L. (2002) LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p. 3579-3585.

Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001) Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in food Analytical Chemistry*.

Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M. A., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2005) Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *Journal of Chromatography A*, v. 1804, p. 54-62.

Huang, W.Y., Zhang, H.C., Liu, W.X., Li, C.Y., 2012. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J. Zhejiang University-Sci. B (Biomed. Biotechnol.)* 13 (2), 94–102.

Ibañez E., Kabátová, A. Señoráns, J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, B. (2003) Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 375-382.

Kraujalytė, V., Venskutonis, P. R., Pukalskas, A., Cesoniene, L., Daubaras, R. (2015) Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chemistry*, v. 188, p. 583-590.

Masuzawa, N., Ohdaira, E., & Ide, M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, v. 39, p. 2978-2979.

Moze, S. Polak, T., Gasperlin, L., Torronen, R. (2011) Phenolics acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7193-7199.

Mustafa, A., & Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 703(1), p. 8–18.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. Prior, R. L. (2001) Developmente and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4619-4626.

Palma, M., Barbero, G. F., Pineiro, Z., Liazid, A. Barroso, C. G., Rostagno, M. A., Prado, J. M., Meireles, M.A.A. (2013) Chapter 2: Extraction of natural products: principles and fundamental aspects, in: Rostagno M.A., PRADO, J. M. (Eds.). *Natural products Extraction: Principles and Applications*. The Royal Society of Chemistry, UK, p. 58-88.

Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 3–11.

Pingret, D., Tixier, A.S.F, Bourvellec, C. L., Renard, C. C. M. G. C., Chemat, F. (2012) Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, v. 111, p. 73-81.

Riihinen, K.; Jaakola, L.; Kearenlampi, S.; Hohtola, A. (2008) Organspecific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'Northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* & *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, v. 110, 156–160.

Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., & Balling, J. R. (2004) Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52(15), p. 4713–4719.

Rodrigues-Mateos, A., Ciguentes-Gomez, T., Tabatabaee, S., Lecras, C. Spencer, J. P. E. (2012) Procyanidin, anthocyanin, and chlorogenic acid contents of highbush and lowbush blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 5772-5778.

Routray, W., & Orsat, V. (2010). Blueberries and their anthocyanins: Factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 303–320.



Sadilova, E., Carle, R., & Stintzing, F. C. (2007) Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 51, p. 1461-1471.

Sciarappa, W., Polavarapu, S., Berry, J., Oudemans, P., Ehlenfeldt, M., Pavlis, G., Polk, D., Holderaft, R. (2008) Developing an Organic Production System for Highbush Blueberry. *HortScience*, v. 53, p. 51-57.

Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 1415-1422.

Shirsath, S. R., Sonowave, S. H., Gogate, P. R. (2012) Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – a review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 53, p. 10-23.

Shimoi, K., Yoshizumi, K., Kido, T., Usui, Y., Yumoto, T. (2003) Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and  $\alpha$ G-Rutin, a water soluble flavonoid, in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 2785-2879.

Soria, A. C.; Villamiel, M. (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends Food Science Technology* v. 21, p. 323.

Taruscio, T. G.; Barney, D. L. (2004) Exon, J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem*, v. 52, p. 3169-3176.

Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., & Cullen, P. J. (2008) Effect of ultrasound processing on quality of fruit juices. *Stewart-Post Harvest Review*, v. 4, p. 1- 6.

Tiwari, B. K., O'Donnell & Cullen, P. J. (2009) Effect of non-thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, p. 137-145.

Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen P. J., O'donnell, C.P. (2010) Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.17, v. 598-604.

Tiwari, B. k. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. Trends in Analytical Chemistry, v. 71, p. 100-109.

Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrasonic Sonochemistry, v. 8, p. 137-142.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry e a review. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 9, p. 161-169.

Wang, W., Jung, J., Tomasino, E., Zhao, Y. (2016) Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. LWT- Food Science and Technology, v. 72, p. 229-238.

Xu, D. P., Zheng, J., Zhou, Y., Li Y., Li, S. Li, H.B. (2017) Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinatum*: Optimization and comparison with conventional methods. Food Chemistry, v. 217, p. 559.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no trabalho permitem inferir que é possível se fazer a extração de compostos bioativos de mirtilo, como fenólicos e antocianinas, sem o uso de qualquer solvente através da aplicação de ultrassom. A otimização das condições de ultrassom foi uma etapa importante para promover maiores rendimentos da extração assistida por ultrassom sem solvente para compostos fenólicos totais, antocianinas totais, capacidade antioxidante e composição fenólica, comparado aos métodos de extração por MHG, CONV e US+R, mostrando ser uma técnica verde promissora e que vai ao encontro dos princípios da química verde. Desta forma, algumas características como redução do consumo de energia, menor tempo de extração e a eliminação de qualquer solvente para extração podem ser destacadas, mostrando que a proposta pode ser uma alternativa viável para extrações de compostos bioativos mais amigáveis ao meio ambiente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANASTAS, P. EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 301-312, 2010.
- ANASTAS, P. WARNER, J. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press, New York, 2000.
- ANDERSEN, OM., & JORDHEIM, M. **The anthocyanins**. In **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**, ed. OM Andersen, KR Markhan, p. 471-552, 2006.
- ANGELO, P. M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-6, 2007.
- ANTUNES, L. E. C., RASEIRA, M. Cultivo do Mirtilo (*Vaccinium* spp). **Embrapa Clima Temperado**. Sitemas de produção, v. 8, 2006.
- BARBA, F. J., ZHU, Z., KOUBAA, M., SANT'ANA, A. S., & ORLIEN, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.
- BOUKROUFA, M., BOUTEKEDJI, C., PETIGNY, L., RAKOTOMANOMANA, N., CHEMAT, F. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 72-79, 2015.
- BOUSBIA, N., VIAN, M. A., FERHAT, M. A., MEKLATI, B. Y. CHEMAT, F. A new process for extraction of essential oil from *Citrus peels*: Microwave hydrodiffusion and gravity. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 409-413, 2009.
- CARES, M. G., VARGAS, Y., GAETE, L., SAINZ, J., ALARCÓN, J. Ultrasonically assisted Extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. **Physics Procedia**, v. 3, p. 169-178, 2010.
- CENDRES, A., CHEMAT, F., PAGE, D., BOURVELLEC, C. L., MARKOWSKI, J., ZBRZEZNIAK, M., RENARD, C. M.G.C., PLOCHARSKI, W. Comparison between microwave hydrodiffusion and pressing for plum juice extraction. **Food Science and Technology**, v. 49, p. 229-237, 2012.
- CHANDRASEKARAN, S. RAMANATHAN, S. BASAK, T. Microwave food processing – A review. **Food Reserch International**, v. 52, p. 243-261, 2013.
- CHEMAT, F., LUCCHESI, M. E., **Microwave assisted Extraction of Essential Oils**. Chapter 22, *Microwaves in Organic Synthesis*, Second Edition, 2008.
- CHEMAT, F. CRAVOTTO, G. Microwave assisted extraction for bioactive compounds – theory and practice. Vol. 1. Springer US, 2013.
- CHEMAT, F. ZILL-E-HUMA, KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, p. 813-35, 2011.

CHEMAT, F. VIAN, M. A., CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CHEMAT, F. FABIANO-TIXIER, A. S., VIAN, M. A., ALLAF, T., VOROBIEV, E. Solvent-free extraction of food and natural products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 157-168, 2015.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A. G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A. S., ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasound Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHEMID ADVANCED DATABASE U.S. national library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894: National Institutes of Health, **Health & Human Services**, 2015.

CHEN, Q. HU, Z. YAO, F. Y.D, LIANG, H. Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. **LWT – Food Science and Technology**, v. 66, p. 538-545, 2016.

COBAN, J., DOGAN-EKICI, I., AYDIN, A.F., BETUL-KALAZ, E., DOGRU-ABBASOGLU, S., UYSAL, M. Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. **Metabolic Brain Disease**, p. 30, n. 3, p. 793–802, 2015.

CONCENÇO, F. I. G. da R.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; de OLIVEIRA, I. H. T.; LEONE, R. de S. Caracterização e Avaliação das propriedades Fisico-químicas da polpa, casca e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, 2014.

D'ALESSANDRO, L. G., DIMITROV, K., VAUCHEL, P., NIKOV, I. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, p. 1818-1826, 2014.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 285-576, 2008.

FARHAT, A., FABIANO-TIXIER, A. S., VISINONI, F., ROMDHANE, M., CHEMAT, F. A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7345-7350, 2010.

FROSTI, H. M. Electromagnetic-ultrasound transducers: principles, practiques, and applications. **Physical Acoustics**, v.14, p. 179-276, 2012.

GIOVANELLI, G. & BURATTI, S. Comparasion of polyphenolic composition and antioxidante activity of wild Italian blueberries and some cultivates varieties. **Food Chemistry**, v. 112, p. 903-908, 2008.

HANI, N. M., TORKAMANI, A. E., ABIDIN, S. Z., MAHMOOD, W. A. K., JULIANO, P. The effects os ultrasoun assisted extration on antioxidante activity of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using responde surface approach. **Food Bioscience**, v. 17, p. 7-16, 2017.

HE, J., & GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.

HUANG, W.Y., ZHANG, H.C., LIU, W.X., LI, C.Y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J. Zhejiang. Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 13, n. 2, 94–102, 2012.

HWANG, S.J. YONN, W. B., LEE, O. H., CHA, S. J., KIM, J. D. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. **Food Chemistry**, v. 146, p. 71-77, 2014.

JIANG, H. L., YANG, J. L., SHI, Y. P. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 325-331, 2017.

LANCASTER, M. **Green Chemistry: An introductory text**. Second ed. The Royal Society of Chemistry, 2010.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 47, p. 1–11, 2013.

LOPES, T. J., XAVIER, M. F., QUADRI, M. G. N., QUADRI, M. B. Antocianinas: umas breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 13, n.3, p. 291-297, 2007.

MACHADO, A. P. F., PEREIRA, A. L. D., BARBERO, G. F. MARTINEZ, J. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. **Food Chemistry**, v. 231, p. 1-10.

MARÇO, H. P., POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.

MORAES, J. O. et al. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 18-22, 2007.

MUCHUWETI, M. KATIVU, E., MUPURE, C. H. CHIDEWE, C. NDHLALA, A. R. BENHARA, M. A. N. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Spices. **American Journal of Food Technology**, v. 2, p. 414-420, 2007.

MUSTAFA, A., & TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.

PINGRET, D., TIXIER, A.S.F, BOURVELLEC, C. L., RENARD, C. C. M. G. C., CHEMAT, F. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 73-81, 2012.

PAYNE, T. J. Formulation with blueberries for health. **Cereal Foods World**. v. 50 p. 262-264, 2005.

PARISI, O.I., POUCCI, F. RESTUCCIA, D. IEMMA, F. PICCI, N. Polyphenols and their formulations: Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with their

poor stability and bioavailability. **Polyphenols in Human Health Disease**, v. 4, p. 29-45, 2014.

PÉRINO, S., PIERSON, J. T., RUIZ, K., CRAVOTTO, G., CHEMAT, F. Laboratory to pilot scale: Microwave extraction for polyphenols lettuce. **Food Chemistry**, v. 204, p. 108-114, 2016.

PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (Vaccinium ashei Reade)**. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas 2009.

PICÓ, Y.; Ultrasound-assisted extration for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, 2013.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p.1-13, 2005.

PRICE, S. F., BREEN, P. J., VALLADAO, M., WATSON, B. T. Cluster sun exposure and quercetin in Oinot Noir grapes and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p. 187-194, 1995.

RAMADAN, K. S., SAMEOTO, D., EVOY, S. A review of piezoelectric polymers as functional materials for electromechanical transducers, **Smart Materials Structures**. v. 23, 2014.

RAMARATHANAM, N., OSAWA, T., Ochi, H., KAWAKISHI, S., The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends food Science & Nutrition**, v. 6 75-82, 1995.

REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. **Helsinki: University of Helsinki**. p. 10–14,2005.

RODRIGUES, S. FERNANDES, F. A. N., BRITO, E. S. SOUZA, A. D. NARAIN, N. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 400-407, 2015.

RUFATO, A. R., ANTUNES, L. E. C. Técnicas de produção de framboesa e mirtilo. **Embrapa Clima Temperado**, 90p, 2016.

SANTOS, H., CAPELO, J. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. **Talanta**, v. 73, p. 795-802, 2007.

SILLANÄÄ, P. T., PHAN, T. D. SHRESTHA, R. A. Ultrasound technology in green chemistry. **SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability**, 2011.7

SILVA, A., Advances um phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 336-354, 2015.

SILVA, R. P. F. F., ROCHA-SANTOS, T. A. P., & DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

- SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M.; Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. **Trends Food Science Technology**, v. 21, p. 323. 2010
- SOUZA, A. D., MAIA, A. I. V., RODRIGUES, T. H. S., CANUTO, K. M., RIBEIRO, P. R. V., PEREIRA, R. C. A., VIEIRA, R. F., BRITO, E. S. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 91-103, 2016.
- SHIRSATH, S. R., SONOWAVE, S. H. GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – a review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10-23, 2012.
- TIWARI, B. K., PATRAS, A., BRUNTON, N., CULLEN P. J., O'donnell, C.P. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, v. 598-604, 2010.
- TIWARI, B. k. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100-109, 2015.
- TORRES, N. M., TALAVERA, T. A., ANDREWS, H. E., CONTRERAS, A. S., PACHECO, N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. **Agronomy**, v. 7, p. 1-19, 2017.
- TURK, M., PERINO, S., CENDRES, A., PETITCOLAS, E., SOUBRAT, T., CHEMAT, F., Alternative process for strawberry juice processing: Microwave hydrodiffusion and gravity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 84, p. 626-633, 2017.
- VIAN, M.A., FERNANDEZ, X., VISINONI, F. CHEMAT, F. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 14-17. 2008.
- XU, D. P., ZHENG, J., ZHOU, Y., LI Y., LI, S. LI, H.B. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinatum*: Optimization and comparison with conventional methods. **Food Chemistry**, v. 217, p. 559, 2017.
- ZILL-E-HUMA, VIAN, MAINGONNAT, J. F., CHEMAT, F. Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7700-7707, 2009.
- WANG, W., JUNG, J., TOMASINO, E., ZHAO, Y. Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. **LWT- Food Science and Technology**, v. 72, p. 229-238, 2016.
- WARNER, J. C., CANNON, A. S. DYE, K. M. Green Chemistry. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, p. 775-799, 2004.



