

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

Natiéli Piovesan

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS EM MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO (*Vaccinium
ashei Reade*) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Santa Maria, RS
2016

Natiéli Piovesan

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS EM MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade) E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Prof^ª.PhD. Leadir Lucy Marins Fries

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Piovesan , NATIÉLI
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS EM MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO (*Vaccinium
ashei* Reade) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA /
NATIÉLI Piovesan .- 2016.
120 p.; 30 cm

Orientador: Leadir Lucy Martins Fries
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Antioxidantes Naturais 2. Compostos Bioativos 3.
Mirtilo 4. Compostos Fenólicos I. Lucy Martins Fries,
Leadir II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Natiéli Piovesan. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Natiéli Piovesan

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS EM MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Aprovado em 29 de agosto de 2016:

Leadir Lucy Martins Fries, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Aline de Oliveira Fogaça, Dr^a.(UNIFRA)

Silvana Maria Michelin Bertagnolli, Dr^a.(UNIFRA)

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira, Dr^a.(UFSM)

Paulo Cezar Bastianello Campagnol, Dr.(UFSM)

Santa Maria, RS
2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais Amilton José Piovesan e Maria Elena Piovesan, por incansavelmente me incentivarem em busca do conhecimento; por terem me dado forças para seguir em frente sempre; por compartilharem comigo dos momentos bons e ruins, sempre com muito amor, carinho e dedicação. Amo vocês!! Meu mundo seria infinitamente pequeno sem vocês.

AGRADECIMENTOS

À *Deus e a Mãe, Rainha e Vencedora Três Vezes Admirável de Schoenstatt* pela força e persistência concedidas para seguir frente aos obstáculos encontrados ao longo dessa trajetória e por terem me guiado sempre.

À *minha família*, especialmente aos meus pais *Amilton e Maria Elena* por todo amor, apoio, por tudo que sempre me ensinaram e por me proporcionarem sempre às melhores condições de estudo, me incentivando nas minhas conquistas. Meus exemplos de vida, obrigada por tudo, simplesmente Amo vocês!!

Aos meus irmãos *Chaiana e Patrick* obrigada pela compreensão nas horas difíceis, por todo apoio e incentivo no meu crescimento e por torcerem para que tudo desse certo sempre. Chaia é meu exemplo de pessoa dedicada e estudiosa e o Patrick meu companheiro de sempre, Amo vocês infinitamente.

Ao amor da minha vida, *Michel Salles Heinsch*, obrigada por todo amor e incentivo, por me encorajar e me apoiar nos momentos mais difíceis. Obrigada por fazer parte da minha vida, te amo eternamente.

A minha querida orientadora, Professora *Leadir Lucy Martins Fries*, pela confiança na minha capacidade, pelas palavras de apoio e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional, agradeço pela orientação e por tudo que me ensinou até hoje. Obrigada pela sua dedicação, confiança, amizade e principalmente pelo bom convívio nestes muitos anos de trabalho.

A minha colega, amiga, irmã *Vanessa Bordin Viera*, que esteve comigo não só na execução desse trabalho, mas dividiu comigo horas de pesquisa e estudos, muitas viagens, conversas e conquistas. Companheira de muitas horas no laboratório, não se cansou de testar, repetir e discutir técnicas além de dividir todo seu conhecimento, sempre muito disposta e bem humorada. Vanessa obrigada pela amizade, confiança, e por seguir como minha “dupla inseparável”, este trabalho é nosso!!

Aos professores membros da banca *Dra. Aline Fogaça, Dra. Silvana Bertagnolli, Dra. Mari Silvia Rodrigues de Oliveira, Dr. Paulo Campagnol, Dr. Cristiano Augusto Ballus e Dr. Ernesto Hashime Kubota e demais professores da Pós-Graduação* pelas considerações e sugestões essenciais para esta tese, além de todo conhecimento transmitido.

Agradeço em especial ao professor *Dr. Renius Mello* pela realização da estatística desta tese, pela disposição, pelas horas de ensinamentos e discussões.

A todos meus *colegas de doutorado* por ter dividido da amizade e conhecimento. Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma na execução deste trabalho.

Agradeço às alunas estagiárias *Ana Laura Stiebe e Déborah Flores* pela ajuda no laboratório, pela dedicação, comprometimento e pela amizade.

Aos funcionários do departamento *Marialene, Moisés, Magé, Rosângela, Andressa, Liana e Carlos*, agradeço pela colaboração na realização deste trabalho, e por tornar os dias no departamento mais agradáveis e divertidos. Em especial agradeço a *Marta* pela paciência em me ouvir incansavelmente, por me encorajar em situações difíceis e por fazer o papel de mãe substituta.

Agradeço a *todos meus amigos* pela paciência e por muitas vezes entenderem a minha ausência nos encontros. Em especial agradeço a *Greici* pela amizade que ganhei e em tão pouco tempo, obrigada pelo apoio incondicional nas horas de desespero, pelos conselhos e pelas boas conversas.

Ao Laboratório de Química Industrial e Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS pelo empréstimo das micro-ondas focalizada e ultrassom para o desenvolvimento desta pesquisa.

A *CAPES/FAPERGS* pela bolsa de doutorado para a execução deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria por toda a aprendizagem.

Enfim, agradeço de coração a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação.

RESUMO

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS EM MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

AUTORA: Natiéli Piovesan

ORIENTADORA: Leadir Lucy Martins Fries

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes parâmetros (concentração de solvente, tempo, temperatura e potência) nos métodos de extração (assistida por micro-ondas focalizada, convencional e por ultrassom) de compostos bioativos de mirtilo, visando maior rendimento dos compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos. Os extratos foram caracterizados quanto o teor de fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais. As atividades antioxidante *in vitro* foram quantificadas pelos métodos de DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno, foi calculado o IC₅₀ e avaliada a atividade antimicrobiana. Os resultados encontrados para a extração através das micro-ondas focalizadas apontam que as atividades antioxidantes medidas por FRAP, ABTS⁺ e DPPH, compostos fenólicos totais e antocianinas totais apresentaram uma tendência linear positiva em relação à temperatura de extração, sem diferença significativa entre as concentrações dos solventes (60 e 80%). O IC₅₀ e o β -caroteno apresentaram maior inibição na temperatura de 60°C, porém estes somente nas condições de solvente 60% e 80%, respectivamente. Os flavonóides não tiveram diferenças significativas na temperatura de extração e nem no solvente utilizado. No método convencional de extração as melhores condições de extração para os compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas foi utilizando 60% de solvente, 60 minutos e à 40°C, porém as antocianinas, não sofreram influência do tempo e da temperatura. O melhores resultados para as atividades antioxidantes, pelos métodos DPPH e FRAP, foram obtidos com solvente 60%, 30 minutos e à 30°C, sendo que o DPPH não foi influenciado pela temperatura. Para o ABTS⁺ os melhores rendimentos foram com 60% solvente, 120 minutos e à 40°C, enquanto que para o β -caroteno, 80% de solvente a 40°C, independentemente do tempo. O ultrassom proporcionou melhores condições de extração de fenólicos, flavonóides e antocianinas utilizando 60% de solvente, 20 minutos e 80 W de potência, sendo que os compostos fenólicos não sofreram influência da potência e os flavonoides não foram influenciados pelo solvente. A atividade antioxidante pelo método DPPH e o IC₅₀ apresentaram os melhores resultados com 60% de solvente, 60 minutos e 80 W de potência, as mesmas condições foram encontradas para o β -caroteno, porém com 20 minutos de extração. A metodologia de FRAP apresentou-se mais eficiente com solvente 60%, 60 minutos e 220W de potência, enquanto que para o método ABTS⁺ foi com 80% de solvente e 80 W de potência, independente do tempo de extração. Os extratos obtidos através das diferentes metodologias de extração não apresentaram atividade antimicrobiana. Contudo, o estudo confirma a capacidade antioxidante do mirtilo, podendo este ser utilizado como ingrediente funcional ou como antioxidante natural na elaboração de produtos alimentícios.

Palavras-chave: Mirtilo. Compostos bioativos. Atividade antioxidante. Fenólicos totais. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

INFLUENCE OF DIFFERENT PARAMETERS IN BLUEBERRY BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION METHODS (*Vaccinium ashei* Reade) AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

AUTHOR: Natiéli Piovesan

ADVISER: Leadir Lucy Martins Fries

This study aimed to investigate the influence of different parameters (concentration of solvent, time, temperature and power) in extraction methods (focused microwave, conventional and ultrasound) bioactive compounds in blueberries, seeking higher yield of compounds biativos, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts. The extracts were characterized regarding the phenolic compounds, flavonoid and anthocyanins content. The *in vitro* antioxidant activity was quantified by the methods of DPPH, ABTS, FRAP, and β -carotene, was calculated the IC₅₀ and evaluated the antimicrobial activity. The results for focused microwave extraction generally indicated that the antioxidant activity (FRAP, ABTS and DPPH), total phenolics and total anthocyanins showed a positive linear trend in relation to the extraction temperature, with no significant difference between the solvent concentrations (60 and 80%). The IC₅₀ and β -carotene showed the greatest inhibition at 60°C at solvent concentrations of 60% and 80%, respectively. The flavonoids showed no significant difference in terms of the extraction temperature or the concentration of solvent that was used. No antimicrobial activity was detected in the extracts in relation to the tested microorganisms. In the conventional method of extracting the best extraction conditions for phenolic compounds, flavonoids and anthocyanin employed 60% solvent, 60 minutes at 40°C; however, the anthocyanins did not suffer any influence from time and temperature. The best results for the antioxidant activity using the DPPH and FRAP methods were obtained with 60% solvent, 30 minutes at 30°C, and the DPPH was not influenced by temperature. Regarding ABTS⁺ the best results were reached with 60% solvent, 120 minutes, at 40°C, while the β -carotene required 80% solvent at 40°C, regardless of the time. The different extracts tested did not show antimicrobial activity. Ultrasound provided better phenolic extraction conditions, flavonoids and anthocyanins using 60% solvent, 20 minutes and 80 watts of power, and phenolic compounds not influenced by the power and flavonoids were not affected by the solvent. The antioxidant activity by DPPH and IC₅₀ showed the best results com 60% solvent, 60 minutes and 80 W of power, the same conditions were found for β -carotene, but with 20 minutes of extraction. FRAP methodology is presented more efficient solvent 60%, 60 minutes and 220W power, whereas for the ABTS assay was 80% solvent and 80 W of power, independent of the extraction time. The extracts obtained through different methods of extraction showed no antimicrobial activity. However, the study confirms the antioxidant capacity of blueberries, which can be used as a functional ingredient or as a natural antioxidant in the preparation of food products.

Keywords: Blueberry. Bioactive compounds. Antioxidant activity. Total phenolics. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –Fruto de Mirtilo (<i>Vaccinium ashei</i> Reade).....	19
Figura 2 –Extração convencional de compostos bioativos do mirtilo em banho ultratermostatizado e agitador	21
Figura 3 - Forno micro-ondas focalizada utilizado na extração de compostos bioativos do mirtilo	23
Figura 4 - Extração de compostos bioativos do mirtilo em banho de ultrassom.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 OXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	14
2.2 ANTIOXIDANTES.....	15
2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	17
2.4 MIRTILO.....	18
2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	20
2.5.1 Extração convencional.....	20
2.5.2 Extração assistida por micro-ondas focalizada.....	22
2.5.3 Extração por ultrassom.....	23
3. DESENVOLVIMENTO	26
<i>MANUSCRITO 1- MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM BLUEBERRY (Vaccinium ashei Reade) AND THEIR ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CAPACITY</i>	26
Abstract.....	28
Introduction.....	29
Materials and Methods.....	30
Results and discussion.....	36
Conclusion.....	41
References.....	42
<i>MANUSCRITO 2 - INFLUENCE OF DIFFERENT PARAMETERS IN THE BLUEBERRY (Vaccinium ashei Reade) BIOACTIVE COMPOUND EXTRACTION AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CAPABILITY</i>	52
Abstract.....	54
Introduction.....	55
Materials and methods.....	56
Results and discussion.....	62
Conclusion.....	68
References.....	69
<i>MANUSCRITO 3 - INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS NA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MIRTILO (Vaccinium ashei Reade) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE</i>	80
Resumo.....	82
Introdução.....	83
Materiais e Métodos.....	84
Resultados e Discussão.....	90
Conclusão.....	96

References	96
4 DISCUSSÃO GERAL.....	108
5 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1 INTRODUÇÃO

Os compostos de ação antioxidante utilizados pelas indústrias de alimentos podem ser sintéticos ou naturais, sendo que os de maior utilização são os de natureza sintética. Contudo, a salubridade de alguns antioxidantes sintéticos vem sendo questionada, pois existem estudos demonstrando que os mesmos podem favorecer efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001; MERCADANTE et al., 2010). Com o objetivo de evitar ou controlar a oxidação lipídica e com isso evitar a rancificação, garantir maior estabilidade da cor e estender a vida de prateleira dos alimentos, as indústrias fazem uso de substâncias com propriedades antioxidantes.

Os antioxidantes naturais apresentam-se como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos, minimizando assim os danos que esses compostos oxidativos causariam nos seres humanos (MELO; GUERRA, 2002). Quando comparado com aproximadamente quarenta frutas e hortaliças, o mirtilo apresentou o maior valor de atividade antioxidante (PAYNE, 2005), o que tem despertado o interesse dos consumidores nessa fruta.

O mirtilo ganhou um notável interesse em todo mundo devido às suas excelentes propriedades sensoriais e a presença de componentes saudáveis (SCALZO; STEVENSON; HEDDERLEY, 2013). Mirtilos são ricos em compostos fenólicos, principalmente os ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico e seus derivados, tais como ácidos clorogênico, cafeico, gálico, p-cumárico, ferúlico, elágico, siríngico, vanílico (MATTILA; HELLSTRÖM; TÖRRÖNEN, 2006; RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2012). Também acumulam flavonoides (principalmente derivados de quercetina), antocianinas e proantocianidinas (BROWNMILLER; HOWARD; PRIOR, 2009; TÖRRÖNEN, 2000; CHO et al., 2004; HÄKKINEN; WANG et al., 2008). Os compostos fenólicos são os responsáveis pela alta capacidade de eliminação de radicais livres, além disso, as propriedades sensoriais de frutas são fundamentais para determinar a preferência dos consumidores.

Muitos fatores podem influenciar na extração de compostos bioativos, tais como: a metodologia de extração, a natureza da matriz vegetal, o tamanho das partículas, o solvente e a concentração utilizada, o tempo e a temperatura de extração (ANDREO; JORGE, 2006),

Diante do conhecimento da alta capacidade antioxidante do mirtilo, aliado à crescente preocupação dos consumidores com a substituição dos antioxidantes sintéticos por naturais, pretende-se estudar a influência de diferentes parâmetros de extração em diferentes métodos

(micro-ondas focalizada, ultrassom e convencional) na extração de compostos bioativos do mirtilo a fim de determinar quais as condições de extração que proporcionam maior rendimento de compostos bioativos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de diferentes parâmetros em métodos de extração de compostos bioativos de mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*), e quantificar a capacidade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* dos extratos obtidos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos de mirtilo através de micro-ondas focalizada, ultrassom e método convencional de extração;
- Avaliar a influência de diferentes parâmetros (tempo, temperatura, concentração de solvente e potência) na extração de compostos bioativos;
- Quantificar o conteúdo dos compostos bioativos (fenólicos, flavonoides e antocianinas totais) dos diferentes extratos de mirtilo, a fim de obter o melhor rendimento de compostos bioativos;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos, através das metodologias de DPPH, FRAP, ABTS e β -Caroteno
- Avaliar atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos obtidos frente a espécies de micro-organismos de importância em alimentos;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A principal causa de deterioração em alimentos é a oxidação lipídica, que se trata de um complexo processo em que ocorre a reação dos ácidos graxos insaturados com o oxigênio molecular por meio de um mecanismo de radicais livres em cadeia, formando hidroperóxidos e desenvolvendo um mecanismo em cadeia (GRAY, 1978). Associado à oxidação lipídica envolvem-se problemas como alterações de sabor, perda de valor nutritivo e segurança alimentar, danos biológicos e alterações de propriedades funcionais (FRANKEL, 1984).

Segundo Gardini (2001), a oxidação lipídica pode desencadear várias reações secundárias com a formação de radicais livres. Além da formação de compostos “*off flavor*”, outras reações podem afetar a segurança e a estabilidade do produto, resultando em perdas de nutrientes e promovendo mais reações oxidativas. Enquanto as reações deteriorativas (microbiológicas e enzimáticas) em alimentos podem ser inibidas com o emprego de baixas temperaturas, a oxidação lipídica ocorre normalmente a temperaturas de congelamento embora numa velocidade reduzida.

O processo de oxidação lipídica afeta os ácidos graxos insaturados e ocorre na forma de reação em cadeia que se divide em três fases: iniciação, propagação ou auto-oxidação e terminação (COUPLAND; Mc CLEMENTS, 1996; HOAC et al., 2006; PEREIRA DE ABREU et al., 2010).

Os produtos da fase inicial da oxidação (produtos primários de oxidação) são os hidroperóxidos, compostos não voláteis, sem odor e relativamente instáveis, que são formados quando o oxigênio molecular e os ácidos graxos insaturados reagem na presença de um iniciador ou catalisador (ferro, cobre, enzimas, luz, calor, etc.). Durante a fase de propagação, estes hidroperóxidos podem reagir com outros radicais e então se combinar com as gorduras para formar produtos reativos adicionais e/ou então se decompor levando a formação de produtos secundários de oxidação, como alcanos, alcenos, aldeídos, cetonas e alcoóis. Estes compostos são voláteis e responsáveis por alterações no odor dos alimentos como o aparecimento do odor a ranço (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2008; PEREIRA DE ABREU et al., 2010).

A reação em cadeia de oxidação só terá fim quando os radicais livres forem removidos através de reação com antioxidantes ou por reações em si, formando compostos estáveis e não reativos (HOAC et al., 2006).

A taxa de oxidação lipídica de um alimento pode ser influenciada por vários fatores, como: a composição de ácidos graxos desse alimento, o grau de divisão dos componentes, a presença e concentração de oxigênio, calor, luz, presença de metais de transição e a presença e quantidade de agentes antioxidantes naturais ou adicionados (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2008; ARAÚJO, 2011; WARAHO; Mc CLEMENTS; DECKER, 2011).

A preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem dos produtos. Deste conjunto de ações, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática bastante eficiente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência e ausência reconhecida de toxicidade, são premissas para a sua seleção e utilização a nível industrial (CASTERA-ROSSIGNOL, 1994).

2.2 ANTIOXIDANTES

Em alimentos, os antioxidantes podem ser definidos como compostos ou sistemas capazes de inibir ou retardar a formação de radicais livres e, conseqüentemente o desenvolvimento de rancidez, odores desagradáveis e deterioração oxidativa (BREWER, 2011; POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2008). Os antioxidantes devem ter propriedades desejáveis como ausência de efeitos na cor, no odor, no sabor, devem ser eficientes em baixas concentrações, estabilidade nas condições de processo e armazenamento, compatibilidade com o alimento e o composto e seus produtos de oxidação não devem ser tóxicos, mesmo em doses altas que normalmente seriam ingeridas com os alimentos (CHIATTONE, 2010).

Os compostos antioxidantes são classificados segundo sua forma de ação propetora em antioxidantes primários e antioxidantes secundários. Os antioxidantes primários interrompem a reação em cadeia através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, formados durante a iniciação ou propagação da reação, convertendo-se em produtos termodinamicamente estáveis. Como exemplos citam-se o butil-hidroxianisol, butil hidroxitolueno, ésteres do ácido gálico, butil hidroquinona, tocoferol e flavanóides (KAHL; HILDEBRANDT, 1986). Já os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem: complexação com metais catalisadores da reação, sequestro de

oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (PADILHA, 2007).

Quanto à origem das substâncias antioxidantes, podem ser divididos em antioxidantes sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos são adicionados aos alimentos com o intuito de reforçar a proteção contra a oxidação lipídica, uma vez que o processamento pode causar a inativação dos antioxidantes naturalmente presentes. Os mais usados em alimentos são o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e ésteres do ácido gálico (GP) (CAPITANI et al., 2009).

Apesar de bastante utilizados, a salubridade de alguns antioxidantes sintéticos vem sendo questionada, uma vez que estes compostos podem favorecer efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (BUXIANG; FUKUHARA, 1997; BIRCH et al., 2001; MERCADANTE et al., 2010). Em função disso, muitos estudos têm se dirigido com o intuito de descobrir possíveis fontes de antioxidantes naturais e avaliar a ação destes em alimentos (BIRCH et al., 2001; PEREIRA DE ABREU et al., 2010; BREWER, 2011; SELANI et al., 2011).

O termo antioxidante natural é geralmente empregado para definir antioxidantes que ocorrem naturalmente e que podem ser extraídos de plantas ou tecidos animais (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2008). Os principais antioxidantes naturais usados em alimentos são o ácido ascórbico, os carotenoides e os compostos fenólicos (tocoferóis, flavonoides e ácidos fenólicos) (CHOE; MIN, 2009; BREWER, 2011).

A determinação da atividade antioxidante de produtos naturais teve início com Chipault et al. (1952) em especiarias, ingredientes utilizados em alimentos desde os primórdios da história, não somente para melhorar ou ressaltar as características sensoriais dos alimentos, mas também, para preservá-los.

Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes. Esses antioxidantes podem funcionar como agentes redutores, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes (PRATT, 1992; RICE-EVANS et al., 1995; KAHKONEN et al., 1999).

As plantas têm excelentes propriedades antioxidantes e seus efeitos estão principalmente atribuídos aos constituintes fenólicos. Além disso, estes compostos podem reter ou retardar o

início da oxidação lipídica, influenciando tanto na decomposição de hidroperóxidos nos alimentos, como também, em tecidos animais (WETTASINGHE e SHAHIDI, 1999).

Atualmente, diversos estudos têm sido realizados visando verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos, largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por aumentarem a vida útil de muitos produtos, nota-se que a aplicação de antioxidantes naturais tem abrangido toda a cadeia de produção alimentícia, não se restringindo apenas nos produtos finais (DURAN; PADILLA, 1993; PEREIRA, 2009).

2.3 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As capacidades antioxidantes de amostras como plantas e frutas podem ser influenciadas por muitos fatores, tais como métodos de extração e/ou métodos utilizados para quantificação, portanto é necessário executar diferentes avaliações para avaliar os diversos mecanismos de ação que esses podem desenvolver. A maioria das análises realizadas utiliza processos oxidativos, os quais envolvem a adição de um agente iniciador para acelerar o processo, como temperatura, agitação, disponibilidade de oxigênio, metal de transição ou mesmo exposição à luz (ANTOLOVICH et al., 2002).

A atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) pode ser expressa de duas formas, utilizando uma curva padrão com o antioxidante sintético Trolox, composto análogo a vitamina E, porém, solúvel em substâncias polares, ou através de equações para determinação da atividade antioxidante, porém o princípio da reação em ambas às análises é o mesmo (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio, esse radical é reduzido e a intensidade de absorção diminui. Quanto maior a presença de compostos com o poder de doar esse hidrogênio maior é a perda de coloração, transformando a solução de coloração violeta a amarela (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

O método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico) determina a atividade antioxidante total pela captura do radical $ABTS^+$. O princípio de reação é semelhante ao método DPPH, porém o radical $ABTS^+$ é formado no início da análise, ao contrário do DPPH que já é adquirido na sua forma radicalar. A principal diferença entre os dois radicais, é que o radical

DPPH é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o ABTS⁺ é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise de amostras tanto hidrofílicas como lipofílicas (RUFINO et al., 2007).

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), também está sendo muito utilizado entre as análises antioxidantes por ser uma análise que envolve a redução do Fe³⁺ a Fe²⁺. Essa reação ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5- triazina (TPTZ) em condições ácidas, onde ocorre a formação de um complexo corado. Assim este complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ) na presença de um antioxidante (RUFINO et al., 2006).

Por fim, o método de descoloramento do β-caroteno/ácido linoleico é avaliado pela adição de uma amostra que contenha compostos antioxidantes que reagem com o radical peroxil. O resultado é a peroxidação do ácido linoleico devido às condições favoráveis, e assim previne que esse radical abstraia o hidrogênio da molécula instaurada do β-caroteno, contribuindo para retardar o decaimento da coloração do β-caroteno, conseqüentemente se defendendo contra o ataque dos radicais livres. Sendo assim, quanto menor for a queda de coloração maior será a atividade antioxidante da amostra analisada (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

2.4 MIRTILO

As designações “pequenas frutas” (*smallfruits*) e berries são utilizadas na literatura internacional para referenciar diversas culturas como a do morangueiro, amoreira-preta, framboeseira, groselheira, mirtilheiro, entre outros (ANTUNES, 2002). Estas pequenas frutas constituem-se em fontes naturais de substâncias bioativas, com ação antioxidante e anticancerígena, chamando atenção dos consumidores que buscam uma melhor qualidade de vida. Extratos de pequenas frutas, como mirtilo, amora-preta, framboesa, pitanga e groselha têm sido considerados eficazes no combate aos radicais livres (PANTELIDIS et al., 2007).

Mirtilos são pequenos frutos nativos dos Estados Unidos, pertencentes ao gênero *Vaccinium*, e a família *Ericaceae*. No Brasil, as primeiras plantas foram trazidas em 1980 pela EMBRAPA - Clima Temperado (Pelotas-RS), para avaliação de variedades, sendo introduzidas coleções de cultivares de baixa exigência em frio, pertencentes ao grupo “Rabbiteye”. A primeira

iniciativa comercial no País começou a partir de 1990, em Vacaria (RS), através da introdução de variedades do grupo “Highbush” (ANTUNES; RASEIRA, 2006; MORAES et al., 2007).

A produção de mirtilos (Figura 1) no Brasil ocorre principalmente em pequenas propriedades, com poucos empreendimentos em grande escala e atualmente, as plantações estão concentradas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Apesar de não existirem estatísticas oficiais atualizadas, estima-se que a área plantada com mirtilos no Brasil seja de 400 hectares aproximadamente (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014).

Figura 1- Fruto de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

De sabor ligeiramente agridoce, os mirtilos apresentam coloração avermelhada a azulada quando maduros e são cobertos por uma cera denominada pruína. Estes pequenos frutos são conhecidos por suas propriedades nutracêuticas, atribuídas ao alto teor e grande diversidade de antioxidantes naturais e polifenóis, ultrapassando outros alimentos funcionais. Os mirtilos também são ricos em vitaminas e minerais. O consumo de mirtilos frescos está comprovadamente associado à prevenção de doenças como câncer, problemas cardiovasculares, deterioração cognitiva, disfunções da imunidade, catarata e degeneração macular (SEVERO et al., 2008).

Outras partes da planta também possuem propriedades medicinais, podendo ser utilizadas folhas, flores e raízes no preparo de chás e extratos. No entanto, os frutos são os órgãos que contêm mais antioxidantes. Nos últimos anos, os mirtilos têm-se popularizado tanto pelas suas

propriedades medicinais quanto pela sua grande versatilidade culinária, passando a ser um ingrediente muito procurado em todo o mundo para elaboração de pratos da alta gastronomia, e utilizados também na fabricação de chás, tortas, bolos, pudins, biscoitos, sorvetes, geleias e compotas (CANTUARIAS-AVILÉS, 2010).

É conhecido como “fruto da longevidade”, devido a sua elevada capacidade antioxidante sobre radicais livres e espécies reativas, como apontado através de estudos realizados *in vitro*. Sua disponibilidade e versatilidade permitem que o mirtilo seja incorporado em uma ampla variedade de formulações. Recheios com pedaços ou partes de mirtilo oferecem um apelo visual especial a vários produtos (PAYNE, 2005).

Um fator importante para o aumento das áreas cultivadas com mirtilo é o crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e em compostos fenólicos e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (WOLFE et al., 2003; MANACH et al., 2004).

2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

2.5.1 Extração convencional

A extração convencional (Figura 2) normalmente é realizada empregando solventes orgânicos e geralmente é combinada com agitação e/ou aquecimento. O solvente utilizado na extração pode influenciar significativamente no nível dos componentes recuperados, dessa forma pode determinar a atividade antioxidante dos extratos obtidos. Água, metanol, etanol, acetona, soluções aquosas destes solventes e acetato de etila são comumente usados como solventes de extração (HAYOUNI et al., 2007; GONZÁLEZ-MONTELONGO et al. 2010). Outros fatores, como temperatura e tempo de extração, a proporção líquido-sólido e a cultivar, também afetam a extração com solventes.

O tempo de extração pode afetar a recuperação dos polifenóis, sendo que este pode variar entre 1 minuto e 24 horas. No entanto, longos períodos aumentam a possibilidade de oxidação dos fenólicos exigindo que agentes redutores sejam adicionados ao solvente do sistema (SHAIDI;

NACZK, 1995). A decomposição térmica tem sido apontada como a maior causadora da redução do conteúdo de polifenóis durante a desidratação e a extração das amostras. Os fenóis também podem reagir com outros componentes e impedir sua extração, desta forma, o conteúdo total de fenólicos, pode diminuir com o aumento da temperatura (CONDE et al., 1998).

A extração convencional de substâncias antioxidantes com solventes orgânicos pode ser eficiente para alguns casos, porém torna-se agressiva ao ambiente devido aos resíduos gerados durante o uso de substâncias tóxicas. Também exige controle rigoroso de fatores como, a polaridade do solvente utilizado, o tempo e a temperatura de extração, pois pode ocorrer perda ou destruição dos compostos antioxidantes (ANDREO; JORGE, 2006).

Figura 2- Extração convencional de compostos bioativos do mirtilo em banho ultratermostatizado e agitador.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

Estudos realizados por Rockenbach et al. (2008) investigaram a influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota e verificaram que o sistema de solvente influencia diretamente nos conteúdos de fenólicos totais, antocianinas e na atividade antioxidante dos extratos.

Piljac-Zegarac, Belcak e Piljac (2009) estudaram a capacidade antioxidante e o teor de polifenóis de infusões de folhas preparadas a partir de seis cultivares de mirtilo e observaram que o tempo de extração tem influência sobre os compostos extraídos.

Spagolla et al. (2009) avaliaram teores de compostos fenólicos e de flavonóides, bem como a relação destes compostos com a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos preparados a partir de frutas de mirtilo cv. "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) em diferentes proporções de álcool (etanol ou metanol) em água deionizada. Os resultados apontam que o tipo de solvente e a concentração utilizada afetam a extração desses compostos.

Por estas razões devem ser realizados estudos comparativos para cada substrato, aperfeiçoando os vários fatores que podem afetar a eficiência da extração, e assim identificar as condições de extração que proporcionem a máxima extração de compostos bioativos para a obtenção da maior atividade antioxidante.

2.5.2 Extração assistida por micro-ondas focalizada

A energia de micro-ondas é uma radiação não ionizante que causa o aquecimento por migração dos íons e rotação das moléculas com momentos dipolos, não causando mudanças na estrutura molecular (SANSEVERINO, 2002).

Segundo Cravoto et al. (2008) a extração assistida por micro-ondas apresenta vantagens como: o aquecimento mais rápido para a extração de substâncias bioativas de materiais de plantas, o aumento do rendimento de extrato e redução do tempo de extração. Além disso, é reconhecida como uma tecnologia verde, pois reduz a utilização de um solvente orgânico (ALUPULUI, 2012).

Em matriz vegetal, a alta quantidade de água absorve fortemente a energia de micro-onda, ocorrendo um aquecimento interno, levando ao rompimento celular e facilitando o processo de extração. Além de ocorrer a migração dos íons dissolvidos, o que aumenta a penetração do solvente dentro da matriz e facilita a liberação dos compostos aumentando o rendimento da extração (WANG; WELLER, 2006; SPIGNO; FAVERI, 2009).

O forno de micro-ondas focalizadas (Figura 3) possui um dispositivo que mede a temperatura interior, além de se caracterizar por incidir uniformemente, mas não de maneira contínua as micro-ondas. É possível pelo painel de controle, localizado na parte externa do forno, programar e monitorar a temperatura e o tempo desejados para cada processo (MATSUI, 2006).

Figura 3 – Forno micro-ondas focalizada utilizado na extração de compostos bioativos do mirtilo.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

O micro-ondas possui um magnetron que propaga as ondas geradas por meio de um guia de ondas até a cavidade, sendo a quantidade de energia das micro-ondas incidentes controladas pela abertura de fendas posicionadas em cada cavidade. A potência e o tempo de abertura de cada fenda são estabelecidos pela temperatura selecionada na programação do equipamento. Abaixo de cada frasco reacional estão os sensores de infravermelho que possibilitam o controle de temperatura (OUFNAC et al., 2007).

Muitos estudos utilizando o micro-ondas têm sido realizados para extrair compostos como polifenóis e cafeína de folhas de chá verde (PAN; NIU; LIU, 2003), compostos fenólicos em resíduos de batata (WU et al., 2012), polifenóis de cascas de laranja (NAYAK et al., 2015), fenólicos totais de extratos de folhas de *Myrtus communis* (DAHMOUNE et al., 2015), fenólicos e flavonóides totais de sementes de coentros (ZEKOVIC et al., 2016). Estes estudos demonstram que a extração de compostos bioativos assistida por micro-ondas a partir de materiais consomem menos solvente de extração e economia de tempo.

2.5.3 Extração por ultrassom

O ultrassom é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano. Estas ondas sonoras criam uma variação na pressão do líquido empregado no processo, gerando cavitação. Nos aparelhos de ultrassom a

energia ultra-sônica é produzida por uma cerâmica pizoelétrica disposta entre duas chapas metálica (transdutor pizoelétrico) (MELECCHI, 2005).

A eficiência da extração assistida por ultrassom (Figura 4) ocorre devido à cavitação acústica no solvente pela passagem de uma onda ultrassônica, permitindo uma maior penetração do solvente na amostra, aumentando a superfície de contato entre o sólido e a fase líquida (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003). A cavitação forma microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, fazendo com que haja ciclos de expansão e compressão até que as bolhas implodem, liberando grandes quantidades de calor ocasionando o aumento da pressão na região próxima a implosão, gerando aumento da turbulência do líquido, ocasionando o rompimento das células vegetais e facilitando a difusão do solvente para o interior da matriz que junto ao calor liberado pela implosão aumenta a solubilidade dos analitos, aumentando a eficiência da extração (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE; PERALBO-MOLINA, 2011).

Figura 4 – Extração de compostos bioativos do mirtilo em banho de ultrassom.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

O ultrassom apresenta vantagens como alta reprodutibilidade e eficiência, possibilidade de utilização para uma ampla gama de tamanhos de amostra, menor tempo de extração, menor volume de solvente e baixo custo (KOH, 1983; SARGENTI et al., 2000), podendo ser realizada em temperaturas que não danifiquem o extrato (CHARPE; RATHOD, 2012).

Vários fatores podem afetar o processo de extração assistida por ultrassom: intensidade da onda sonora, tempo de exposição à frequência sonora, temperatura do processo, granulometria da amostra entre outros (TAO et al., 2014). O ultrassom é utilizado para extração de uma vasta gama de compostos alimentares, tais como pigmentos, aromas, antioxidantes e outros compostos

orgânicos e minerais oriundos de diversas matrizes (tecido, principalmente de origem animal, alimentos e materiais de plantas) (CHEMAT; ZILL; KHAN, 2011). Segundo Paniwnyk et al. (2001) a extração com ultrassom tem se mostrado eficaz até um volume de 125 L de solvente, indicando o seu potencial para a utilização em escala comercial.

Buscando melhorar a eficiência do processo de extração, diversos trabalhos têm reportado a utilização de ultrassom para extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais. Wang e Helliwell (2001) estudaram a extração de quercetina, miricetina e campferol em chá verde e preto. Skerget et al. (2005) aplicaram banho de ultrassom para extrair fenólicos e flavonóides em plantas de louro, oliveira e orégano. Canuto et al. (2010) extraíram utilizando ultrassom compostos fenólicos de polpa de frutos da Amazônia, tais como açaí, acerola, bacuri e murici. Wang et al. (2013) extraíram compostos fenólicos em jabuticaba.

Heffels, Weber e Schieber (2015) estudaram a influência da aceleração de extração assistida por ultrassom usando duas composições de solventes sobre o perfil de antocianina de diferentes espécies de mirtilos. Antocianinas totais e compostos fenólicos de mirtilos (*Vaccinium ashei*) foram extraídos utilizando ultrassom. O processo foi otimizado em relação à temperatura, proporção líquido-sólido e ao tempo de extração (HE et al., 2016).

3. DESENVOLVIMENTO

MANUSCRITO 1

**MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS
FROM BLUEBERRY (*Vaccinium ashei* Reade) AND THEIR
ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CAPACITY**

Artigo Submetido para a Revista International Food Research Journal (IFRJ)

(Formatado conforme as normas da revista)

ORIGINAL ARTICLE

Microwave-assisted extraction of bioactive compounds from blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) and their antioxidant and antimicrobial capacity

^{1,*}Piovesan, N., ¹Viera, V.B., ¹Mello, R. de O., ²Santos, R.C. V dos., ³Vaucher, R. de A., ⁴Dressler, V.L., ⁴Bizzi, C. A., ¹Fries, L. L. M.

¹Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Biomedicine Course, Health Sciences, Centro Universitário Franciscano - UNIFRA, RS, Brazil.

⁴Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author: Email: natipiovesan@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the content of phenolic compounds, flavonoids and total anthocyanins, as well as the antioxidant and antimicrobial activity of blueberry extracts (*Vaccinium ashei* Reade) of the Climax variety. The extracts were obtained by focused microwave extraction at different temperatures (30, 40, 50 and 60°C) and solvent concentrations (60% and 80% hydroethanolic). The antioxidant activity of the extracts was quantified by the DPPH radical sequestration method, inhibition of auto-oxidation of the β -carotene system, ABTS⁺, FRAP and IC₅₀. The antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion method. The antioxidant activity (FRAP, ABTS⁺ and DPPH), total phenolics and total anthocyanins showed a positive linear trend in relation to the extraction temperature, with no significant difference between the solvent concentrations (60 and 80%). The IC₅₀ and β -carotene showed the greatest inhibition at 60°C at solvent concentrations of 60% and 80%, respectively. The flavonoids showed no significant difference in terms of the extraction temperature or the concentration of solvent that was used. No antimicrobial activity was detected in the extracts in relation to the tested microorganisms. The results showed a positive correlation between the total phenolic content and the determined antioxidant activities. This study confirms the potential of this fruit as a source of phenolic compounds with high antioxidant activity and it also provides a new and efficient technique to extract bioactive compounds using microwaves.

Keywords: natural antioxidant, blueberry, microwave.

Introduction

Chemical preservatives are commonly added to foods to enhance microbiological food safety. However, consumers are increasingly concerned about the potential harmful effects of chemical preservatives and prefer foods containing no chemical preservatives (Marta *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2008).

Berries are rich in phenolics and have been reported to protect against cancer and cardiovascular diseases (Almeida *et al.*, 2006; Serafini *et al.*, 2009).

Blueberries have been commercially produced for many years in North America, and nowadays blueberries are cultivated worldwide. Many studies reported that blueberries contain health-promoting compounds including phenolic acids and flavonoids, such as chlorogenic acid, ellagic acid, quercetin, and quercetin-3-galactoside (McDougall *et al.*, 2005; Michelle *et al.*, 2011; Talcott and Lee, 2002).

Natural antioxidants are an alternative to prevent the oxidative deterioration of foods, minimizing the oxidative damage that these compounds cause in humans (Melo and Guerra, 2002).

Several extraction techniques are widely used for the isolation of bioactive substances from natural substances. However, these techniques are generally time-consuming and must be carefully controlled because they are likely to cause degradation or unwanted chemical changes in products (Cravotto *et al.*, 2008).

Microwave-assisted extraction has been reported to improve the extraction efficiency of trace compounds in foods. It is recognized as a highly efficient technique because it reduces the extraction time and increases the quality of extracts (Cravotto *et al.*, 2008).

This study investigated the extraction of bioactive compounds from blueberries using focused microwave with different concentrations of solvent and extraction temperatures to develop the use of blueberries as antioxidants in food.

Materials and Methods

Raw materials

The blueberry samples (*Vaccinium ashei Reade*) were of the Climax variety and were acquired from the Vale do Dourado Orchard located in the municipality of Erechim (RS), Brazil, where the fruits are grown through an organic production system.

The selected, cleaned and sanitized fruits were dehydrated in an oven with forced air circulation at 50°C for 48 hours. The fruits were then ground in an analytical mill cooled to 4°C (Quimis, Q298A21 model, Brazil) with the aid of an ultrasonic thermostatic bath (Solab, SL-152/10 model) and then stored in amber bottles at -18°C, to obtain the extracts.

Obtaining the extracts – microwave-assisted focused extraction

For the microwave-assisted focused extraction the procedures for the digestion of samples described by Costa *et al.* (2006) were used, with modifications. The extraction time was set at 20 minutes in accordance with Viera (2012). The extractions were performed in a microwave oven with two cavities equipped with glass bottles with a maximum capacity of 180 mL (Star System 2, 800W, CEM, Matthews, N.C., USA).

The milled samples were initially weighed and transferred to the glass jars. The solvent 1:10 (w/v) was added and subjected to heating by microwave radiation for 20 minutes. Eight

treatments were performed in three replications, varying the solvent concentration (60% and 80% hydroethanolic) and extraction temperature (30°C, 40°C, 50°C and 60°C).

After the extraction, the extracts were filtered and centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes. The supernatants were then placed in amber vials and stored in a freezer (-18°C) until analysis. At the end of each extraction the apparatus was decontaminated with 10 mL of AP alcohol for 10 minutes.

Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content in the extracts was determined by the Folin–Ciocalteu method Roesler (2007). Briefly, 200 µL of extract was mixed with 1000 µL of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. The solutions were mixed thoroughly and incubated at room temperature (27°C) for 5 min. After incubation, 800 µL of 7.5% sodium carbonate (Na₂CO₃) solution was added and again incubated in a water bath at 50°C for 5 min. The absorbance of the reaction mixtures was measured at 765 nm using a UV–Vis spectrophotometer (Biospectro, model: SP - 220). The absorbance of the extract was compared with a gallic acid standard curve for estimating the concentration of TPC in the sample. The TPC was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

Determination of flavonoid content

The total flavonoid content was determined using the colorimetric assay developed by Zhishen *et al.* (1999). A known volume (0.5 mL) of the extract was added to a test tube and at zero time, 150 µL of 5% NaNO₂ was added. After 5 min, 150 µL of 10% AlCl₃ was added and after 6min, 1 mL of 1 M NaOH was added, followed by the addition of 1.2 mL of distilled water. Absorbance at 510 nm was used for UV/Vis spectra recording, using an spectrophotometer

(Biospectro, model: SP - 220). The absorbance of the extract was compared with a quercetin standard curve for estimating the concentration of flavonoid content in the sample. The flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

Determination of total anthocyanin content

The anthocyanin content was determined by the pH-differential method (Giusti and Wrolstad, 2001). Each extract (0.5 mL) was separately diluted with 2.5 mL of 0.025M potassium chloride buffer, pH 1.0 and 0.4M sodium acetate buffer, pH 4.5. The diluted solutions were then left at room temperature for 15 min and the absorbance of each dilution was read at 520 and 700 nm against a blank cell filled with distilled water. The anthocyanin content was calculated using the following equation:

$$\text{Anthocyanins content}_{(mg/100g\text{ of dry matter})} = A \times MW \times DF \div (\epsilon \times W)$$

Where: A = absorbance $(A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$, MW= molecular weight of cyanidin-3-glucoside ($C_{15}H_{11}O_6$, 449.2), DF = dilution factor, ϵ = molar absorptivity (26900), and W= sample weight (g).

In vitro antioxidant assays

DPPH assay

The radical scavenging activity of the extracts in relation to the DPPH radical was measured using the method of Brand-Williams *et al.* (1995), modified as follows: an aliquot (0.5 mL) of methanolic solution containing different concentrations was added to 2.5 mL of methanol DPPH solution (0.1 mM). The mixture was shaken gently and left to stand at room temperature in

the dark for 30 min. Thereafter, the absorbance was read at 515 nm. The scavenging activity was measured as the decrease in absorbance of the samples in comparison with the DPPH standard solution. The results were expressed as radical scavenging activity percentage (%) of the DPPH radical according to the following formula:

$$\%DPPH_{radicalscavenging} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100$$

Where A_0 is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the sample. The effective concentration had 50% radical inhibition activity (IC_{50}), expressed as mg extract/ mL, which was determined from the graph of the free radical scavenging activity (%) against the extract concentration.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP method was performed according to Benzie and Strain (1996), with modifications proposed by Pulido *et al.* (2000). In this assay, 3.6 mL of FRAP reagent (0.3 M, pH 3.6 acetate buffer, 10mM TPTZ and 20mM ferric chloride) were mixed with 200 μ L of extract diluted in distilled water and then incubated for 30 min at 37°C. The FRAP solution was used as reference reagent and the absorbance was read at 593 nm. The results were expressed in μ mol of trolox equivalents per gram of powder on a dry weight (DW) basis (μ mol TE/g⁻¹).

ABTS⁺ method

The ABTS method was performed out according to the methodology described by Re *et al.* (1999), with modifications. The ABTS radical was formed from the reaction of 140mM potassium persulfate with 7mM ABTS stock solution, kept in the dark and at room temperature for 16 h. For the analysis, the ABTS radical was diluted in distilled water until a solution with

absorbance of $700 \text{ nm} \pm 0.02 \text{ nm}$ at 734 nm was obtained. A $30 \text{ }\mu\text{L}$ aliquot of each extract was then homogenized with 3 mL of the ABTS radical. The absorbance of the samples was read at 734 nm after 6 min of reaction. The results were expressed in μmol of trolox equivalent per gram of powder on dry weight (DW) basis ($\mu\text{mol TE/g}^{-1}$).

β -carotene bleaching assay

The assay was performed as described by Cao *et al.* (2009) with some modifications. In brief, 0.01 g of β -carotene dissolved in 10 mL of chloroform was mixed with 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40 in a flask. After removing the chloroform in a rotary vacuum evaporator at 40°C for 10 min , 100 mL of oxygenated distilled water was slowly added to the oily residue with vigorous agitation to form an emulsion. A 4.5 mL aliquot of the emulsion was added to a tube containing 0.5 mL of extract sample solution of different concentrations and the absorbance was measured immediately at 470 nm against a blank consisting of the emulsion without β -carotene. The tubes were placed in a water bath at 50°C and the oxidation of the emulsion was monitored spectrophotometrically by measuring the absorbance at 470 nm every 15 min until 120 min had passed. The antioxidant activity (AA) of the sample extract was evaluated in terms of the bleaching of β -carotene using the following equation:

$$\text{Inhibition \%} = [(A_t - C_t) \div (C_0 - C_t)] \times 100$$

Where A_t and C_t are the absorbance values of the test sample and control, respectively, after a certain time (t) of incubation and C_0 is the absorbance value for the control, measured at the beginning of the experiments.

Determination of in vitro antimicrobial activity

The blueberry extracts (*Vaccinium ashei* Reade) were individually tested against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Salmonella enteritidis* clinical isolate, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35985, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus sp.* clinical isolate, *Candida tropicalis* ATCC 66029, *Candida kefyr* ATCC 66028 and *Saccharomyces cerevisiae* (environmental isolate).

For the disk diffusion technique, suspensions of microorganism were prepared in 0.9% NaCl solution and compared to the turbidity of 0.5 on the McFarland scale (equivalent to approximately 1.5×10^8 colony forming units/mL). Using sterile swabs, the bacterial suspensions were sown on the surface of Petri dishes containing about 15 mL of Mueller-Hinton agar with a thickness of approximately 4 mm.

Sterilized filter paper disks, six mm in diameter, containing 10 μ L of distinct compounds were placed on the surface of the plates in contact with the inoculum of the microorganism. The plates were incubated at 37°C for 24 hours (for the bacteria) and for 48 hours at 25°C (for the fungi) in an oven. After the incubation time, the formation of halos was analyzed. The tests were performed in triplicate and the results were expressed in mm as the arithmetic average of the diameter of the inhibition halos that were formed around the disks. The following were used as inhibition controls: ketoconazole 50 μ g (Biorad) for fungi; polymyxin 300 units (Biorad) for gram- negatives; and vancomycin 30 μ g for gram-positives.

Statistical Analysis

The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and their means were set by the method of ordinary least squares and compared by Tukey's test at a significance level of 5% ($p < 0.05$). Regardless of the significance of the interactions, the trends were tested via contrast from the coefficients for the interpolation of the orthogonal polynomials. Additionally, descriptive statistical analysis and Pearson's simple linear correlation were performed between the variables that were studied. The statistical analyses were performed using the SAS[®] - Statistical Analysis System, version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) at a 5% significance level.

Results and discussion

Total Phenolic Compounds, Total Flavonoid Content and Total anthocyanins

Table 1 shows the average values for the content of total phenolics, flavonoids and anthocyanins for the blueberry extracts obtained by the microwave method using different concentrations of solvent and extraction temperatures.

The values for total phenolics increased ($P < 0.05$) with increases in the extraction temperature for both solvent concentrations, demonstrating a linear tendency i.e. an increase in the extraction temperature resulted in an increase in the total phenolic content.

Similar behavior was observed by Wu *et al.* (2012), who extracted phenolic compounds from potatoes using focused microwave at temperatures of 50, 60, 70 and 80°C and found a marked increase in the content of total phenolics with increasing temperature.

Regarding the solvent, there was no significant difference between the concentrations of solvent that were used. However, Wu *et al.* (2012) found that a concentration of 60% ethanol was

more efficient than a concentration of 80%, suggesting that phenolic compounds are more soluble in concentrations of 60%.

Table 1 shows that the extraction of total flavonoids was not affected ($P > 0.05$) by the temperature and concentration of solvent that was used. In contrast, Spagolla *et al.* (2009) found that extractions using 40% and 60% ethanol were more efficient than 80% when extracting total flavonoids from dried blueberry of the Rabbiteye variety (*Vaccinium ashei*).

The total anthocyanin values (Table 1) showed an increase with a linear trend, i.e. increased extraction temperature in the solvent concentrations (60% and 80%) produced a higher extraction of total anthocyanins. Similar results were found by Zheng *et al.* (2013), who used microwave-assisted extraction in blueberries at different temperatures (30, 50, 70, 90 and 110°C) and observed that the total anthocyanin content significantly increased in the range of 30-50°C. This phenomenon can probably be attributed to the increased diffusion rate of the anthocyanins within the particles and the solubility capacity in the solvent extracted with increasing temperature.

However, in the present study significant difference was not observed between the concentrations of solvent used in the extraction process. In contrast, Zheng *et al.* (2013) used microwave-assisted extraction in blueberry, varying the concentrations of ethanol (20%, 40%, 60%, 80% and 100%), and they found the best extraction condition using 60% ethanol.

Antioxidant activity

Different techniques are used to determine the antioxidant activity in vitro in order to allow the selection of pure substances and matrices with this property. In the present study the antioxidant activities of blueberry extracts were evaluated by the following four methods: FRAP, ABTS+, DPPH and β - carotene (Table 2).

Table 2 shows that there was no interaction ($P > 0.05$) between the extraction temperature and the concentration of solvent for the antioxidant activity values measured by the FRAP, ABTS+ and DPPH tests. The solvent concentrations of 60 and 80% showed no difference ($P > 0.05$) in relation to the extraction temperatures. However, the extraction temperature was significant in relation to the values for antioxidant activity, showing a positive linear trend ($P < 0.05$) that resulted in an extract with higher antioxidant activity in line with increases in the extraction temperatures.

Corroborating this study, Li *et al.* (2012) extracted antioxidant compounds from tomatoes using microwave and found no interaction ($P > 0.05$) between the ethanol concentration and temperature for FRAP. An increase in temperature resulted in extracts with higher FRAP values.

Moura (2016) studied the extraction temperatures (30 and 60°C) and the organic solvent (80% ethanol and water) of bioactive compounds present in samples of açaí, blueberry and gojiberry pulp and achieved the best results for antioxidant activity by the DPPH method for blueberry at a temperature of 60°C using 80% ethanol as the extraction solvent.

Several studies have reported that heat improves the efficiency of extracting phenolic compounds and also provides an increase in antioxidant activity (Benmeziiane *et al.*, 2013; Vatai *et al.*, 2009). Conducting the extraction process at higher temperatures results in an increase in phenolic solubility, the rate of diffusion, and the extraction rate, due to reduced viscosity and surface tension of the solvent (Ju and Howard., 2003).

Another parameter used to quantify antioxidant properties is the IC_{50} value, which represents the concentration of antioxidants that provide 50% inhibition of the initial amount of free radicals; the lower the IC_{50} , the higher the antioxidant activity.

Table 2 shows that there was no interaction ($P > 0.05$) between the extraction temperature and solvent concentration for the IC_{50} values. The IC_{50} values decreased ($P < 0.05$) with increases

in the extraction temperature and decreases in the solvent concentration, showing a linear trend and indicating that the extract with the highest inhibitory capacity was found using 60% solvent at 60°C.

The β -carotene/linoleic acid system is a spectrophotometric method based on the oxidation (discoloration) of β -carotene, which is induced by the products of the oxidative degradation of linoleic acid, i.e. the method assesses the ability to inhibit free radicals during the peroxidation of the linoleic acid (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

Regarding the β -carotene/linoleic acid system, Table 2 shows that the blueberry extracts underwent an interaction between the extraction temperature and the solvent concentration ($P < 0.05$). The extracts obtained with 80% solvent at temperatures of 30°C and 60°C showed the highest percentage of inhibition; 72.44% and 85.28% respectively.

Pearson correlation coefficient

Table 3 shows the correlations between total antioxidant activity and total phenolic, flavonoid and anthocyanin content.

The results in Table 3 show a positive correlation between the total phenol content and the determined antioxidant activities, with the highest correlation shown by the FRAP test ($r = 0.70$). This was a moderate positive correlation ($0.5 < r < 0.8$) in accordance with the concepts of the Pearson correlation coefficient. The existence of a positive correlation between the FRAP assay and the levels of phenolics was also verified by Bunea *et al.* (2011), who investigated varieties of cultivated and wild blueberries in Romania. They attributed this correlation to the fact that the tests had the same reaction mechanism.

Likewise, the interactions of total anthocyanins in relation to TPC ($r = 0.64$), DPPH ($r = 0.61$) and FRAP ($r = 0.57$) were moderately positive ($0.5 < r < 0.8$). This can be explained by the

fact that anthocyanins are compounds that have antioxidant activity, i.e., the higher the content of these compounds in the extracts, the higher the antioxidant activity. Kuskoski *et al.* (2006) also observed a positive correlation between anthocyanins and antioxidant activity (DPPH) when they quantified various frozen fruit pulps marketed in southern Brazil. These authors also reported a direct correlation between phenolic compounds and antioxidant activity, which was also observed in the present study (Table 3).

Kalt *et al.* (1999) also found a positive correlation between total antioxidant capacity and total anthocyanin content and total phenolic compounds in small fruits such as strawberry, raspberry and blueberry.

Regarding IC₅₀, all the parameters correlated inversely and DPPH antioxidant activity ($r = -0.72$), ANT (anthocyanins) ($r = -0.62$) and TPC ($r = -0.61$) presented the highest correlation with the minimum concentration of extract to inhibit 50% of the free radical DPPH, indicating that the higher the content of DPPH, ANT and TPC in the extracts, the lower the IC₅₀, and consequently, the greater the efficiency of capturing free radicals.

Antibacterial and antifungal activity

No activity was found in relation to Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi in all the blueberry extracts. These results contradicted those of previous studies reported in the literature. Lacombe *et al.* (2012) found that blueberry extract formed inhibition zones in relation to *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica*.

Silva *et al.* (2013) studied infusion of blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum*), and found antimicrobial activity in relation to *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. faecium*, *L. innocua*, *B. cereus* and *P. aeruginosa* but no inhibition in relation to *C. albicans* and *E. coli*.

In the present study, despite the fact that the blueberry extracts possessed phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins, antimicrobial activity was not confirmed. It is noteworthy that these contradictory results may be linked to the extraction methodology, the origin of the fruits, and the tested microorganisms. Therefore, in this study we observed the absence of antimicrobial and antifungal activity in blueberry extracts extracted by focused microwave.

Conclusion

The results of this study demonstrate that the highest extraction values for phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity (FRAP, ABTS⁺ and DPPH) were obtained at a temperature of 60°C and did not differ significantly in relation to the concentrations of solvent. The temperature of 60°C was most efficient for the IC₅₀ and β-carotene tests and the latter showed the best values when using solvent concentrations of 60% and 80%, respectively. The total flavonoids did not have significant differences in relation to the temperature and solvent used in the extraction.

Consequently, the temperature of 60°C and 60% solvent concentration were the most efficient in terms of microwave-assisted extraction of bioactive compounds in blueberry, as well as being the most economical. The extracts showed no antifungal or antibacterial activity in relation to the different tested microorganisms. These results show that the proposed microwave-assisted extraction procedure can be considered suitable for obtaining blueberry extracts that are rich in bioactive compounds with high antioxidant activity, and with the possibility of being used as a natural antioxidant.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel CAPES/FAPERGS for providing scholarship to the first named author and also the laboratories of the Industrial Chemistry and Environmental sector of the Department of Chemistry of the Federal University of Santa Maria, RS.

References

Almeida, A. A., farah, A., Silva, D., Nunam, E. A. and Glória, M. 2006. Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54(1): 38-43.

Benmeziane, F., Djamai, R., Cadot, Y. and Seridi, R. 2014. Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis Vinifera*). *International Food Research Journal* 21(3): 1061-1065.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducingability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-76.

Brand-Willians, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28(1): 25-30.

Bunea, A., Rugina, D.O., Pinte, A.M., Sconta, Z., Bunea, C.I. and Socaciu, C. (2011). Comparative Polyphenolic Content and Antioxidant Activities of Some Wild and Cultivated Blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 39(2): 70-76.

Cao, L., Si, J.Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X. H. and Pan, R. L. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Moslachinensis* Maxim. *Food Chemistry* 115(3):801-805.

Costa, L.M., Korn, M.G. and Castro, J.T. 2006. Factorial design applied to the digestion bean samples assisted by microwave radiation. *Chemical New* 29(1): 149-152.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M. and Cintas, P. 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 15(5): 899-902.

Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. J., Genovese, M. I. and Lajolo, F. M. 2006. Antioxidant activity evaluation using β -carotene / linoleic acid system and sequestration method of DPPH•. *Science and Technology Food* 26(2): 446-452.

Giusti, M.M. and Wrolstad, R. E. 2001. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, p. 1-13. New York: John Wiley and Sons.

Ju, Z. Y. and Howard, L. R. 2003. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18): 5207-5213.

Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A. and Prior, R. L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11): 4638-4644.

Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Morales, M.T. and Fett, R. 2006. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. *Ciência Rural* 36(4): 1283-1287.

Lacombe, A., Wu, V.C.H., White, J., Tadepalli, S. and Andre, E.E. 2012. The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology* 30(1): 124-131.

Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S. and Tsao, R. 2012. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry* 130(4): 928-936.

Marta, G. L., Javier, R., Irma, C. B. Cristina, C., Dolores, A., Maria, R. G. A. and Pilar, V. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* 26(2): 555-563.

McDougall, G., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., and Stewart, D. 2005. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(7):2760-2766.

Michelle, H. J., Anita, L., Tessa, M., and Elvira, G. De M. 2011. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amylase and α -Glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59(1): 8923-8930.

Melo, E.A. and Guerra, N.B. 2002. Antioxidant activity of phenolic compounds naturally present in foods. *Bulletin of the Brazilian Society of Food Science and Technology* 36(1): 1-11.

Moura, C. 2016. Antioxidant potential of hydroalcoholic extracts from blueberry, acai pulp and goji berry: effect on oxidative and sensory stability in petit suisse cheese. Pato Branco, PR, Brazil: Federal University of Technology Paraná, MSc. Thesis.

Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8): 396-402.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237.

Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R. B., Sousa, C.A.S. and Pastore, G.M. 2007. Antioxidant activity of native fruits. *Science and Food Technology* 27(1): 53-60.

Serafini, M., Testa, M. F., Villaño, D., Pecorari, M., van Wieren, K., Azzini, E., Brambilla, A., and Maiani, G. 2009. Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology and Medicine* 46(6): 769-774.

Silva, S., Costa, E.M., Pereira, M.F., Costa, M.R. and Pintado, M.E. 2013. Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food microorganism. *Food Control* 34(2): 645-650.

Spagolla, L.C., Santos, M.M., Passos, L.M. L. and Aguiar, C.L. 2009. Alcoholic extraction of phenolic and total flavonoid Blueberry "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) and its antioxidant activity. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 30(2): 187-191.

Talcott, S. and Lee, J. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content os muscadine wine and juice. *Journal os Agricultural and Food Chemistry* 50(11):3186-3192.

Vatai, T., Škerget, M. and Knez, Z. 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 90(2): 246-254.

Vieira, V.B. 2012. Obtaining propolis microwave assisted extract, using in tuscanly italian sausage and evaluating its antioxidant capacity. Santa Maria, RS, Brazil: Federal University of Santa Maria, MSc. Thesis.

Wu, V. C. H., Qiu, X. J., bushway, A. and Harper, L. 2008. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT- Food Science and technology* 41(1):1834-1841.

Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M.F., Aisa, H.A. and Tsao, R. 2012. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chemistry* 133(4):1292-1298.

Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z. and Liu, H. 2013. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology* 104: 17-25.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4): 555-559.

Table 1. Total phenolic, flavonoids and anthocyanins content of blueberry extract.

Solvent%	Temperature, °C				Mean	P-value		
	30	40	50	60		S	T	S×T
	Total phenolics, mg GAE/g of dried fruit					0.1751	<0.0001	0.2571
60	60.36	75.18	75.02	97.08	76.91		Tendency	
80	51.15	81.42	88.18	113.38	83.53		L	Q
Mean	55.75 ^c	78.3 ^b	81.60 ^b	105.23 ^a		T	<0.0001	0.9087
	Total flavonoids, mg QE/g of dried fruit					0.2744	0.1389	0.6696
60	3.31	3.91	4.37	7.33	4.73		Tendency	
80	2.74	3.84	3.96	4.56	3.77		L	Q
Mean	3.03	3.87	4.17	5.94		T	0.0291	0.5905
	Total anthocyanins, mg cyanidin 3-O-glucoside /100g of dried fruit					0.4917	0.0075	0.6651
60	13.70	20.00	18.29	21.20	18.30		Tendency	
80	14.23	17.40	19.00	19.35	17.49		L	Q
Mean	13.96 ^b	18.70 ^a	18.65 ^a	20.27 ^a		T	0.002	0.1915

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

GAE = Gallic acid equivalent; QE: Quercetin equivalent; S: solvent; T: temperature; L: linear; Q: quadratic; p -value: probabilistic value; CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean.

CV (phenolics) = 26.4; SEM (phenolics) = 4.3; CV (flavonoids) = 50.8; SEM (flavonoids) = 0.4; CV (anthocyanins) = 19.3; SEM (anthocyanins) = 0.7.

Table 2. Antioxidant activities of blueberry extract.

Solvent, %	Temperature, °C				Mean	P-value		
	30	40	50	60		S	T	S×T
Ferric reducing activity, μmol TEAC/g of dried fruit						0.5138	<0.0001	0.3563
60	2.73	4.14	5.86	6.84	4.89	Tendency		
80	3.62	3.88	6.29	6.50	5.07	L	Q	
Mean	3.17 ^b	4.01 ^b	6.07 ^a	6.67 ^a		T	<0.0001	0.6694
ABTS⁺ radical-scavenging activity, μmol TEAC/g of dried fruit						0.8291	0.001	0.9873
60	2.55	3.90	2.32	4.04	3.20	Tendency		
80	2.42	3.81	2.15	4.17	3.13	L	Q	
Mean	2.48 ^b	3.85 ^a	2.24 ^b	4.10 ^a		T	0.0351	0.4407
DPPH[•] radical-scavenging activity, μmol TEAC/g of dried fruit						0.1224	0.0179	0.864
60	4.91	5.05	5.63	8.46	6.01	Tendency		
80	3.93	4.44	4.98	6.48	4.96	L	Q	
Mean	4.42 ^b	4.74 ^b	5.30 ^{ab}	7.47 ^a		T	0.004	0.1743
IC₅₀% inhibition of DPPH radical, mg/mL						0.0401	0.0038	0.4454
60	8.17	9.11	7.57	6.63	7.87 ^B	Tendency		
80	10.07	9.27	8.92	7.01	8.82 ^A	L	Q	
Mean	9.12 ^a	9.19 ^a	8.24 ^{ab}	6.82 ^b		T	0.0008	0.0975
β-Carotene bleaching inhibition activities, %						0.0016	0.0199	0.0473
60	50.02 ^B	62.23	57.94	63.73 ^B	58.48	Tendency		
80	72.44 ^{Aab}	61.78 ^b	62.84 ^b	85.28 ^{Aa}	70.59	L	Q	
Mean	61.23	62.00	60.39	74.5		T	0.0167	0.0533

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity; S: solvent; T: temperature; L: linear; Q: quadratic; p -value: probabilistic value; S: solvent; CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean.

CV (ferric reducing activity) = 32.0; SEM (ferric reducing activity) = 0.3; CV (ABTS⁺) = 33.3; SEM (ABTS⁺) = 0.2; CV (DPPH) = 34.5; SEM (DPPH) = 0.4; CV (IC₅₀) = 17.3; SEM (IC₅₀) = 0.3; CV (β-Carotene) = 18.5; SEM (β-Carotene) = 2.4.

Table 3. Pearson correlation coefficients.

	TPC	TFC	FRAP	ABTS	IC ₅₀	DPPH	BCB	ANT
TPC		0,48 [*]	0.70 ^{***}	0.47 [*]	-0.61 ^{**}	0.49 [*]	0.43 [*]	0.64 ^{***}
TFC			0.42 [*]	0.26 ^{ns}	-0.42 [*]	0.09 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.33 ^{ns}
FRAP				0.27 ^{ns}	-0.49 [*]	0.49 [*]	0.35 ^{ns}	0.57 ^{**}
ABTS					-0.25 ^{ns}	0.27 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.37 ^{ns}
IC ₅₀						-0.72 ^{***}	-0.02 ^{ns}	-0.62 ^{**}
DPPH							0.11 ^{ns}	0.61 ^{**}
BCB								0.18 ^{ns}
ANT								

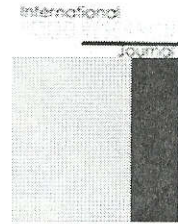
^{ns}no significant difference (P>0.05); ^{*}significant difference (P<0.05); ^{**}significant difference(P<0.01);

^{***}significant difference (P<0.001).

TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; FRAP: Ferric reducing antioxidant power; ABTS: ABTS assay; IC₅₀: inhibition activity; DPPH: DPPH assay; BCB: β-carotene bleaching assay; ANT: Total anthocyanins.

International Food Research Journal

(ISSN 22317546)
Tel: 603-89468419 // Fax: 603-89423552
Email: ifrj@upm.edu.my
Website: <http://www.ifrj.upm.edu.my>



Dear Author,

ACCEPTANCE LETTER

The Editorial Team of International Food Research Journal, is pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication. We thank you for your contribution to the International Food Research Journal and encourage you to submit other articles to the Journal.

Please note that all manuscripts must be accompanied by a signed copyright agreement form to enable the manuscript to be processed for publication. You are requested to send the copyright agreement form within three (3) working days from the date of the email. Please print, fill and sign the attached copyright agreement form and send the scanned copy to ifrj@upm.edu.my

Thank you.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "Son Radu". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Professor Dr. Son Radu
Editor
International Food Research Journal

MANUSCRITO 2

**INFLUENCE OF DIFFERENT PARAMETERS IN THE BLUEBERRY
(*Vaccinium ashei* Reade) BIOACTIVE COMPOUND EXTRACTION
AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CAPABILITY**

Artigo submetido para a Revista Food Chemistry
(Formatado conforme as normas da revista)

ORIGINAL ARTICLE

Influence of different parameters in the blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) bioactive compound extraction and antioxidant and antimicrobial capability

Natiéli Piovesan*^a; Vanessa BordinViera^a; Renius de Oliveira Mello^a; Aline de Oliveira Fogaça^b;
Roberto Christ Vianna Santos^c; Leadir Lucy Martin Fries^a

^aDepartment of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria,
RS, Brazil,

^b Pharmacy Course, Health Sciences, University Center Franciscano - UNIFRA, Santa Maria, RS,
Brazil,

^cDepartment of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of
Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. Emails: natipiovesan@gmail.com;
vanessa.bordinviera@gmail.com; reniusmello@gmail.com; alinefogaca@gmail.com;
robertochrist@gmail.com; lucymicro@yahoo.com.br

*Corresponding author: Av. Roraima n° 1000, Building 42, University City, Neighbourhood
Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 55 3220 8254, e-mail:
natipiovesan@gmail.com

Abstract

The objective of this study was to investigate the influence of different parameters (hydroethanolic solvent concentration, temperatures and times) in the extraction of blueberry bioactive compounds, aiming at higher yield of bioactive compounds and the extract antioxidant and antimicrobial activity. The extracts were characterized regarding the phenolic compounds, flavonoid and anthocyanins content. The antioxidant activity was quantified using the methods DPPH radical scavenging and ABTS⁺, β -carotene system self-oxidation inhibition, FRAP and the IC₅₀ was calculated. The antimicrobial activity was evaluated through the disc diffusion method. The best extraction conditions for phenolic compounds, flavonoids and anthocyanin employed 60% solvent, 60 minutes at 40°C; however, the anthocyanins did not suffer any influence from time and temperature. The best results for the antioxidant activity using the DPPH and FRAP methods were obtained with 60% solvent, 30 minutes at 30°C, and the DPPH was not influenced by temperature. Regarding ABTS⁺ the best results were reached with 60% solvent, 120 minutes, at 40°C, while the β -carotene required 80% solvent at 40°C, regardless of the time. The different extracts tested did not show antimicrobial activity. Therefore, the best bioactive compound extraction conditions were those using 60% solvent for 60 minutes at 40°C.

Keywords: extraction parameters, bioactive compounds, antioxidants, blueberry.

1. Introduction

Blueberries are one of the most popular soft fruits cultivated mainly in United States, Canada and Poland. These berries are characterized by a strong free radical scavenging properties due to the presence of bioactive compounds i.e. proanthocyanidins (PACs) (Gu, Kelm, Hammerstone, Beecher, Cunningham, Vannozzi, & Prior, 2002) and anthocyanins (Wu, Beecher, Holden, Haytowitz, Gebhardt, & Prior, 2006). The consumption of blueberries may potentially contribute to the decreased risk of neurodegenerative, cardiovascular and urinary diseases, inhibition of the growth of cancer cells and prevention of vision problems and aging (Seeram, 2008), thus known as the fruit longevity.

Blueberries are one of the richest sources of anthocyanins and exhibit one of the highest in vitro antioxidant capacities of various fruits and vegetables studied (Wang, Cao, & Prior, 1996). Anthocyanins are widely distributed among fruits and vegetables. They are one of the main classes of water-soluble flavonoids and contribute significantly to the antioxidant activities of the flavonoids (Lapidot, Harel, Akiri, Granit, & Kanner, 1999). They are well known for their ability to give red, blue, and purple colours to plants. They are also free radical-scavengers and can potentially interact with biological systems, conferring enzyme-inhibiting, antibacterial, cardiovascular protection and antioxidant effects (De Groot & Rauen, 1998; Parthasarathy, 1998; Serafini, Maiani, & Ferro-Luzzi, 1998; Cowan, 1999). In addition to anthocyanins, blueberries are also a rich source of other polyphenolic compounds.

Phenolic compounds are secondary metabolites of plants. They are naturally present in fruits and vegetables. These compounds are a part of everyday diet and are also used as medicines or supplements. Researchers have shown that fruits and vegetables contain antioxidant nutrients, in addition to vitamins C and E, and carotenoids, which significantly contribute to their total antioxidant capacity (Cao, Sofic, & Prior, 1996; Wang, Cao, & Prior, 1996). Most

antioxidant nutrients are polyphenolic compounds that are components of fruits and vegetables having strong antioxidant capacity (Cao, Sofic, & Prior, 1997; Wang, Cao, & Prior, 1997).

Natural antioxidants are an alternative to prevent the oxidative deterioration of foods, minimizing the oxidative damage that these compounds cause in humans (Melo & Guerra, 2002).

This study aimed at investigating the influence of different parameters (hydroethanolic solvent concentration, temperatures and times) of blueberry (*Vaccinium ashei Reade*) bioactive compound extraction, with the purpose of identifying extraction conditions that present the best yield of bioactive compounds and the extract antioxidant and antimicrobial capability.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

The blueberry (*Vaccim ashei Reade*) samples, variety Climax, were acquired from the Orchard Vale do Dourado located in the city of Erechim (RS), where the fruit is grown in an organic production system.

The fruit was selected, washed with neutral detergent and rinsed with running water. Next, sanitation with 200 mg.L⁻¹ sodium hypochlorite was carried out for 20 minutes and later on the fruit was dehydrated in oven with forced air circulation at 50°C for 48 hours. The fruit was then frozen (-18°C) and milled in a cooled analytical mil at 4 °C (Quimis, modelQ298A21, Brazil) assisted by an ultra-thermostatic bath (Solab, model SL-152/10) and stored in amber bottle at -18°C until the extracts were obtained.

2.2 Obtaining the Extracts

The blueberry extracts were prepared from the previously milled sample, weighed in a beaker, with the addition of 1:10 (m/v) hydroethanolic solvent. Next, the mixture was taken to the ultra-thermostatic bath (Solab, model SL-152/10) and submitted to constant agitation using the agitator (Marconi MA-039).

Twelve treatments were carried out in triplicates, varying the hydroethanolic solvent concentration between 60% and 80%, extraction temperature 30 °C and 40°C and 30, 60 and 120-minute extraction time. After finishing the extractions, the extracts were filtered and centrifuged at 3000 rpm for 20 min. Later on, the supernatants were placed in amber bottles and stored in freezer (-18 °C) until the analyses were carried out.

2.3 Determining total phenolic content (TPC)

The Folin–Ciocalteu method Roesler (2007) was used to determine total phenolic content in the extracts under study. Therefore, a mixture of 200 µL extract with 1000 µL of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent was prepared and the solutions were incubated at room temperature (27°C) for 5 min. Next, 800 µL of 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3) solution was added and the solutions were submitted to a 50°C water bath for 5 min for new incubation. A UV– Vis spectrophotometer (Biospectro, model: SP - 220) was employed to measure the absorbance of the reaction mixtures at 765 nm. To estimate the TPC concentration in the sample, the comparison of the extract absorbance to a gallic acid standard curve was carried out. The TPC expression was given as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

2.4 Determining flavonoid content

The colorimetric test developed by Zhishen *et al.* (1999) was used to determine total flavonoid content. In a test tube, 150 μL 5% NaNO_2 was added to a known volume (0.5 mL) of extract at zero time. Five minutes later, the addition of 150 μL 10% AlCl_3 was carried out and after another 6 minutes, 1 mL 1 M NaOH was added with the addition of 1.2 mL of distilled water. A spectrophotometer (Biospectro, model: SP - 220) was employed to record the UV/Vis spectra with absorbance at 510 nm. To assess the concentration of flavonoid content in the sample, the extract absorbance was compared to a quercetin standard curve. The flavonoid content expression was given as mg of quercetin equivalents (QE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

2.5 Determining total anthocyanin content

The pH-differential method (Giusti and Wrolstad, 2001) was employed to the determination of anthocyanin content. Firstly, 2.5 mL of 0.025M potassium chloride buffer, pH 1.0 and 0.4M sodium acetate buffer, pH 4.5 were used to dilute each extract (0.5 mL) separately. Next, the diluted solutions were left at room temperature for 15 min and a reading of each dilution absorbance was carried out at 520 and 700 nm against a blank cell filled with distilled water. The equation below was used to calculate the anthocyanin content:

$$\text{Anthocyanins content}_{(mg/100g\text{ of dry matter})} = A \times MW \times DF \div (\epsilon \times W)$$

Where: A = absorbance $(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$, MW = molecular weight of cyanidin-3-glucoside ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6$, 449.2), DF = dilution factor, ϵ = molar absorptivity (26900), and W = sample weight (g).

2.6 Antioxidant activity – DPPH method

The method presented by Brand-Williams *et al.* (1995) was modified and employed to measure the scavenging activity of the extract radical in relation to the DPPH radical. In this procedure, (0.5 mL) methanolic solution aliquot containing different concentrations was added to 2.5 mL of methanol DPPH solution (0.1 mM). This mixture was gently shaken and left to stand at room temperature in the dark for 30 min. followed by the absorbance reading at 515 nm. The scavenging activity measurement considered the decrease in absorbance of the samples when compared to the DPPH standard solution. Results were presented as the DPPH radical scavenging activity percentage (%) by employing the formula:

$$\%DPPH_{radicalscavenging} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100$$

Where: A_0 is the control absorbance and A_s is the sample absorbance. The effective concentration presented 50% radical inhibition activity (IC_{50}), considered as mg extract/ mL, which was determined from the free radical scavenging activity graph (%) in relation to the extract concentration.

2.7 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) method

The FRAP method was performed according to Benzie and Strain (1996), with modifications proposed by Pulido *et al.* (2000). In this assay, 3.6 mL of FRAP reagent (0.3 M, pH 3.6 acetate buffer, 10mM TPTZ and 20mM ferric chloride) were mixed with 200 μ L of extract diluted in distilled water and then incubated for 30 min at 37°C. The FRAP solution was used as reference reagent and the absorbance was read at 593 nm. The results were expressed in μ mol of trolox equivalents per gram of powder on a dry weight (DW) basis (μ mol TE/g⁻¹).

2.8 ABTS⁺ method

The ABTS method was performed out according to the methodology described by Re *et al.* (1999), with modifications. The ABTS radical was formed from the reaction of 140mM potassium persulfate with 7Mm ABTS stock solution, kept in the dark and at room temperature for 16 h. For the analysis, the ABTS radical was diluted in distilled water until a solution with absorbance of 700 nm \pm 0.02 nm at 734 nm was obtained. A 30 μ L aliquot of each extract was then homogenized with 3mL of the ABTS radical. The absorbance of the samples was read at 734 nm after 6 min of reaction. The results were expressed in μ mol of trolox equivalent per gram of powder on dry weight (DW) basis (μ mol TE/g⁻¹).

2.9 β -carotene bleaching assay

The assay was performed as described by Cao *et al.* (2009) with some modifications. In brief, 0.01g of β -carotene dissolved in 10 mL of chloroform was mixed with 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40 in a flask. After removing the chloroform in a rotary vacuum evaporator at 40°C for 10 min, 100 mL of oxygenated distilled water was slowly added to the oily residue with vigorous agitation to form an emulsion. A 4.5 mL aliquot of the emulsion was added to a tube containing 0.5 mL of extract sample solution of different concentrations and the absorbance was measured immediately at 470 nm against a blank consisting of the emulsion without β -carotene. The tubes were placed in a water bath at 50°C and the oxidation of the emulsion was monitored spectrophotometrically by measuring the absorbance at 470 nm every 15 min until 120 min had passed. The antioxidant activity (AA) of the sample extract was evaluated in terms of the bleaching of β -carotene using the following equation:

$$\text{Inhibition \%} = [(A_t - C_t) \div (C_o - C_t)] \times 100$$

Where: A_t and C_t are the absorbance values of the test sample and control, respectively, after a certain time (t) of incubation and C_0 is the absorbance value for the control, measured at the beginning of the experiments.

2.10 Determination of in vitro antimicrobial activity

The blueberry extracts were tested individually against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Salmonella enteritidis* clinical isolate, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35985, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus sp* clinical isolate, *Candida kefyr* ATCC 66028, *Candida tropicalis* ATCC 66029 and *Saccharomyces cerevisiae* (environmental isolate).

For the disk diffusion technique, suspensions of microorganism were prepared in 0.9% NaCl solution and compared to the turbidity of 0.5 on the McFarland scale (equivalent to approximately 1.5×10^8 colony forming units/mL). Using sterile swabs, the bacterial suspensions were sown on the surface of Petri dishes containing about 15 mL of Mueller-Hinton agar with a thickness of approximately 4 mm.

Sterilized filter paper disks, six mm in diameter, containing 10 μ L of distinct compounds were placed on the surface of the plates in contact with the inoculum of the microorganism. The plates were incubated at 37°C for 24 hours (for the bacteria) and for 48 hours at 25°C (for the fungi) in an oven. After the incubation time, the formation of halos was analyzed. The tests were performed in triplicate and the results were expressed in mm as the arithmetic average of the diameter of the inhibition halos that were formed around the disks. The following were used as

inhibition controls: ketoconazole 50 μg (Biorad) for fungi; polymyxin 300 units (Biorad) for gram- negatives; and vancomycin 30 μg for gram-positives.

2.11 Statistical Analysis

The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and their means were set by the method of ordinary least squares and compared by Tukey's test at a significance level of 5% ($p < 0.05$). Regardless of the significance of the interactions, the trends were tested via contrast from the coefficients for the interpolation of the orthogonal polynomials. The statistical analyses were performed using the SAS[®] - Statistical Analysis System, version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) at a 5% significance level.

3. Results and discussion

Table 1 shows the p values of the extraction conditions (solvent, time and temperature) and their interactions, to obtain phenolic compounds, flavonoid and total anthocyanin, and the antioxidant activity (DPPH, ABTS⁺, β -carotene, FRAP and IC₅₀) of the blueberry extracts.

In Table 1, the p values indicate interactions ($P < 0.05$) between solvent, time and temperature of extraction for the total flavonoids and antioxidant activity through the FRAP and ABTS⁺ methods. Regarding total phenolic compounds (TPC), there was interaction ($P < 0.05$) between solvent and time and between time and temperature of extraction.

The antioxidant activity resulting from the methods DPPH and β -carotene presented interaction ($P < 0.05$) between solvent and extraction time, and between solvent and temperature of extraction, respectively.

However, there was no interaction ($P > 0.05$) between the conditions under study (solvent, time and temperature) when IC₅₀ was observed and for the total anthocyanin content.

The parameter IC_{50} , which represents the antioxidant concentration that provides 50% inhibition to the free radical initial amount, was influenced by the solvent and the temperature of extraction. The solvent with the highest efficiency was the 60% concentration, which presented 8.16 mg/ml average value, differing statistically from the 80% solvent with 9.48 mg/ml. When the temperature of extraction was observed, 40°C obtained the best results (8.05 mg/ml) with significant difference from 30°C (9.60 mg/ml). According to Arbos, Freitas, Stertz, & Dornas (2010), values over 25 mg/ml are considered of low antioxidant potential. Therefore, the blueberry extracts can be considered to have presented good antioxidant potential.

The total anthocyanin content was only influenced by the solvent concentration (Table 1), and the solvent with 60% concentration presented better extraction, differing statistically from the 80% solvent. Similar results were presented by Zheng, Xu, Liu, Sun, Lin, & Liu (2013), who found the best extraction condition by using ethanol 60% to extract total anthocyanins from blueberry, varying the ethanol concentrations (20%, 40%, 60%, 80% and 100%).

Cacace & Mazza (2003) studied the extraction of anthocyanins from blackcurrants using ethanol aqueous solution in the concentrations 39, 50, 67, 84 and 95%, and obtained the highest anthocyanin content between 39-67% and observed that between 67-95% diffusion coefficient reductions occurred.

3.1 Total Phenolic Compounds

Table 2 presents the average values of phenolic compounds for blueberry extracts obtained in different conditions of solvent concentration, time and temperature of extraction.

The total phenolic content in extracts (Table 2) varied from 46.35 to 90.01 mg EAG/g dry fruit. Only the 60-minute time was observed to present significant difference ($P < 0.05$) regarding

solvent concentrations (60 and 80%), in which the extract with 60% ethanol presented the highest value, 80.27mg EAG/g dry fruit.

Wu, Yan, Liu, Marcone, Aisa, & Tsao (2012), when extracting total phenolic compound from potatoes, observed that the 60% ethanol concentration was more efficient than the 80% one, suggesting that the phenolic compounds are more soluble in 60% hydroethanolic solvent. Similar effect was observed in the extraction of phenolic compounds from wheat bran (Wang, Sun, Cao, Tian, & Li, 2008).

According to Chan, Lee, Yap, Wan Aida, & Ho (2009), the effect of ethanol concentration on the phenolic compound extraction from lemon skin (*Citrus hystrix*) increased with the increase in the concentration of ethanol up to 60%, followed by a reduction until the minimum value was reached with 100% ethanol. Likewise, Cacace & Mazza (2003) revealed that maximum total phenolic compounds in black currant extracts were obtained with around 60% ethanol, followed by a decrease with the increase in the solvent concentration.

When analyzing the interaction temperature and extraction time (Table 2), it was seen that only the 60-minute time presented significant difference between the temperatures under study, and 40°C was the most efficient temperature (89.51 mg EAG/g dry fruit), differing statistically from the 30-minute time.

This result is in accordance with the study presented by Chan, Lee, Yap, Wan Aida, & Ho (2009), who observed increase in the phenolic compounds when the temperature of extraction increased from 25 to 40°C. Likewise, Juntachote, Berghofer, Siebenhandl, & Bauer (2006) reported that increase in temperature provides higher amounts of phenolic compounds for basil, this might be ascribed to a faster diffusion rate and the solubility capability in solvent with the increase in temperature.

However, it seems relevant to notice that increase in temperature over certain values might promote decomposition of phenolic compounds which were mobilized at lower temperatures or even the breakage of phenolic compounds that still remain in the plant matrix. In addition, high temperature might promote solvent loss through vaporization and increase the extraction process cost from the industrialization view point (Chan, Lee, Yap, Wan Aida, & Ho., 2009).

3.2 Total flavonoid content

Table 3 presents the average values of total flavonoid content for the blueberry extracts obtained in different solvent concentration, time and temperature of extraction conditions.

When analyzing the interaction between the parameters solvent concentration, time and temperature of extraction (Table 3), the highest total flavonoid content was seen to be obtained at 40 °C, with 60% solvent and 60-minute extraction time (4.84 mg EQ/g dry fruit), differing significantly from the 30°C temperature, 80% solvent concentration and 30-minute extraction time.

Spagolla, Santos, Passos, & Aguiar (2009), when evaluating the flavonoid content in hydroalcoholic extracts prepared from blueberry fruit cv. "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) found out that the extractions using ethanol 60% were more efficient than those using 80%, in the extraction of total flavonoids from both fresh and dry blueberry fruit.

Confirming this study, Krishnan & Rajan (2016) investigated the influence of temperature in flavonoid extraction from *Terminalia bellerica Roxb*, and observed that with the increase in temperature there was increase in the flavonoid extraction rate. This fact might be ascribed to the increase in the solute diffusion and decrease in the viscosity coefficient.

3.3 Antioxidant activity – DPPH, ABTS⁺, β -carotene and FRAP, methods

Different techniques are used to determine the *in vitro* antioxidant activity, so that pure substances and matrices with this property can be selected, the antioxidant activity of blueberry extracts were evaluated through four distinct methods: DPPH, β -Caroteno, ABTS⁺ and FRAP.

The results of antioxidant activity through DPPH and β -Carotene tests are described in Table 4, where the extract with the best antioxidant activity through the DPPH method was found with 60% solvent and 30-minute extraction time (6.50 μ mol TEAC/g dry fruit), differing statistically from the 80% solvent. Belwal, Dhyani, Bhatt, Rawal, & Pande (2016) studied the antioxidant potential of Asian fruit (Berberis), and observed that the best time to maximize the antioxidant activity (DPPH) was the 30-minute extraction time.

In the β -carotene / linoleic acid whitening test (Table 4), the extract highest inhibition activity was obtained with 80% solvent at 40°C (73.97%), with significant difference ($P < 0.05$) from the 60% solvent at 30 °C.

Table 5 shows the results of antioxidant activity through the ABTS⁺, the highest antioxidant activity extract (ABTS⁺) was obtained in the extraction with 60% solvent, at 40°C and 120 minutes (3.39 μ mol TEAC/g), differing significantly ($P < 0.05$) from the times 30 and 60 minutes, at 30°C and 80% solvent.

Chew, Khoo, Ng, Thoo, Wan Aida, & Ho (2011), when optimizing the time (60-300 min) of *Orthosiphon stamineus* phenolic extraction and evaluating the antioxidant activity (ABTS) observed that the antioxidant capability (ABTS⁺) reached its peak in 120 minutes.

Regarding the solvent concentration, Ilaiyaraja, Likhith, Babu, & Khanum (2015) investigated the extraction solvent conditions for maximum recovery of polyphenols and observed that the optimal condition for antioxidant activity through ABTS⁺ and DPPH was with

62,7% hydroethanolic solvent. The same study indicated decrease in the antioxidant activity when over 83.64% solvent concentration was used.

The antioxidant activity results obtained through the FRAP method are described in Table 6, where the highest antioxidant activity found through the FRAP was at 30°C, with 60% solvent concentration and 30 minutes (6.00 µmol TEAC/g dry fruit), differing significantly ($P < 0.05$) from the temperature 40 °C, 80% solvent concentration and 120 minutes.

Belwal, Dhyani, Bhatt, Rawal, & Pande (2016) also observed that the optimal time to maximize the antioxidant activity through the FRAP method was 30-minute extraction time. According to Jayanthi & Lalitha (2011), these compounds with reduction ability were seen to be electron donors and might reduce the oxidized form of intermediary processes of lipid peroxidation, so that they can act as primary and secondary antioxidants.

The antioxidant activity results from the bioactive compounds content contained in the extract, which might be influenced by the plant species and variety under study, the extraction method, the extraction variation sources (time, solvent, temperature) among others. Therefore, their effects on the extraction experimental conditions were investigated in order to maximize the production of bioactive compounds and consequently obtain higher blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) antioxidant activity.

3.4 Antimicrobial activity

No activity was observed against the Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi in any of the blueberry extracts tested. However, data in the literature demonstrates that these results are contradictory. Lacombe, Wu, White, Tadepalli, and Andre (2012) noticed that the blueberry extract formed inhibiting zones against *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica*.

Shen *et al.* (2014) demonstrated that the extracts of four blueberry varieties (Elliott, Darrow, Bluecrop, and Duke) inhibited the growth of *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*. A study developed by Silva, Costa, Pereira, Costa, & Pintado (2013) revealed that in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit infusion there was antimicrobial action for *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. faecium*, *L. innocua*, *B. cereus* and *P. aeruginosa*, however, there was no inhibiting action related to *C. albicans* and *E. coli*.

Despite the blueberry extracts having presented phenolic compounds, flavonoid and total anthocyanin, the antimicrobial activity was not confirmed. It seems relevant to highlight that the contradictory results might be related to the extraction methodology, the fruit origin and the micro-organisms tested. Therefore, in this study the existence of antimicrobial activity in the blueberry extracts was not confirmed.

4. Conclusion

This study demonstrated that the best bioactive compounds conventional extraction conditions used were 60% solvent, 60 minutes at 40°C. The antioxidant activity, through the DPPH and FRAP methods, presented the highest activity in extractions with 60% solvent, 30 minutes at 30°C, and the DPPH was not influenced by the temperature. For ABTS⁺ the best yield was achieved with 60% solvent, 120 minutes at 40°C, while the β -carotene presented the best results with 80% solvent at 40 °C, regardless of the time of extraction. The IC₅₀ determination revealed the highest efficiency with 60% solvent at 40 °C. The different extracts under study did not show antimicrobial activity. The results of this study established the best blueberry bioactive compound extraction conditions and also confirmed the blueberry antioxidant ability, which can be used as a functional ingredient or as natural antioxidant in the production of food products.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/FAPERGS) for providing a doctoral scholarship to the first named author.

5. References

- Arbos, K. A., Freitas, R. J. S. D., Stertz, S. C., & Dornas, M. F. (2010). Antioxidant activity and phenolic content in organic and conventional vegetables. *Food Science and Technology*, 30(2), 501-506.
- Belwal, T., Dhyani, P., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., & Pande, V. (2016). Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 207, 115-124.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, (299), 15-27.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68 (1), 240-248.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 749-760.

- Cao, L., Si, J. Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X. H., & Pan, R. L. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*, 115(3), 801-805.
- Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* 16, 203-21.
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M., & Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427-1435.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- De Groot, H., & Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 12, 249-255.
- 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*, p. 1-13. New York: John Wiley & Sons.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., & Prior, R.L. (2002). Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescence detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4852-4860.
- Ilaiyaraja, N., Likhith, K. R., Babu S. G. R., & Khanum, F. (2015). Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 173, 348-354.

- Jayanthi, P., & Lalitha, P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia Crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (3), 126-128.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandl, S., & Bauer, F. (2006). Theantioxidative properties of Holy basil and Galangal in cookedground pork. *Meat Science*, 72(3), 446-456.
- Krishnan, R. Y., & Rajan, K. S. (2016). Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*. 157, 169-178.
- Lacombe, A., Wu, V. C. H., White, J., Tadepalli, S., & Andre, E. E. (2012). The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology*, 30(1), 124-131.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., & Kanner, J. (1999). PH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 67–70.
- Melo, E. A., & Guerra, N. B. (2002). Antioxidant activity of phenolic compounds naturally present in foods. *Bulletin of the Brazilian Society of Food Science and Technology*, 36(1), 1-11.
- Parthasarathy, S. (1998). Mechanisms by which dietary antioxidants may prevent cardiovascular diseases. *Journal of Medicinal Food*, 1,45–51.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 396-402.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231–1237.

- Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27 (1), 53-60.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 630- 635.
- Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition*, 128, 1003–1007.
- Shen, X., Sun, X., Xie, Q., Liu, H., Zhao, Y., Pan, Y., Wang, C., & Wu, V. C.H. (2014). Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*, 35, 159-165.
- Silva, S., Costa, E. M., Pereira, M. F., Costa, M. R., & Pintado, M. E. (2013). Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food microorganism. *Food Control*, 34(2), 645-650.
- Spagolla, L. C., Santos, M. M., Passos, L. M. L., & Aguiar, C. L. (2009). Alcoholic extraction of phenolic and total flavonoid Blueberry "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) and its antioxidant activity. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 187-191.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701–705.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304–309.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804-810.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentration of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069-4075.

Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M. F., Aisa, H. A., & Tsao, R. (2012). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chemistry*, 133(4), 1292-1298.

Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., & Liu, H. (2013). Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology*, 104, 17-25.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

Table 1 - Results ($p = 0,05$) to analyze the effect of independence or interaction between treatment factors in total phenolic compounds, total flavonoid and total anthocyanin and antioxidant activity through the methods DPPH, ABTS⁺, β -carotene, FRAP and the IC₅₀ of blueberry extracts.

	Sources of variation			Interaction			
	Solvent	Time	Temperature	S x T °C	S x T	T x T °C	S x T x T °C
TPC	0.0033	0.0003	0.0024	0.5918	0.0032	<.0001	0.4359
TFC	<.0001	0.0529	0.0017	0.0318	0.2760	0.0004	0.0053
TAC	0.0422	0.3613	0.0995	0.6968	0.1440	0.2921	0.5209
FRAP	<.0001	0.4555	0.0062	0.0028	0.7491	<.0001	0.0137
DPPH	0.0019	0.4662	0.1338	0.2689	0.0102	0.9141	0.2732
IC₅₀	0.0071	0.1301	0.0021	0.4253	0.3684	0.2998	0.9476
ABTS⁺	0.0421	0.0250	<.0001	0.5402	0.0128	0.0009	0.0021
β-caroteno	0.0002	0.2192	0.0357	0.0163	0.7060	0.1178	0.5173

$p > 0.05$: insignificante; $p < 0.05$: significante; S: solvent; T: tempo; T °C: temperatura; TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; TAC: total antocianys content; FRAP: ferric reducing antioxidant; DPPH: DPPH assay; IC₅₀ = inhibitory concentration of the extract that reduce 50% of stable DPPH radical ABTS⁺: ABTS assay, β -caroteno: β -carotene bleaching assay;

Table 2 – Total phenolic content in blueberry extracts obtained from different solvent concentrations, time and temperature of extraction.

Total phenolics, mg GAE/g of dried fruit				
Solvent, %	Time, min			Mean
	30	60	120	
60	78.92	80.27 ^A	83.61	80.93
80	64.07 ^b	55.60 ^{Bb}	90.01 ^a	69.89
Mean	71.49	67.93	86.81	
Temperature, °C	Time, min			Mean
	30	60	120	
30	75.74 ^a	46.35 ^{Bb}	86.93 ^a	69.67
40	67.25 ^b	89.51 ^{Aa}	86.69 ^a	81.15
Mean	71.49	67.93	86.81	

Means with the same small letter in the row do not differ ($P > 0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P > 0.05$) by Tukey test.

GAE = Gallic acid equivalent.

CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (phenolics) = 26.1; SEM (phenolics) = 3.3

Table 3 – Total flavonoid content in blueberry extracts obtained from different solvent concentration, time and temperature of extraction.

Total flavonoids, mg QE/g of dried fruit				
Solvent, %	Time, min			Mean
	30	60	120	
Temperature, 30 °C				
60	4.74 ^{Aa}	3.91 ^a	3.78 ^b	4.14
80	3.12 ^B	3.27	3.18	3.19
Mean	3.93	3.59	3.48	
Temperature, 40 °C				
60	3.78 ^b	4.84 ^{Aa}	4.17 ^{ab}	4.26
80	3.56	3.99 ^B	3.70	3.75
Mean	3.67	4.41	3.93	
Temperature, °C	Time, min			Mean
	30	60	120	
Solvent, 60%				
30	4.74 ^{Aa}	3.91 ^{Bab}	3.78 ^b	4.14
40	3.78 ^{Bb}	4.84 ^{Aa}	4.17 ^{ab}	4.26
Mean	4.26	4.37	3.97	
Solvent, 80%				
30	3.12	3.27	3.18	3.19
40	3.56	3.99	3.70	3.75
Mean	3.34	3.63	3.44	
Solvent, %	Temperature, °C		Mean	
	30	40		
Time, 30 min				
60	4.74 ^{Aa}	3.78 ^b	4.26	
80	3.12 ^B	3.56	3.34	
Mean	3.93	3.67		
Time, 60 min				
60	3.91 ^b	4.84 ^{Aa}	4.37	
80	3.27	3.99 ^B	3.63	
Mean	3.59	4.41		
Time, 120 min				
60	3.78	4.17	3.97	
80	3.18	3.70	3.44	
Mean	3.48	3.93		

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

QE: Quercetin equivalent.

CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (flavonoids) = 15.2; SEM (flavonoids) = 0.1

Table 4 – Antioxidant activity determined through the free radical capture method (DPPH) and inhibition percentage through the β -carotene model system of blueberry extracts obtained from different solvent concentration, time and temperature of extraction.

Solvent, %	DPPH, $\mu\text{mol TEAC/g de fruto seco}$			Mean
	Time, min			
	30	60	120	
60	6.50 ^A	6.14	5.40	6.01
80	3.33 ^{Bb}	4.45 ^{ab}	5.75 ^a	4.51
Mean	4.91	5.29	5.58	
Solvent, %	β -Caroteno, %		Mean	
	Temperature, °C			
	30	40		
60	59.01	58.25 ^B	58.65	
80	63.13 ^b	73.97 ^{Aa}	68.55	
Mean	61.09	66.11		

Means with the same small letter in the row do not differ ($P > 0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P > 0.05$) by Tukey test.

TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity.

CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (DPPH) = 31.0; SEM (DPPH) = 0.3

CV (β -Caroteno) = 14.5; SEM (β -Caroteno) = 1.5

Table 5 – Antioxidant activity determined through the free radical capture method (ABTS⁺) in blueberry extracts obtained from different solvent concentrations, time and temperature of extraction.

ABTS ⁺ radical-scavenging activity, μmol TEAC/g of dried fruit				
Solvent, %	Time, min			Mean
	30	60	120	
Temperature, 30 °C				
60	1.84	1.79	1.59	1.74
80	1.54	1.32	1.35	1.40
Mean	1.68	1.55	1.47	
Temperature, 40 °C				
60	1.91 ^b	1.68 ^b	3.39 ^{Aa}	2.32
80	1.54 ^b	2.65 ^a	2.22 ^{Bab}	2.14
Mean	1.72	2.16	2.80	
Temperature, °C	Time, min			Mean
	30	60	120	
Solvent, 60%				
30	1.84	1.79	1.59 ^B	1.74
40	1.91 ^b	1.68 ^b	3.39 ^{Aa}	2.32
Mean	1.87	1.73	2.49	
Solvent, 80%				
30	1.54	1.32 ^B	1.35	1.40
40	1.54 ^b	2.65 ^{Aa}	2.22 ^{ab}	2.14
Mean	1.54	1.98	1.78	
Solvent, %	Temperature, °C		Mean	
	30	40		
Time, 30 min				
60	1.84	1.91	1.87	
80	1.54	1.54	1.54	
Mean	1.68	1.72		
Time, 60 min				
60	1.79	1.68	1.73	
80	1.32 ^b	2.65 ^a	1.98	
Mean	1.55	2.16		
Time, 120 min				
60	1.59 ^b	3.39 ^{Aa}	2.49	
80	1.35 ^b	2.22 ^{Ba}	1.78	
Mean	1.47	2.80		

Means with the same small letter in the row do not differ (P>0.05) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ (P>0.05) by Tukey test.

TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity.

CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (ABTS⁺) = 34.5; SEM (ABTS⁺) = 0.1

Table 6 – Antioxidant activity determined through the ferric reducing antioxidant power (FRAP) in blueberry extracts obtained from different solvent concentrations, time and temperature of extraction.

Ferric reducing activity, μmol TEAC/g of dried fruit				
Solvent, %	Time, min			Mean
	30	60	120	
Temperature, 30 °C				
60	6.00 ^{Aa}	4.73 ^{Aab}	3.89 ^b	4.87
80	3.51 ^B	3.00 ^B	2.99	3.17
Mean	4.76	3.86	3.44	
Temperature, 40 °C				
60	3.49 ^b	5.35 ^a	5.60 ^a	4.81
80	3.58	4.57	4.60	4.25
Mean	3.54	4.96	5.10	
Temperature, °C	Time, min			Mean
	30	60	120	
Solvente 60%				
30	6.00 ^{Aa}	4.73 ^{ab}	3.89 ^{Bb}	4.87
40	3.49 ^{Bb}	5.35 ^a	5.60 ^{Aa}	4.81
Mean	4.75	5.04	4.75	
Solvente 80%				
30	3.51	3.00 ^B	2.99 ^B	3.17
40	3.58	4.57 ^A	4.60 ^A	4.25
Mean	3.55	3.79	3.79	
Solvent, %	Temperature, °C		Mean	
	30	40		
Time, 30 min				
60	6.00 ^{Aa}	3.49 ^b	4.75	
80	3.51 ^B	3.58	3.55	
Mean	4.76	3.54		
Time, 60 min				
60	4.73 ^A	5.35	5.04	
80	3.00 ^{Bb}	4.57 ^a	3.79	
Mean	3.86	4.96		
Time, 120 min				
60	3.89 ^b	5.60 ^a	4.75	
80	2.99 ^b	4.60 ^a	3.79	
Mean	3.44	5.10		

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity.

CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (FRAP) = 25.2; SEM (FRAP) = 0.2

MANUSCRITO 3

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS NA EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
MIRTILO (*Vaccinium ashei Reade*) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE**

**Artigo em fase de revisão pelos autores para submissão à revista Food
Chemistry**

(Formatado conforme as normas da revista)

ORIGINAL ARTICLE

Influência de diferentes parâmetros na extração assistida por ultrassom de compostos bioativos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) e avaliação da capacidade antioxidante

Natiéli Piovesan^{a*}; Vanessa Bordin Viera^a; Renius Mello de Oliveira^a; Cesar Augusto Bizzi^b;
Érico Marlon de Moraes Flores^b; Leadir Lucy Martins Fries^a

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS/Brasil,

^bDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS/Brasil. E-mails: natipiovesan@gmail.com; vanessa.bordinviera@gmail.com; reniusmello@gmail.com; c_bizzi@yahoo.com.br; ericommf@gmail.com; lucymicro@yahoo.com.br

*Autor de correspondência: Av. Roraima n° 1000, Prédio 42, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS – Brasil, Fone: +55 55 3220 8254, e-mail: natipiovesan@gmail.com

Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes parâmetros (concentração de solvente hidroetanólico, tempo e potência) na extração assistida por ultrassom de compostos bioativos do mirtilo, visando maior rendimento dos compostos e maior atividade antioxidante. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas e as atividades antioxidantes foram quantificadas através de quatro métodos distintos: DPPH, ABTS⁺, FRAP e β -caroteno e foi calculado o IC₅₀ dos extratos. As melhores condições de extração para fenólicos, flavonóides e antocianinas foi utilizando 60% de solvente, 20 minutos e 80 W de potência, sendo que os compostos fenólicos não sofreram influência da potência e os flavonoides não foram influenciados pelo solvente. A atividade antioxidante pelo método DPPH e o IC₅₀ apresentaram os melhores resultados com 60% de solvente, 60 minutos e 80 W de potência, as mesmas condições foram encontradas para o β -caroteno, porém com 20 minutos de extração. A metodologia de FRAP apresentou-se mais eficiente com solvente 60%, 60 minutos e 220W de potência, enquanto que para o método ABTS⁺ foi com 80% de solvente a 80 W de potência, independentemente do tempo de extração. Portanto, o estudo concluiu que as melhores condições de extração de compostos bioativos do mirtilo são 60% de solvente, 60 minutos e 80 W e confirma a capacidade antioxidante do mirtilo, podendo este ser utilizado como ingrediente funcional ou como antioxidante natural na elaboração de produtos alimentícios.

Palavras-chave: compostos bioativos, antioxidantes, mirtilo, ultrassom.

1. Introdução

O mirtilo é uma das pequenas frutas mais cultivada principalmente nos Estados Unidos, Canadá e Polônia. Estas bagas são caracterizadas pela propriedade de eliminar radicais livres, devido à presença de compostos bioativos como os compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides e ácidos clorogênicos (Seeram et al., 2006). O consumo de mirtilos pode potencialmente contribuir para a diminuição do risco de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e urinárias (Seeram, 2008), além de contribuir para efeitos contra o câncer (Routray & Orsat, 2010).

Recentemente, diferentes métodos têm sido desenvolvidos para extrair compostos bioativos a partir de plantas, por exemplo, o uso de enzimas (Puri, Sharma, & Barrow, 2012), extração assistida por ultrassom (EAU) (Teng, Lee, e Choi, 2014; Ramic et al, 2015), uso de micro-ondas (Valdes, Vidal, Beltran, Canals, & Garrigos, 2015) e fluido supercrítico (Meneses, Caputo, Scognamiglio, Reverchon, e Adami, 2015).

Ao comparar o método convencional de extração com o uso de ultrassom para a extração de compostos fenólicos, o ultrassom foi classificado como mais rápido, mais eficiente, e com maior economia de solvente (Tao, Wu, Zhang, & Sun, 2014). O ultrassom gera um efeito de cavitação no solvente, resultando em maior velocidade no movimento de moléculas, aumentando a penetração do solvente no material alvo (Toma, Vinatoru, Paniwnyk, & Mason, 2001). Isto resulta na libertação acelerada dos compostos alvo (Avhad & Rathod, 2015).

Assim, essa tecnologia está sendo amplamente utilizada na extração de compostos bioativos a partir de fontes naturais para uso em sistemas alimentares (Corbin et al., 2015). Além disso, o uso de ultrassom reduz a utilização de solventes tóxicos, o que é desejável na extração de compostos bioativos para consumo humano.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar a influência de diferentes parâmetros (concentração de solvente hidroetanólico, tempo e potência) de extração assistida por ultrassom de compostos bioativos do mirtilo (*Vaccinium ashei Reade*), visando identificar às condições que apresentem os melhores rendimentos dos compostos bioativos e a maior atividade antioxidante dos extratos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Matéria-prima

Os mirtilos (*Vaccinium ashei Reade*) da cultivar Clímax foram cultivados por sistema orgânico de produção, sendo adquiridos do Pomar Vale do Dourado localizado na cidade de Erechim (RS).

Os frutos foram selecionados pela ausência de defeitos, lavados com detergente neutro, enxaguados em água corrente e em seguida realizada a sanitização com 200 mg.L⁻¹ de hipoclorito de sódio durante 20 minutos e posterior enxágue. Os frutos foram desidratados em estufa com circulação forçada de ar à 50°C por 48 horas, congelados (-18°C) e triturados em moinho analítico arrefecido à 4°C (Quimis, modelo Q298A21, Brasil) com o auxílio de um banho ultra-termostatizado (Solab, modelo SL-152/10) e armazenados em frasco âmbar à -18°C, até a obtenção do extrato.

2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos de mirtilo foram preparados a partir da amostra previamente moída, pesada em um béquer e adicionada de solvente hidroetanólico (1:10 m/v). Em seguida esta mistura foi

imersa em banho de ultrassom (Thornton®, modelo T14) operando em frequência de 25 kHz à 30°C.

Realizou-se 18 tratamentos com 3 repetições, variando a concentração do solvente hidroetanólico 60% e 80%, potência 80, 220 e 550 W e o tempo de extração 20, 60 e 120 minutos. Após o término das extrações, os extratos foram filtrados e centrifugados a 3000 rpm por 20 min. Posteriormente os sobrenadantes foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer (-18 °C) até o momento das análises.

2.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999) com modificações por Roesler (2007). Para a reação colorimétrica, transferiu-se para tubos de ensaio 0,4 mL dos extratos previamente diluídos e 2,0 mL de solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu 0,2 N (diluído na proporção 1:10). Após agitação os tubos foram deixados em repouso na ausência de luz por 6 minutos. Após, adicionou-se 1,6 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v) agitou-se novamente os tubos e os mesmos foram incubados durante 5 minutos em banho-maria a 50°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SP – 220 marca Biospectro) a 760 nm, calibrado com solução referência de ácido gálico. O branco foi preparado com as mesmas condições, porém com substituição do extrato. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/ g de fruto seco de mirtilo (mg EAG g^{-1}).

2.4 Determinação de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método proposto por Zhishen, Mengcheng & Janming (1999). Em tubos de ensaio adicionou-se alíquota de 0,5mL dos extratos

previamente diluídos adicionados de 2 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se 0,15 mL de nitrito de sódio (NaNO₂) e após 5 minutos, 0,15 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃). Os tubos permaneceram em repouso por 6 minutos no escuro e foram adicionados de 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e 1,2 mL de água destilada. Agitou-se a solução e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SP – 220 marca Biospectro) a 510 nm, calibrado com solução referência de quercetina. O branco foi preparado nas mesmas condições, porém com substituição do extrato pelo solvente. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg equivalente de quercetina/ g de fruto seco de mirtilo (mg EQ g⁻¹).

2.5 Determinação de Antocianinas Totais

Para a determinação do teor de antocianinas utilizou-se o método de pH-diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Diluiu-se 0,5 mL do extrato com 2,5 mL de tampão de cloreto de potássio 0,025 M, com pH 1,0 e tampão de acetato de sódio 0,4 M, com pH 4,5, separadamente. As amostras diluídas foram deixadas à temperatura ambiente, na ausência da luz durante 15 minutos e a leitura de cada amostra foi realizada 520 e 700 nm contra um branco com água destilada. O teor de antocianinas será calculado usando a seguinte equação 1:

$$CA = A * PM * FD / (\epsilon * P) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: CA= Conteúdo de antocianinas (mg/100g de matéria seca); A= absorvância ($A_{520nm} - A_{700nm}$)_{pH1.0} - ($A_{520nm} - A_{700nm}$)_{pH4.5}, PM= peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (C₁₅H₁₁O₆, 449.2), FD = fator de diluição, ϵ =absortividade molar (26900), e P= peso da amostra (g).

2.6 Atividade Antioxidante – Método ABTS^{•+}

A atividade antioxidante quantificada através do método ABTS^{•+} (radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) seguiu a metodologia descrita por Re, Pellegrini,

Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans (1999) com modificações. Formou-se o radical ABTS^{•+} pela reação da solução ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados no escuro à 25°C, durante 12-16 horas. Após o radical foi diluído em água destilada até obtenção de leitura de absorvância de $700 \pm 0,020$ a 734nm. Preparou-se a partir de cada extrato quatro diluições diferentes, em triplicatas. Misturou-se em ambiente escuro uma alíquota de 15 µL do extrato previamente diluído com 1,5 µL do radical ABTS^{•+}. Realizou-se as leituras após 6 minutos da reação em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) a 734nm. Foi preparada uma solução controle conforme o procedimento descrito acima, sem adição do extrato. Utilizou-se Trolox como referência e os resultados expressos em µmol equivalentes de trolox/ g de amostra (µmol TEAC g⁻¹).

2.7 Atividade Antioxidante – Método DPPH

A metodologia fundamenta-se na capacidade de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), segundo Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). Incuba-se 2,5 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 0,5 mL de soluções contendo concentrações crescentes dos extratos, por 30 minutos e ausência da luz. Realizou-se uma solução “controle” com 2,5mL da solução metanólica de DPPH em 0,5mL de metanol em substituição do extrato e para o “branco” utilizou-se metanol. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) no comprimento de onda de 517nm. A capacidade de sequestrar radical livre foi calculada conforme a equação 2, e expressa como percentual de inibição de oxidação do radical.

$$\% \text{ Inibição} = ((\text{Abs.}_{DPPH} - \text{Abs.}_{Am/Trolox}) / \text{Abs.}_{DPPH}) * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: Abs. _{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH e Abs. _{Am/Trolox} é a absorvância da amostra ou padrão em solução. A Abs. _{Am/Trolox} foi calculada com base na diferença da absorvância da solução de amostra em teste com o seu branco.

O valor de IC₅₀ foi determinado pela equação da reta plotada através dos resultados contendo os valores de concentração (mg/mL) utilizadas no eixo X e os percentuais de proteção encontrados no eixo Y. Também foi construída uma curva padrão de Trolox em μmol versus % de inibição, onde o resultado foi expresso em μmol equivalentes de Trolox/ g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

2.8 Atividade Antioxidante – Método FRAP

A atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi realizada seguindo a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado somente no momento das análises, procedendo a mistura de 11 mL de tampão acetato (0,3 M, pH: 3,6), 1,1 mL de solução TPTZ (tripiridiltriazina) (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Adicionou-se 200 μL do extrato previamente diluído e adicionou-se 1800 μL do reagente FRAP, após as amostras foram incubadas a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Realizou-se um branco para cada amostra, sem adição do extrato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (SP-220 marca Biospectro) no comprimento de onda de 593nm. Utilizou-se o Trolox como referência e os resultados expressos em μmol equivalentes de trolox / g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

2.9 Atividade Antioxidante – Método β -caroteno/ácido linoleico

Utilizou-se a metodologia descrita por Cao et al. (2009) com modificações. Adicionou-se em balão protegido da luz, 50 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40 e 1 mL de solução

beta caroteno. O clorofórmio foi evaporado com auxílio de evaporador rotatório a 40°C, por aproximadamente 10 minutos, dissolveu-se o resíduo em 50 mL de água deionizada e oxigenada, adicionada aos poucos e sob vigorosa agitação, para formação de uma emulsão límpida.

Adicionou-se 5,0 mL da emulsão a um tubo de ensaio contendo 0,5 mL dos extratos diluídos em diferentes concentrações e a absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) a 470nm. Após a primeira leitura incubou-se os tubos em banho-maria a 50°C para que ocorresse a reação de oxidação e as leituras foram repetidas em intervalos de 15 minutos até completar 120 minutos. Realizou-se um controle positivo, contendo 5 mL da emulsão de betacaroteno e 0,5 mL de água destilada e um controle negativo contendo 5 mL da emulsão sem o betacaroteno e 0,5 mL de água destilada.

Os resultados foram expressos em percentagem da atividade antioxidante conforme Equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = [1 - (\text{Absc}_{\text{inicial}} - \text{Absc}_{\text{final}}) / (\text{Absam}_{\text{inicial}} - \text{Absam}_{\text{final}})] * 100 \text{Equação (3)}$$

Onde: % Inibição = percentagem da atividade antioxidante;

$\text{Absc}_{\text{inicial}}$ = absorbância inicial do controle;

$\text{Absc}_{\text{final}}$ = absorbância final do controle;

$\text{Absam}_{\text{inicial}}$ = absorbância inicial da amostra e

$\text{Absam}_{\text{final}}$ = absorbância final da amostra.

2.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS[®] - *Statistical Analysis System* versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Independente da

significância das interações foram testadas as tendências via contrastes a partir dos coeficientes para interpolação dos polinômios ortogonais.

3. Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os valores de P sobre as condições de extração (concentração do solvente, tempo e potência) e suas interações, na obtenção de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, antocianinas totais, atividades antioxidantes (ABTS⁺, DPPH, FRAP e β -caroteno) e o IC₅₀ dos extratos de mirtilo.

Os valores de P (Tabela 1) indicam interações (P<0,05) entre solvente, tempo e potência de extração para as antocianinas totais (AT), para as atividades antioxidantes pelos métodos FRAP e β -caroteno e para o IC₅₀. Os fenólicos totais (CFT) apresentaram interação (P<0,05) entre solvente e tempo de extração, já para o conteúdo de flavonóides totais (FT) houve interação entre o tempo e a potência de extração. A atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ ocorreu interação (P<0,05) somente entre solvente e a potência de extração, enquanto o DPPH apresentou interações do solvente com o tempo, solvente com a potência e entre tempo e potência de extração.

3.1 Fenólicos Totais e Flavonoides Totais

A Tabela 2 apresenta os valores médios do conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom em diferentes condições de concentração de solvente, tempo e potência de extração.

Para os teores de fenólicos totais (Tabela 2), analisando a interação do solvente com o tempo de extração, observa-se que o solvente 60% apresentou os maiores valores não diferindo estatisticamente nos tempos 20 e 60 minutos, entretanto os extratos diferiram-se (P<0,05) dos

obtidos com solvente 80%. Dessa forma, visando economia de energia para obtenção de extrato com maior teor de fenólicos totais a extração assistida por ultrassom pode ser realizada por 20 minutos e com solvente 60%.

Corroborando com este estudo Xu, Zhou, Zheng, Li, Li & Li (2016) otimizaram a extração em ultrassom de compostos fenólicos de flores (*Jatropha integerrima*) e observaram máxima extração com 59,6% de solvente hidroetanólico.

Zhou, Zheng, Yang, Liang, Li, Yang & Xu (2013) estudaram o efeito da concentração do solvente hidroetanólico (0, 20, 40, 60, 80 e 100%) na extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de *Clerodendrum cyrtophyllum* e observaram que a recuperação máxima dos compostos foi com 60% de etanol.

Wu, Yan, Liu, Marcone, Aisa, & Tsao (2012), observaram que a concentração de 60% etanol foi mais eficiente que 80% ao extrair compostos fenólicos totais de batatas. Esse fato pode estar relacionado com a solubilidade dos compostos fenólicos, sendo mais solúveis em solvente hidroetanólico 60%. Da mesma forma, Cacace & Mazza (2003) revelaram que os fenólicos totais máximos em extratos de groselhas negras foram obtidos com cerca de 60% etanol, seguida por um decréscimo com aumento da concentração do solvente.

Em relação ao tempo de extração, Oliveira, Pinheiro & Barão (2015) ao estudarem a extração assistida por ultrassom de polifenóis das folhas da mandioca encontraram 20 minutos como o melhor tempo. Porto, Porretto & Decorti (2013) extraíram polifenóis totais de sementes de uvas e observaram que os rendimentos máximos foram obtidos após 15 minutos de aplicação de ultrassom, isso ocorre devido aos polifenóis estarem localizados na região externa da partícula, onde é mais acessível ao solvente.

Altemimi, Watson, Choudhary, Dasari & Lightfoot (2016) ao otimizar o tempo de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de abóboras e pêssegos, encontraram o tempo ótimo de 25,67 e 25,71 minutos, respectivamente.

O conteúdo de flavonoides totais (FT) apresentou somente interação entre o tempo e a potência de extração (Tabela 1). Analisando os resultados dos FT apresentados na Tabela 2, nota-se que não apresentaram diferença significativa. Dessa forma determinou-se que para uma maior economia de energia, os melhores parâmetros para a extração de FT são com 20 minutos de extração e 80 W de potência.

Segundo Shirsath, Sonawane, & Gogate (2012), os valores de 15 a 25 minutos são a faixa recomendada para extração assistida por ultrassom, sendo consideravelmente inferiores aos tempos utilizados para extrações convencionais.

3.2 Antocianinas Totais

O conteúdo de antocianinas totais (AT) foi influenciado pela interação da concentração do solvente com o tempo e com a potência de extração (Tabela 1). Ao analisar a Tabela 3 observa-se que o maior rendimento de AT foi 15,57 mg cianidina 3-O-glicosídeo/100g da fruta seca, obtido com 60% de solvente, 60 minutos e 80 W de potência. Estes resultados apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) quanto ao uso do solvente 80% e da potência 220 W, porém não apresentaram diferença estatística dos tempos de 20 e 120 minutos e da potência 550 W.

Portanto, baseando-se nos resultados encontrados e visando economia de energia e solvente para obtenção de extrato com maior teor de antocianinas totais pode-se utilizar ultrassom por 20 minutos, com solvente a 60% na potência de 80 W.

Zheng, Xu, Liu, Sun, Lin, & Liu (2013) ao extrair antocianinas totais de mirtilos variando as concentrações de etanol (20%, 40%, 60%, 80% e 100%), encontraram a melhor condição de

extração utilizando etanol 60%. Estudos de Cacace & Mazza (2003) com extração de antocianinas de groselhas negras utilizando solução aquosa de etanol nas concentrações 39, 50, 67, 84 e 95%, obtiveram os maiores teores de antocianinas entre 39-67%, sendo que entre 67-95% ocorreu diminuição do coeficiente de difusão.

Em relação ao tempo de extração, esse estudo está de acordo com He, Zhang, Yue, Liang, Jiang, Gao, & Yue (2016) que ao estudarem a extração assistida por ultrassom de antocianinas totais e de compostos fenólicos de mirtilos (*Vaccinium ashei*) encontraram o melhor tempo de extração em 23,67 minutos.

3.3 Atividades Antioxidantes -ABTS⁺, DPPH, FRAP e β -caroteno e o IC₅₀

A atividade antioxidante dos extratos de mirtilo foram avaliadas por diferentes métodos: ABTS⁺, DPPH, FRAP e β -Caroteno. A atividade antioxidante quantificada pelo método ABTS⁺ foi influenciada somente pela interação da potência com o solvente (Tabela 1). Na Tabela 4 observa-se que os valores da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ variaram de 1,96 a 2,55 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca.

O maior potencial antioxidante pelo método ABTS⁺ encontra-se utilizando solvente 80% na potência 80 W, diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do solvente 60% e das potências 220 e 500 W.

A Tabela 5 apresenta as atividades antioxidantes dos extratos de mirtilo determinadas pelo método de captura do radical livre (DPPH). Ao analisar a interação do solvente com o tempo de extração verificou-se que o extrato obtido com solvente 60% em 60 minutos apresentou maior atividade antioxidante (8,59 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca), diferindo significativamente ($P < 0,05$) do solvente 80% e do tempo de 20 minutos. A interação do solvente com a potência de extração apresentou maior atividade antioxidante (DPPH) com solvente 60% e 80 W de potência (8,74

$\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca), diferindo-se das demais potências e do solvente 80%. Quanto a interação entre a potência e o tempo, a atividade antioxidante não diferiu significativamente entre as potências, porém o tempo de 60 minutos mostrou-se mais eficiente em todas as potências, diferindo-se do tempo de 20 minutos, na potência de 220 W.

Conforme os resultados encontrados, a melhor condição para extração de compostos com atividade antioxidante pelo método DPPH é utilizando o ultrassom com solvente 60%, 60 minutos de extração e 80 W de potência.

Ilaiyaraaja et al. (2015) estudaram as condições de solvente para máxima extração de polifenóis de frutas de *Feronia limonia* e observaram que 62,7% de solvente hidroetanólico foi a condição ótima para a atividade antioxidante utilizando o método DPPH. O mesmo estudo indica um declínio das atividades antioxidantes quando utilizado uma concentração superior a 83.64% de solvente.

A atividade antioxidante medida pelo método de FRAP pode ser visualizada na Tabela 6, onde o extrato com maior atividade antioxidante apresentou 7,51 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca. As condições para esse resultado foi obtido com 60% de solvente, 60 minutos e 550 W de potência, que diferiu significativamente do solvente de 80%, do tempo de 20 minutos e da potência de 80 W. Portanto, por economia de energia, a melhor condição para a atividade antioxidante pelo método FRAP é em 60 minutos, 60% de solvente e 220 W de potência.

Esse resultado é semelhante ao encontrado por Tabaraki & Nateghi (2011) que ao utilizar o ultrassom com diferentes concentrações de etanol (50,70 e 90%) para extração de compostos antioxidantes de farelo de arroz, observaram que as maiores atividades antioxidantes pelos métodos DPPH e FRAP foram encontradas com etanol 67% e 65%, respectivamente.

A Tabela 7 apresenta os resultados da atividade antioxidante pelo método de β -caroteno, onde o extrato com maior poder de inibição (85,07%) da oxidação de ácido linolêico foi obtido

utilizando 20 minutos, 80% de solvente e 80 W de potência, não diferindo significativamente do solvente 60%. Portanto, baseando-se nos resultados e visando economia de solvente para obtenção de extrato com maior percentual de inibição da oxidação de ácido linoléico pode-se utilizar ultrassom por 20 minutos, 60% de solvente e 80 W de potência.

O IC_{50} representa a concentração de antioxidante que proporciona 50% de inibição da quantidade inicial de radicais livres, sendo que quanto menor o IC_{50} , maior a atividade antioxidante. O IC_{50} foi significativamente influenciado pela interação do solvente com o tempo e com a potência de extração (Tabela 1). Os resultados apresentados na Tabela 8, mostram que o extrato com maior capacidade inibitória (5,57 mg/mL) foi obtido com 60% de solvente, 60 minutos e 80 W de potência, diferindo-se estatisticamente das demais variáveis.

Pode-se considerar que os extratos apresentaram bom potencial antioxidante, pois de acordo com Arbos, Freitas, Stertz & Dornas (2010), valores superiores a 25 mg/mL são considerados com baixo potencial antioxidante.

Em relação a potência do ultrassom, as máximas extrações dos compostos bioativos e atividades antioxidantes quantificadas por ABTS⁺, DPPH e β -caroteno foram obtidas com a menor potência (80 W). Segundo Vinatoru (2001), quanto menor a energia (potência) menor o aumento da temperatura o que permite prevenir a degradação dos compostos bioativos.

Os resultados das atividades antioxidantes estão relacionadas com o conteúdo de compostos bioativos que o extrato possui, o qual podem ser influenciados pelas espécies e cultivares da planta em estudo, método de extração, fontes de variação da extração como o tempo, solvente, potência, entre outros. Por isso, investiga-se os efeitos sobre as condições experimentais de extração para maximizar as atividades antioxidantes do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade).

4. Conclusão

De um modo geral, os resultados demonstraram que as melhores condições para extração assistida por ultrassom de compostos bioativos de mirtilo são utilizando 60% de solvente, 20 minutos e 80 W de potência. A atividade antioxidante pelo método DPPH e o IC₅₀ apresentaram os melhores resultados com 60% de solvente, 60 minutos e 80 W de potência, as mesmas condições foram encontradas para o β -caroteno, porém com 20 minutos de extração. A metodologia de FRAP apresentou-se mais eficiente com solvente 60%, 60 minutos e 220W de potência, enquanto que para o método ABTS⁺ foi com 80% de solvente a 80 W de potência, independentemente do tempo de extração. A extração por ultrassom oferece muitas vantagens, incluindo a redução do volume de solventes, temperatura, tempo e energia. Portanto, a extração assistida por ultrassom de mirtilo é um processo verde favorável ao meio ambiente para a preparação de extratos ricos em antioxidantes naturais, destinados a substituir os antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/FAPERGS) por fornecer bolsa de doutorado ao primeiro autor e também ao Laboratório de Química Industrial e Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

5. References

Altemimi, A., Watson, D. G., Choudhary, R., Dasari, M. R., Lightfoot, D. A. (2016). Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLoS ONE*, 11(2), 1-20.

Arbos, K. A., Freitas, R. J. S. D., Stertz, S. C., & Dornas, M. F. (2010). Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 501-506.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, 68 (1), 240-248.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 749-760.

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*, p. 1-13. New York: John Wiley & Sons.

He, B., Zhang, L., Yue, X., Liang, J., Jiang, J., Gao, X., & Yue, P. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70-76.

Ilaiyaraja, N., Likhith, K. R., Babu S. G. R., & Khanum, F. (2015). Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 173, 348-354.

- Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (4), 1076-1080.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231–1237.
- Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27 (1), 53-60.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 630- 635.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P.R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. *Chemical Engineering and Processing*, 53, 10–23.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.
- Tabaraki, R., & Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (6), 1279–1286.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303–313
- Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M. F., Aisa, H. A., & Tsao, R. (2012). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using

orthogonal array design. *Food Chemistry*, 133(4), 1292-1298.

Xu, D. P., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A. N. & Li, H. B. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules*, 21(1), 18.

Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., & Liu, H. (2013). Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology*, 104, 17-25.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

Zhou, J., Zheng, X., Yang, Q., Liang, Z., Li, D., Yang, X., & Xu, J. (2013). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction and Radical-Scavenging Capacity of Phenols and Flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz Leaves. *Plos One*, 8(7), e68392.

Tabela 1- Resultados (P= 0,05) para analisar o efeito de independência ou interações entre fatores de tratamento em compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais, atividades antioxidantes pelos métodos ABTS⁺, DPPH, FRAP, β -caroteno e o IC₅₀ dos extratos de mirtilo.

	Parâmetros			Interação (parâmetros)			
	Solvente	Tempo	Potência	S x T	S x P	T x P	S x T x P
CFT	<,0001	<,0001	0,0001	<,0001	0,9602	0,8881	0,2987
FT	<,0001	0,8751	0,7656	0,2003	0,6156	0,0437	0,1224
AT	<,0001	<,0001	0,1246	0,1159	<,0001	0,0116	<,0001
ABTS ⁺	0,0002	0,0773	0,0065	0,4919	0,0006	0,3989	0,0882
DPPH	<,0001	0,0007	0,0044	0,0080	0,0183	0,0296	0,6032
FRAP	<,0001	0,0003	0,0275	0,0121	0,7259	0,2373	0,0004
β -caroteno	<,0001	<,0001	0,2856	0,0085	0,0229	0,0010	0,0012
IC ₅₀	<,0001	<,0001	0,0007	0,1836	0,0029	0,0002	0,0068

p>0,05: insignificante; p<0,05: significativo; S: solvente; P: potência; M: modo; CFT: Conteúdo de fenólicos totais; FT: Flavonóides totais; AT: Antocianinas totais.

Tabela 2- Resultados das interações entre solvente e tempo para o conteúdo de fenólicos totais e das interações de potência e tempo para flavonoides totais dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom.

Fenólicos Totais (mg GAE/g de fruta seca)				
Solvente (%)	Tempo (minutos)			Média
	20	60	120	
60	118,13 ^{Aab}	127,67 ^{Aa}	106,86 ^b	117,55
80	78,51 ^{Bb}	56,86 ^{Bc}	111,09 ^a	82,15
Média	98,32	92,27	108,98	

Flavonoides Totais (mg EQ/g de fruta seca)				
Potência (W)	Tempo (minutos)			Média
	20	60	120	
80	4,11	3,83	3,81	3,92
220	3,70	3,89	3,99	3,86
550	3,81	4,31	3,90	3,91
Média	3,87	3,91	3,90	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: Erro padrão das médias;

CV (fenólicos) = 23,6; CV (flavonoides) = 15,0; SEM (fenólicos) = 2,2; SEM (flavonoides) = 0,1;

GAE = Ácido gálico equivalente.

EQ: Equivalentes de quercetina

Tabela 3- Resultados das interações entre solvente, tempo e potência para o teor de antocianinas totais dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom.

Antocianinas Totais (mg cianidina 3-O-glicosídeo/100g da fruta seca)				
Solvente (%)	Tempo (minutos)			Média
	20	60	120	
Potência 80 W				
60	11,58 ^A	15,57 ^A	12,77	13,30
80	3,98 ^{Bb}	3,21 ^{Bb}	10,63 ^a	5,94
Média	7,77	9,39	11,70	
Potência 220 W				
60	5,99 ^b	6,90 ^{ab}	11,56 ^a	8,15
80	9,61	11,61	13,31	11,51
Média	7,80	9,25	12,43	
Potência 550 W				
60	14,51 ^A	10,75	12,38 ^A	12,54
80	3,62 ^B	5,91	5,06 ^B	4,86
Média	9,07	8,33	8,72	
Solvente (%)	Potência (W)			Média
	80	220	550	
Tempo 20 minutos				
60	11,58 ^{Aa}	5,99 ^b	14,51 ^{Aa}	10,69
80	3,98 ^{Bb}	9,61 ^a	3,62 ^{Bb}	5,74
Média	7,77	7,80	9,07	
Tempo 60 minutos				
60	15,57 ^{Aa}	6,90 ^b	10,75 ^{ab}	11,07
80	3,21 ^{Bb}	11,61 ^a	5,91 ^{ab}	6,91
Média	9,39	9,25	8,33	
Tempo 120 minutos				
60	12,77	11,56	12,38 ^A	12,23
80	10,63 ^a	13,31 ^a	5,06 ^{Bb}	9,67
Média	11,70	12,43	8,72	
Potência (W)	Tempo (minutos)			Média
	20	60	120	
Solvente 60%				
80	11,58 ^A	15,57 ^A	12,77	13,30
220	5,99 ^{Bb}	6,90 ^{Bab}	11,56 ^a	8,15
550	14,51 ^{Aa}	10,75 ^{Aa}	12,38 ^a	12,54
Média	10,69	11,07	12,23	
Solvente 80%				
80	3,98 ^{Bb}	3,21 ^{Bb}	10,63 ^{Aa}	5,94
220	9,61 ^A	11,61 ^A	13,31 ^A	11,51
550	3,62 ^B	5,91 ^B	5,06 ^B	4,86
Média	5,74	6,91	9,67	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's
Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's
CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias
CV (antocianinas) = 45,4; EPM(antocianinas) = 0,6;

Tabela 4- Resultados das interações entre solvente e potência para a atividade antioxidante determinada pelo método de captura do radical livre (ABTS⁺) dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom

Solvente (%)	ABTS ($\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca)			Média
	Potência (W)			
	80	220	550	
60	1,96 ^B	2,03	2,00	2,00
80	2,55 ^{Aa}	2,07 ^b	2,08 ^b	2,23
Média	2,26	2,06	2,04	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: Erro padrão das médias

CV (ABTS) = 36,0; EPM(ABTS) = 0,1;

TEAC: Capacidade antioxidante equivalente de Trolox

Tabela 5- Resultados das interações entre solvente e tempo, solvente e potência e potência e tempo para a atividade antioxidante determinada pelo método de captura do radical livre (DPPH) dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom.

DPPH				
($\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca)				
Tempo (minutos)				
Solvente (%)	20	60	120	Média
60	7,38 ^{Ab}	8,59 ^{Aa}	8,15 ^{Aab}	8,04
80	6,24 ^B	6,54 ^B	5,83 ^B	6,20
Média	6,81	7,57	6,99	
Potência (W)				
Solvente (%)	80	220	550	Média
60	8,74 ^{Aa}	7,74 ^{Ab}	7,64 ^{Ab}	8,04
80	6,27 ^B	6,13 ^B	6,22 ^B	6,20
Média	7,51	6,94	6,93	
Tempo (minutos)				
Potência (W)	20	60	120	Média
80	7,14	8,18	7,19	7,51
220	6,25 ^b	7,39 ^a	7,16 ^{ab}	6,94
550	7,04	7,12	6,63	6,93
Média	6,81	7,57	6,99	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: Erro padrão das médias

CV (DPPH) = 28,9; EPM (DPPH) = 0,2;

TEAC: Capacidade antioxidante equivalente de Trolox

Tabela 6 - Resultados das interações entre solvente, tempo e potência para a atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom.

Capacidade Redutora do Ferro – FRAP				
($\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta seca)				
Tempo (minutos)				
Solvente (%)	20	60	120	Média
Potência 80 W				
60	5,04	4,82	7,14 ^A	5,67
80	4,29	4,76	3,67 ^B	4,24
Média	4,66	4,79	5,40	
Potência 220 W				
60	5,19	6,95 ^A	6,69	6,27
80	4,48	4,42 ^B	6,17	5,02
Média	4,83	5,69	6,43	
Potência 550 W				
60	4,04 ^b	7,51 ^{Aa}	6,02 ^{ab}	5,86
80	4,07	3,71 ^B	4,72	4,17
Média	4,06	5,61	5,37	
Potência (W)				
Solvente (%)	80	220	550	Média
Tempo 20 minutos				
60	5,04	5,19	4,04	4,75
80	4,29	4,48	4,07	4,28
Média	4,66	4,83	4,06	
Tempo 60 minutos				
60	4,82 ^b	6,95 ^{Aab}	7,51 ^{Aa}	6,43
80	4,76	4,42 ^B	3,71 ^B	4,30
Média	4,79	5,69	5,61	
Tempo 120 minutos				
60	7,14 ^A	6,69	6,02	6,62
80	3,67 ^B	6,17	4,72	4,85
Média	5,40	6,43	5,37	
Tempo (minutos)				
Potência (W)	20	60	120	Média
Solvente 60%				
80	5,04	4,82 ^B	7,14	5,67
220	5,19	6,95 ^{AB}	6,69	6,27
550	4,04 ^b	7,51 ^{Aa}	6,02 ^{ab}	5,86
Média	4,75	6,43	6,62	
Solvente 80%				
80	4,29	4,76	3,67	4,24
220	4,48	4,42	6,17	5,02
550	4,07	3,71	4,72	4,17
Média	4,28	4,30	4,85	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's
Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's
CV (%): coeficiente de variação; EPM: Erro padrão das médias
CV (FRAP) = 24,4; EPM (FRAP) = 0,1.

Tabela 7- Resultados das interações entre solvente, tempo e potência para o percentual de inibição através do sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom.

Solvente (%)	β -caroteno/ácido linoleico (%)			Média
	Tempo (minutos)			
	20	60	120	
	Potência 80 W			
60	84,35 ^a	69,60 ^b	71,74 ^{ab}	75,23
80	85,07 ^a	76,65 ^{ab}	68,78 ^b	76,83
Média	84,71	73,13	70,26	
	Potência 220 W			
60	72,95	71,80	62,09 ^B	68,95
80	84,63 ^a	70,53 ^b	80,50 ^{Aab}	78,55
Média	78,79	71,16	71,29	
	Potência 550 W			
60	68,37 ^{ab}	79,76 ^a	65,88 ^{Bb}	71,34
80	80,65	76,93	81,36 ^A	79,64
Média	74,51	78,35	73,62	
Solvente (%)	Potência (W)			Média
	80	220	550	
	Tempo 20 minutos			
60	84,35 ^a	72,95 ^a	68,37 ^b	75,23
80	85,07	84,63	80,65	83,45
Média	84,71	78,79	74,51	
	Tempo 60 minutos			
60	69,60	71,80	79,76	73,72
80	76,65	70,53	76,93	74,70
Média	73,13	71,16	78,35	
	Tempo 120 minutos			
60	71,74	62,09 ^B	65,88 ^B	66,57
80	68,78	80,50 ^A	81,36 ^A	76,88
Média	70,26	71,29	73,62	
Potência (W)	Tempo (minutos)			Média
	20	60	120	
	Solvente 60%			
80	84,35 ^{Aa}	69,60 ^b	71,74 ^{ab}	75,23
220	72,95 ^{AB}	71,80	62,09	68,95
550	68,37 ^{Bab}	79,76 ^a	65,88 ^b	71,34
Média	75,23	73,72	66,57	
	Solvente 80%			
80	85,07 ^a	76,65 ^{ab}	68,78 ^b	76,83
220	84,63 ^a	70,53 ^b	80,50 ^{ab}	78,55
550	80,65 ^a	76,93 ^a	81,36 ^a	79,65
Média	83,45	74,70	76,88	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's
Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's
CV (%): coeficiente de variação; EPM: Erro padrão das médias
CV (β -caroteno) = 11,7; EPM (β -caroteno) = 0,8.

Tabela 8 - Resultados das interações entre solvente, tempo e potência para o IC₅₀ dos extratos de mirtilo obtidos através do ultrassom.

Solvente (%)	IC ₅₀ mg/mL			Média
	Tempo (minutos)			
	20	60	120	
	Potência 80 W			
60	6,81 ^a	5,57 ^{Bb}	6,54 ^{Bab}	6,31
80	7,53	7,44 ^A	8,27 ^A	7,75
Média	7,17	6,51	7,40	
	Potência 220 W			
60	7,72 ^a	6,58 ^b	6,56 ^{Bb}	6,95
80	8,17 ^a	7,04 ^b	7,71 ^{Aab}	7,64
Média	7,95	6,81	7,13	
	Potência 550 W			
60	7,10 ^B	6,91 ^B	7,11	7,04
80	8,23 ^A	7,93 ^A	7,56	7,91
Média	7,67	7,42	7,33	
Solvente (%)	Potência (W)			Média
	80	220	550	
	Tempo 20 minutos			
60	6,81	7,72	7,10 ^B	7,21
80	7,53	8,17	8,23 ^A	7,98
Média	7,17	7,95	7,67	
	Tempo 60 minutos			
60	5,57 ^{Bb}	6,58 ^a	6,91 ^{Ba}	6,35
80	7,44 ^{Aa}	7,04	7,93 ^A	7,47
Média	6,51	6,81	7,42	
	Tempo 120 minutos			
60	6,54 ^B	6,56 ^B	7,11	6,73
80	8,27 ^A	7,71 ^A	7,56	7,85
Média	7,40	7,13	7,33	
Potência (W)	Tempo (minutos)			Média
	20	60	120	
	Solvente 60%			
80	6,81 ^a	5,57 ^{Bb}	6,54 ^{ab}	6,31
220	7,72 ^a	6,58 ^{Ab}	6,56 ^b	6,95
550	7,10	6,91 ^A	7,11	7,04
Média	7,21	6,35	6,73	
	Solvente 80%			
80	7,53	7,44	8,27	7,75
220	8,17 ^a	7,04 ^b	7,71 ^{ab}	7,64
550	8,23	7,93	7,56	7,91
Média	7,98	7,47	7,85	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem (P>0,05) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem (P>0,05) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

CV (IC₅₀) = 15,2; EPM (IC₅₀) = 0,1.

IC₅₀ = expressa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

4 DISCUSSÃO GERAL

Os polifenóis, ou compostos fenólicos, têm sido largamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde, como uma potente atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres. (WOLLGAST; ANKLAN, 2000). Outros efeitos positivos para a saúde são as propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora (GOTTI et al., 2006).

Os polifenóis, tais como as antocianinas estão presentes em frutas, sendo que em frutas vermelhas e roxas e representam 50-80% do conteúdo total de polifenóis. Quantidades elevadas são encontradas em uvas, mirtilos, amoras, cerejas ou cranberries e podem chegar a concentrações de até 3000 mg / kg de peso fresco (MULLER; SCHANTZ; RICHLING, 2012).

O mirtilo tem seu consumo favorecido devido a sua cor e ao alto conteúdo de antioxidantes naturais. A extração de compostos bioativos é o primeiro passo na utilização de fitoquímicos para elaboração de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos, pois esses compostos estão diretamente ligados com a atividade antioxidante.

Neste trabalho foi avaliada a influência de diferentes parâmetros (tempo, temperatura, concentração de solvente e potência) em diferentes métodos de extração (micro-ondas focalizada, ultrassom e convencional) de compostos bioativos do mirtilo buscando identificar a condição que proporciona a maior extração desses compostos, e caracterizando os extratos quanto a sua capacidade antioxidante e antimicrobiana.

O manuscrito 1 avaliou a extração de compostos bioativos do mirtilo utilizando extração assistida por micro-ondas, variando parâmetros como concentração de solvente (hidroetanólico 60 e 80%) e temperatura de extração (30, 40, 50 e 60 °C minutos) visando maior rendimento no teor de compostos bioativos e maior atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos. O tempo de extração foi fixado em 20 minutos, pois segundo Viera (2012) em 20 minutos de extração por micro-ondas tem-se a maior extração de polifenóis totais.

Com relação às condições de extração de compostos bioativos de mirtilo utilizando micro-ondas, este estudo recomenda temperatura de extração de 60°C e uso de solvente hidroetanólico 60%, comprovando que solvente com polaridade intermediária (etanol/água) facilita a extração de compostos bioativos.

O manuscrito 2 avaliou a extração convencional de compostos bioativos do mirtilo, variando concentração de solvente (hidroetanólico 60 e 80%), temperatura de extração (30 e 40 °C) e tempo (30, 60 e 120 minutos) para a obtenção de maiores teores de compostos bioativos com elevada atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados indicaram que as melhores condições de extração dos compostos bioativos foram: concentração de solvente 60%, por 60 minutos à 40 °C.

No manuscrito 3 foi avaliado a extração de compostos bioativos do mirtilo em banho de ultrassom, variando concentração de solvente (hidroetanólico 60 e 80%), tempo (20, 60 e 120 minutos) e potência (80, 220 e 550 W) para obtenção de maiores teores de compostos bioativos e elevada atividade antioxidante.

As condições que resultaram em maior extração de compostos bioativos de mirtilo foram utilizando solvente 60%, por 20 minutos e 80 W de potência. O conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos de mirtilo obtidos por ultrassom apresentaram variação entre 54,44 – 138,38 mg GAE/g de fruto.

Deste modo, o estudo determinou as condições de extração que proporcionam maior rendimento do conteúdo de compostos bioativos do mirtilo pelos métodos de extração convencional, micro-ondas focalizadas e ultrassom, confirmando o potencial da fruta para ser utilizada como ingrediente funcional visando prevenir a oxidação lipídica.

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI; NACZK, 1995). O mirtilo apresenta os maiores teores de polifenóis (compostos fenólicos, catequinas, flavonoides e principalmente antocianinas) quando comparado a outras frutas vermelhas. As antocianinas são flavonoides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (VINSON et al., 1999).

Diante do exposto e analisando que o conteúdo de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos de mirtilo obtidos por micro-ondas verificou-se variação entre 51,15 - 113,38 mg GAE/g de fruto seco, nos extratos obtidos por extração convencional 46,35 - 90,01 mg GAE/g de fruto enquanto na extração por ultrassom a variação foi entre 54,44 - 138,38 mg

GAE/g de fruto, nota-se que as extrações assistidas por ultrassom e por micro-ondas foram as mais eficazes.

Corroborando com esse estudo Both, Chemate e Strube (2014) investigaram extrações convencional e assistida por ultrassom de polifenóis do chá preto, concluíram que a utilização de ultrassom resulta no aumento de 15% na extração de polifenóis.

Porto, Porretto e Decorti (2013) compararam a extração assistida por ultrassom com método convencional de extração de polifenóis de sementes de uvas (*Vitis vinifera L.*). Observaram que em comparação com a maceração, a extração assistida por ultrassom é mais eficaz na recuperação de polifenóis totais, além de ter como vantagem o menor consumo de solvente e menor tempo de extração.

Kerem, German-Shashoua e Yarden (2005) compararam a eficiência da extração convencional (Soxhlet) e assistida por micro-ondas na remoção de saponinas de grão de bico e verificaram que os perfis de extratos lipídicos após 20 minutos utilizando micro-ondas foram semelhantes aos observados após 3 horas de extração convencional. Outros estudos mostraram que a aplicação de micro-ondas pode aumentar a extração do conteúdo de antioxidantes e reduzir o tempo de extração de forma significativa em comparação aos métodos convencionais de extração (HAYAT et al., 2009; BALLARD et al., 2010).

A melhor eficiência da metodologia por micro-ondas focalizada na extração de compostos bioativos pode estar relacionada com a radiação eletromagnética que é aplicada diretamente na mistura solvente-amostra e convertida em calor. As moléculas migram da matriz para o solvente com facilidade devido ao aquecimento localizado (OUFNAC et al., 2007).

O método de extração "ideal" deve fornecer altas taxas de extração e economia de tempo (ROMBAUT et al., 2014). A extração assistida por ultrassom é uma técnica mais antiga e geralmente é considerada como um método de aceleração de extração com solvente, já o micro-ondas é uma tecnologia relativamente nova que tem aplicações especiais para o isolamento de componentes de plantas com baixas temperaturas ou ausência de solvente.

5 CONCLUSÃO

Em geral, com base nos resultados apresentados nos artigos pode-se concluir que:

- ✓ O método de extração assistida por micro-ondas extraiu maior teor de compostos bioativos do mirtilo utilizando a temperatura de 60°C com a menor concentração de solvente (60%), estando esses resultados correlacionados com as atividades antioxidantes *in vitro* dos extratos.
- ✓ No método de extração convencional utilizando 60 minutos com a menor concentração de solvente (60%) à 40°C foram mais eficientes na extração de compostos bioativos do mirtilo.
- ✓ Na extração por ultrassom a menor potência (80W), o menor tempo (20 min) e a menor concentração do solvente (60%) possibilitaram maior eficiência no processo extrativo.
- ✓ As extrações assistidas por micro-ondas e por ultrassom apresentaram maior extração de compostos bioativos, quando comparadas com o método convencional de extração.
- ✓ Os extratos de mirtilo não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados.
- ✓ O conteúdo de compostos bioativos do mirtilo obtidos pelos diferentes métodos de extração (convencional, micro-ondas e ultrassom) aliado às atividades antioxidantes *in vitro* dos extratos quantificadas pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS⁺ e β -caroteno sugerem um possível uso como ingrediente funcional ou como antioxidante natural em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALUPULUI, A. et al. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **U.P.B. Science Bulletin**, Series B, v. 74 n. 2, p. 129-142, 2012.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183–198, 2002.
- ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.151-158, 2002.
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. Cultivo do mirtilo (*Vaccinium spp.*). Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, p.99, 2006.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos Teoria e Prática**. Viçosa: Ed UFV, 2011.
- BALLARD, T. S. et al. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, v.120, n.4, p. 1185-1192, 2010.
- BIRCH, A. E. et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 49, p. 4502-4507, 2001.
- BOTH, S.; CHEMAT, F.; STRUBE, J. Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1030-134, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 211-247, 2011.
- BROWNMILLER, C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R.L. Processing and Storage Effects on Procyanidin Composition and Concentration of Processed Blueberry Products. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 57, n.5, p.1986-1902, 2009.
- BUXIANG, S.; FUKUHARA M. Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. **Toxicology**, v. 122, p. 61-72, 1997.
- CANTUARIAS-AVILÉS, T. Cultivo do mirtilheiro (*Vaccinium sp.*). Piracicaba: ESALQ, **Série Produtor Rural**, v. 48, p.38-45, 2010.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. et al. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.

CANUTO, G. A. B; et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CAPITANI, C. D. et al. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 1090-1099, 2009.

CASTERA-ROSSIGNOL, A.; BOSQUE, F. Nouvelle approche des antioxydants. **Oléagineux Corps gras Lipides**, v. 131, n. 1, p. 131-143, 1994.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography**, v. 879, p. 1189-1195, 2011.

CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: Process intensification studies. **Chemical Engineering and Processing**, v. 54, p. 37-41, 2012.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHIATTONE, P. V. **Ácido ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

CHIPAULT, M. S. et al. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v.17, p. 46-55, 1952.

CHO, M. J. et al. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n.13, p. 1771-1782, 2004.

CHOE, E., MIN, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 345-358, 2009.

CONDE, E. et al. Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different Spanish provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3166-3171, 1998.

COUPLAND, J. N., Mc CLEMENTS, D. J. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 83-91, 1996.

CRAVOTO, G. et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 898–902, 2008.

DAHMOUNE, F. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 166, n.13, p. 585-595, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β - caroteno / ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenolicos. **Grasas y Aceites**. Sevilla, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

FRANKEL, E. N. Recent advances in the chemistry of the rancidity of fats. In: BAILEY, A. J (Ed.). **Recent Advances in the Chemistry of Meat**. The Royal Society os Chemistry, Special Publication, n.47, p. 87-118, 1984.

GARDINI, C. H. C. Efeito da vitamina E na qualidade da carne de frango de corte. **Revista Nacional da Carne**, v. 288, p. 90-97, 2001.

GONZÁLEZ-MONTELONGO R.; LOBO M. G.; GONZÁLEZ M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1030–1039, 2010.

GOTTI, R. et al. Analysis of catechins in Theobroma cacao beans by cyclodextrinmodified micellarelektrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1112, p. 345-352, 2006.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: A review. **Journal of the American oil Chemists' Society**, v. 5, p. 539-546, 1978.

HÄKKINEN, S. H.; TÖRRÖNEN, A. R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Research International**, v. 33, n.6, p. 517-524, 2000.

HAYAT, K. et al. Optimized microwave-assisted extration of phenolic acids from citrus mandarin peels and avaluation of antioxidant activity in vitro. **Separation and Purification Technology**, v. 70, n.1, p. 63-70, 2009.

HAYOUNI, E. A. et al. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruits extracts. **Food Chemistry**, v. 105, n.3, p. 1126-1134, 2007.

HE, B. et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, n.1, p. 70-76, 2016.

HEFFELS, P.; WEBER, F.; SCHIEBER, A. Influence of Accelerated Solvent Extraction and Ultrasound-Assisted Extraction on the Anthocyanin Profile of Different Vaccinium Species in the Context of Statistical Models for Authentication. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 63, n.34, p.7532-7538, 2015.

HOAC, T. et al. Influence of heat treatment on lipid oxidation and glutathione peroxidase activity in chicken and duck meat. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, p. 88-93, 2006.

KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KAHL, R.; HILDEBRANDT, A. G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n.10, p. 1007-1014, 1986.

KEREM, Z.; GERMAN-SHASHOUA, H.; YARDEN, O. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea *Cicer arietinum* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 3, p. 406-412, 2005.

KOH, T. S.; Ultrasonic preparation off ta-free biological materials for elemental analysis. **Analytical Chemistry**. v. 55, n. 11, p. 1814-1815. 1983.

MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MATSUI, K. N. **Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (*cocos nucifera* L.) por processo térmico através do micro-ondas**. 2006. 139. f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J.; TÖRRÖNEN, R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 54, n.19, p. 7193-7199, 2006.

MELECCHI, Maria Inês Soares. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MERCADANTE, A. Z. et al. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v. 84, p. 718-726, 2010.

MORAES, J. O. et al. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.18-22, 2007.

- MULLER, D.; SCHANTZ, M.; RICHLING, E. High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus L.*), blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*), and corresponding juices. **Journal Food Science**, v. 77, n.1, 340–345, 2012.
- NAYAK, B. et al. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. **Food Chemistry**, v. 187, n.1, p 507–516, 2015.
- OUFNAC, D. S. et al. Extraction of antioxidants from wheat Bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 125-129, 2007.
- PADILHA, D. G. A.; **Antioxidante natural de erva mate na conservação de carne de frango in vivo**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing**, v. 42, p. 129–133, 2003.
- PANIWNYK, P. et al. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 299–301, 2001.
- PANTELIDIS, G. E. et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v.102, p.777-783, 2007.
- PAYNE, T. J. Formulating with Blueberries for Health. **Cereal Foods World**, v.50, n.5, p.262-264, 2005.
- PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- PEREIRA DE ABREU, D. A. et al. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmosalar L.*). **Food Research International**, v. 43, p. 1277-1282, 2010.
- PILJAC-ŽEGARAC, J.; BELŠČAK, A.; PILJAC, A. **Antioxidant Capacity and Polyphenolic Content of Blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) Leaf Infusions**. *Journal of Medicinal Food*, v. 12, n.3, p 608-614, 2009.
- POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food – Practical Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera L.*) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076-1080, 2013.

- PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG, M. T.; HO, C. T.; LEE, C. Y. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, p. 54-71, 1992.
- RICE-EVANS, C. A. et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolicflavonóides. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.
- ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.1, p.238-244, 2008.
- RODRIGUEZ-MATEOS, A. et al. Procyanidin, anthocyanin, and chlorogenic acid contents of Highbush and Lowbush blueberries. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 60, n.23, p. 5772–5778, 2012.
- ROMBAUT, N. et al. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 4, p. 530-544, 2014.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography**, v. 1012, p. 119-128, 2003.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 125**, Embrapa - Fortaleza, CE, 2006.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. **Comunicado Técnico 128**, Embrapa - Fortaleza, CE, 2007.
- SANSEVERINO, A. M. Microondas em Síntese Orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.660 - 667, 2002.
- SARGENTI, S. R.; VICHNEWSI, W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 69-73. 2000.
- SCALZO, J.; STEVENSON, D.; HEDDERLEY, D. Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 139, n.1, p. 44-50, 2013.
- SELANI, M. M. et al. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat Science**, v. 88, p. 397-403, 2011.
- SEVERO, J. et al. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante de morango e mirtilo. In: SIMPÓSIO DO MORANGO, 4.; ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. p. 103.

SHAI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: **Technomic Publishing**, p. 281-319, 1995.

SKERGET, M.; KOTNIK et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

SPAGOLLA, L.C. et al. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 59-64, 2009.

SPIGNO, G. FAVERI, D. M. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 210-217, 2009,

TAO, Y., et al. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 2, p. 706–715, 2014.

VIERA, V. B. 2012. **Obtenção do extrato de própolis assistida por micro-ondas, aplicação em linguiça toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 2012.

VINSON, J.A. et al. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 47, n.1, p. 2502-2504, 1999.

WANG, H.; HELLIWELL, K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusion by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 34, p. 223–227, 2001.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of natural products from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p. 300-312, 2006.

WANG, S. Y. et al. Fruit Quality, Antioxidant Capacity, and Flavonoid Content of Organically and Conventionally Grown Blueberries. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 56, n.14, p. 5788–5794, 2008.

WANG, X. et al. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 846–854, 2013.

WARAHO, T., Mc CLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 3-13, 2011.

WETTASINGHE M.; SHAHIDI F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 399-414, 1999.

WOLFE, K. L. et al. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418-8426, 2003.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 449-459, 2000.

WU, T. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. **Food Chemistry**, v. 133, n.1, p. 1292–1298, 2012.

ZEKOVIĆ, Z. et al. Optimization of microwave-assisted extraction (MAE) of coriander phenolic antioxidants - Response surface methodology approach. **Journal of the Science of food and Agriculture**, v. 56, n.1, p. 571-582, 2016.