

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

Débora Piovesan de Moraes

**AMORA-PRETA: CARACTERIZAÇÃO DA NOVA CULTIVAR BRS
XINGU E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM MICRO-
ONDAS DE HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE**

Santa Maria, RS

2019

Débora Piovesan de Moraes

**AMORA-PRETA: CARACTERIZAÇÃO DA NOVA CULTIVAR BRS XINGU E
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM MICRO-ONDAS DE
HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Dra. Milene Teixeira Barcia
Coorientadora: Dra. Edi Franciele Ries

Santa Maria, RS

2019

Ficha gerada com os dados fornecidos pelo autor

Moraes, Débora Piovesan de
Amora-preta: Caracterização da nova cultivar BRS Xingu e extração de compostos fenólicos com micro-ondas de hidrodifusão e gravidade / Débora Piovesan de Moraes.-2019.
115 p.; 30cm

Orientadora: Milene Teixeira Barcia
Coorientadora: Edi Franciele Ries
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Santa Maria, RS, 2019.

1. MHG 2. BRS Xingu 3. Compostos Fenólicos. Barcia, Milene Teixeira II. Moraes, Débora Piovesan de. III. Ries, Edi Franciele IV. Amora-preta: Caracterização da nova cultivar BRS Xingu e extração de compostos fenólicos com micro-ondas de hidrodifusão e gravidade



Este trabalho está licenciado pela [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

This work is licensed under the [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Débora Piovesan de Moraes

**AMORA-PRETA: CARACTERIZAÇÃO DA NOVA CULTIVAR BRS XINGU E
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM MICRO-ONDAS DE
HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 08 de março de 2019:

Milene Teixeira Barcia, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)

Paula Becker Pertuzatti Konda, Dra. (UFMT)

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a minha família, a minha irmã Caroline e ao meu pai Nilton,
mas em especial minha mãe Elisane, minha maior incentivadora.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço as minhas orientadoras prof. Dra. Milene Teixeira Barcia e prof. Dra. Edi Franciele Ries. A prof. Milene agradeço por todos os ensinamentos que me transmitiu, me aconselhando e me mostrando o caminho que eu devia seguir. A prof. Edi que me acompanhou desde a graduação, me incentivou a seguir estudando e sempre contribui para melhorar meus trabalhos. A Capes pela minha bolsa de estudos, a FAPERGS pelo apoio financeiro e a EMBRAPA Clima Temperado por doar as frutas de amora-preta utilizadas nos estudos tornando possível a realização desse trabalho.

Agradeço aos colegas, professores e técnicos do NTA (Núcleo de Tecnologia de Alimentos) e do NIDAL (Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais), que me receberam bem nesses laboratórios e com quem fiz amigos e aprendi muito. Em especial agradeço aos professores Dr. Juliano Smanioto Barin, Dra. Tatiana Emanuelli, Dr. Roger Wagner, Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. Cristiano Augusto Ballus, Dr. José Laerte Nörenberg, Dra. Leila Queiroz Zepka e Dr. Jerson Guedes que me receberam em seus laboratórios e permitiram que eu utilizasse os equipamentos e que pudesse aprender com seus alunos e aos técnicos Ms. Gustavo e Ms. Jossie que me auxiliaram sempre que precisei. Também agradeço ao professor Dr. Giovani Leone Zobot que tornou possível a realização da análise econômica e aos professores da Universidade de Granada/Espanha, Dr. Antonio Segura Carretero e Dr. Jesús Lozano-Sánchez que possibilitaram a identificação de compostos fenólicos não antociânicos.

Gostaria de agradecer as minhas colegas e amigas de laboratório. A Carla, minha colega e companheira de análises e de almoços no RU, a pessoa mais feliz que eu conheço. Obrigada amiga por não só ajudar nas minhas análises mas por fazer meus dias mais alegres. As alunas de iniciação científica Bibiana e Micheli que me ajudaram durante os dois anos de mestrado, e a Camila, obrigada pela ajuda e amizade, sentirei muita falta de vocês. A Ms. Caroline Sefrin Speroni, a prof. Carol lá da graduação, que me ajudou muito logo quando eu cheguei na UFSM, tendo paciência de me ensinar a fazer diversas análises. A Ms. Daniele e a Ms. Bruna que me acompanharam quando eu realizei as extrações no MHG e as análises de capacidade antioxidante, obrigada por compartilhar o conhecimento de vocês comigo, sou imensamente grata. A minha colega Naira, que me ajudou na realização das análises microbiológicas, e a Ms. Tatiele, que me ajudou na elaboração dos gráficos da dissertação, agradeço por dedicarem um pouco do tempo de vocês para contribuírem com o meu trabalho.

A minha “mãe” de Santa Maria a Ms. Bruna, que muito me aconselhou, me ajudou nos estudos e que me deu vários “puxões de orelha” quando necessário. Obrigada Bru.

Agradeço a Deus e a Mãe Rainha e Vencedora três vezes Admirável de Schoenstatt que guiaram meus passos durante esses dois anos de mestrado. A toda a minha família, aos meus pais Elisane e Nilton e a minha irmã Caroline, que são meu porto seguro e que sempre me incentivaram e me deram todo o apoio necessário para que eu conseguisse completar essa etapa, apesar da distância e dos dias que não pude passar com vocês. A minha vó Oliva que sempre reza por mim para que eu sempre tenha uma “luzinha na mente” e consiga cumprir todos os meus objetivos. Amo vocês infinitamente.

Não poderia deixar de agradecer as meninas da Casa de Retiros, Luana, Érika, Eduarda, Isadora, Rafaela, Carol e Letícia que foram minha família quando eu me mudei pra Santa Maria. Obrigada pelos bons momentos que passamos juntas, pelos mates com pipoca que nos acompanhavam na sala de estudos e pelo apoio que sempre me deram. Agradeço aos meus presentes de Santa Maria, a Luana e ao Mateus. Lu, obrigada por ser minha amiga-irmã, por todos os momentos felizes e tristes que já passamos, juntas, uma apoiando a outra. Eu te amo amiga. Ao meu namorado Mateus que sempre esteve ao meu lado, me cuidando e me ajudando, eu te amo muito. Agradeço a todos que de uma forma ou outra colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

AMORA-PRETA: CARACTERIZAÇÃO DA NOVA CULTIVAR BRS XINGU E EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COM MICRO-ONDAS DE HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE

AUTORA: Débora Piovesan de Moraes

ORIENTADORA: Professora Dra. Milene Teixeira Barcia

A amora-preta apresenta um elevado valor nutritivo, além de ser fonte de compostos fenólicos que trazem benefícios a saúde. Esses compostos variam entre diferentes cultivares da mesma espécie e normalmente são extraídos com solventes orgânicos que são nocivos a saúde e a natureza. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição de uma nova cultivar de amora-preta, a BRS Xingu, e verificar se o micro-ondas de hidrodifusão e gravidade (MHG) proporciona a remoção de um extrato de amora-preta com elevada concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Para isso, determinou-se a composição centesimal, cor, acidez titulável, pH, sólidos solúveis, identificação e quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante da nova cultivar de amora-preta e de outras três cultivares já conhecidas em duas safras, 2016 e 2017. Foram obtidos extratos da amora-preta Tupy por solvente orgânico e através do MHG, e avaliamos o rendimento, tempo, teor de fenólicos e capacidade antioxidante, assim como foram identificados os compostos fenólicos presentes no extrato do MHG. Foi avaliada a qualidade microbiológica do extrato e do coproduto do MHG e também foi realizada a análise econômica do processo. A cultivar BRS Xingu obteve destaque com relação ao teor de antocianinas e taninos condensados, que foi superior as demais analisadas. Os compostos fenólicos foram eficientemente removidos através do processo por MHG. O extrato do MHG apresentou redução de uma casa decimal do teor de mesófilos aeróbios totais comparado com a fruta *in natura* e foi confirmada a ausência de coliformes totais e termotolerantes e salmonella. Também apresentou maior conteúdo fenólico e capacidade antioxidante comparado a extração exaustiva, assim como baixo custo de fabricação e maior rapidez. Além disso, o coproduto obtido no processo apresentou elevadas concentrações de fenólicos e a ausência de mesófilos totais, salmonella, coliformes totais e termotolerantes. Este trabalho colaborou para o conhecimento da composição de amoras-pretas, principalmente a nova cultivar BRS Xingu, e explorou um método rápido, econômico e ecológico para a extração de compostos que apresentam potencial bioativo.

Palavras-chave: MHG. BRS Xingu. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

BLACKBERRY: CHARACTERIZATION OF THE NEW CULTIVAR BRS XINGU AND EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS WITH MICROWAVE HYDRODIFFUSION AND GRAVITY

AUTHOR: Débora Piovesan de Moraes

ADVISOR: Milene Teixeira Barcia

The blackberry has a high nutritional value, besides being a source of phenolic compounds that brings health benefits. These compounds vary between different cultivars of the same species and are usually extracted with organic solvents that are harmful to health and nature. The objective of this work was to characterize the composition of a new blackberry cultivar, BRS Xingu, and to verify if the microwave hydrodiffusion and gravity (MHG) provides the removal of a blackberry extract with high concentration of phenolic compounds and antioxidant capacity. Thus, the centesimal composition, color, titratable acidity, pH, soluble solids, identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of the new cultivar of blackberry and the other three known cultivars in two harvests, 2016 and 2017, were determined. We obtained extracts of the Tupy blackberry by organic solvent and through the MHG, and we evaluated the yield, time, phenolic content and antioxidant capacity, as well as the phenolic compounds present in the MHG extract were identified. The microbiological quality of the MHG extract and co-product was evaluated and the economic analysis of the process was also performed. The cultivar BRS Xingu was highlighted in relation to the content of anthocyanins and condensed tannins, which was higher than the others analyzed. The phenolic compounds were efficiently removed by the by MHG procedure. The MHG extract showed a reduction one decimal place of the total aerobic mesophylls content compared to *in natura* fruit and it was confirmed the absence of total and thermotolerant coliforms and salmonella. There are also higher phenolic content and antioxidant capacity compared to exhaustive extraction, as well as low manufacturing cost and higher speed. In addition, the co-product obtained in the process had high phenolic concentrations and the absence of total mesophiles, of salmonella, of total and thermotolerant coliforms. This work contributed to the knowledge of blackberry composition, especially the new cultivar BRS Xingu, and explored a fast, economical and ecological method for the extraction of compounds that present bioactive potential.

Keywords: MHG. BRS Xingu. Phenolics compounds.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Planta e frutas de amoreira-preta	17
Figura 2- Frutas de amora-preta das cultivares BRS Xingu, Guarani, Xavante e Tupy.....	19
Figura 3- Estrutura química do fenol	20
Figura 4- Estrutura química dos flavonoides	21
Figura 5- Estrutura química da cianidina glicosilada na posição 3.....	21
Figura 6- Estrutura química dos taninos condensados.....	22
Figura 7- Estrutura química dos ácidos fenólicos.....	23
Figura 8- Símbolo da química verde e os seis princípios da extração verde.....	25
Figura 9- Efeito do micro-ondas na extração dos compostos fenólicos	28
Figura 10 - Extração dos compostos fenólicos da amora-preta obtidos por MHG	29

MANUSCRITO 1

Figura 1. Análise de componentes principais de amoras-pretas das safras de 2016 e 2017....	54
Figura Suplementar 1. Frutas de amora-preta das cultivares BRS Xingu, Guarani, Xavante e Tupy.....	62

MANUSCRITO 2

Figura 1. Antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, tempo de extração e rendimento dos extratos obtidos das diferentes potências otimizadas.....	88
Figura 2. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante removidos das amoras-pretas pela extração exaustiva e por MHG (A) e compostos fenólicos e capacidade antioxidante de extratos de amora-preta obtidos pela extração exaustiva e por MHG (B).. .	89
Figura 3. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frações obtidas por MHG.....	90
Figura 4. Custo de fabricação e percentual de contribuição dos custos detalhados.....	91
Figura Suplementar 1. Fluxograma das extrações exaustiva e por MHG.....	100
Figura Suplementar 2. Diferentes frações de extratos de amora-preta obtidos por MHG...	100
Ilustração do processo de MHG	101

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Trabalhos originais publicados com micro-ondas de hidrodifusão e gravidade.....26

MANUSCRITO 1

Tabela 1. Composição centesimal, pH, sólidos solúveis e acidez titulável de amoras-pretas. 55

Tabela 2. Parâmetros de cor das cultivares de amoras-pretas.....567

Tabela 3. Tempo de retenção e espectros de massas para tentativa de identificação de compostos fenólicos antociânicos em amoras-pretas.578

Tabela 4. Tempo de retenção, espectros de massas e fórmula molecular para tentativa de identificação de compostos fenólicos não antociânicos em amoras-pretas.....589

Tabela 5. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante das amoras-pretas nos anos de 2016 e 2017.....61

MANUSCRITO 2

Tabela 1. Tempo de retenção e espectros de massas para a tentativa de identificação de compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos nos extratos de amora-preta obtidos por MHG.922

Tabela Suplementar 1. Custos de base para equipamentos do MHG e extração exaustiva.. .94

Tabela Suplementar 2. Dados econômicos de entrada usados para simular o custo de fabricação de extratos de amora-preta obtidos por MHG e extração exaustiva em escalas de laboratório e piloto.....95

Tabela Suplementar 3. Tempo de extração, rendimento, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos de amora-preta extraídos por diferentes potências96

Tabela Suplementar 4. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante removidos das amoras-pretas pela extração exaustiva e por MHG e compostos fenólicos e capacidade antioxidante de extratos de amora-preta obtidos pela extração exaustiva e por MHG.....97

Tabela Suplementar 5. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frações de extratos de amora-preta obtidos por MHG98

Tabela Suplementar 6. Parâmetros de cor das frações de extratos de amora-preta obtidos por MHG.....99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 AMORA-PRETA.....	17
3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMORAS-PRETAS.....	19
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMORAS-PRETAS.....	20
3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	23
3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E QUÍMICA VERDE.....	24
3.6 EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS DE HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE.....	25
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	30
MANUSCRITO 1.....	30
MANUSCRITO 2.....	63
5 DISCUSSÃO GERAL	102
6 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

Frutas com propriedades funcionais cada vez mais têm sido alvo de pesquisas por cientistas. A inclusão de frutas como a amora-preta na alimentação vem crescendo (PAGOT, 2017) devido aos benefícios que seu consumo traz à saúde humana, sendo obtidos através da ingestão da fruta *in natura* ou de alimentos processados que contenham amoras-pretas em sua composição como em sucos, geleias, iogurtes e sorvetes (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011). A amora-preta é encontrada em vários continentes do mundo, que possuem o clima temperado, estimando-se que contenha em torno de vinte mil hectares onde estas frutas são cultivadas (ZUCOLOTO et al., 2015).

A amora-preta apresenta um elevado valor nutritivo, sendo rica em fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de ser fonte de compostos bioativos como os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas (LIMA, 2014). Apesar da presença destes fitoquímicos na fruta, variações no conteúdo total dos compostos fenólicos são frequentes entre diferentes cultivares da mesma espécie (JACQUES et al., 2010), tornando imprescindível a caracterização química de cultivares individuais para comprovação de suas propriedades funcionais e potenciais benefícios à saúde. A extração de compostos fenólicos é realizada tradicionalmente por meio de solventes orgânicos, que podem ser nocivos a saúde, além de gerarem grandes quantidades de resíduos que posteriormente causam danos ambientais (GARCIA-SALAS et al., 2010). Devido as desvantagens desses métodos tem-se buscado outros meios sustentáveis para realizar a extração de compostos fenólicos (GARCIA-SALAS et al., 2010). Uma alternativa é a extração através da técnica de micro-ondas por hidrodifusão e gravidade (MHG), um método sustentável que realiza a extração de compostos fenólicos sem a adição de solventes (BITTAR et al., 2013).

Além de ser uma técnica sustentável, o MHG apresenta outras vantagens como a alta velocidade de extração, o baixo consumo de energia e os baixos níveis de contaminantes presentes no extrato, ocasionados provavelmente pelo contato limitado com o exterior da fruta e o tempo reduzido de exposição a altas temperaturas (BITTAR et al., 2013). O processo também garante que o extrato apresente elevado grau de pureza e assim maior segurança (EKEZIE et al., 2017), permite que sejam coletadas frações das amostras em diferentes períodos da extração, tornando possível identificar a localização e as propriedades físico-químicas de cada constituinte presente. Através desse processo, consegue-se uma eficiente

extração de compostos fenólicos em flores (LÓPEZ-HORTAS et al., 2016) e obtenção de um extrato com a cor e o sabor natural de frutas como uva, ameixa, tomate, cereja e damasco (CENDRES et al., 2014).

Neste sentido, uma caracterização da composição de frutas de amora-preta, em especial a nova cultivar BRS Xingu permitirá demonstrar os compostos presentes nas diferentes cultivares e verificar o potencial da nova cultivar.

Em virtude dos fatos mencionados supõe-se que o MHG seja um método eficiente para a extração de compostos fenólicos sem a adição de solventes, sendo rápido, econômico e sustentável, se comparado com outros métodos de extração. É possível que pelo fato de a matriz não permanecer por muito tempo em contato com o calor do equipamento, sejam preservados na fruta seus compostos fenólicos, assim como seus nutrientes, sendo possível que o extrato e o resíduo (coproduto) apresentem atividade biológica e que haja o aproveitamento total da fruta.

Através da caracterização das cultivares de amora-preta buscamos apresentar mais uma opção de amora-preta para o consumo *in natura* e para o processamento. E com a otimização do processo de extração procurou-se comprovar que o MHG apresenta potencial para ser um método de extração de compostos fenólicos eficiente e livre de solventes para a amora-preta, assim como mostrou-se eficiente para a extração de compostos fenólicos em outros vegetais.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo foi caracterizar a composição de uma nova cultivar de amora-preta, a BRS Xingu, e verificar se o micro-ondas de hidrodifusão e gravidade (MHG) proporciona a remoção de um extrato de amora-preta com elevada concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Apresentar a caracterização centesimal, físico-química e fenólica de uma nova cultivar de amora-preta, a BRS Xingu;

Investigar se a BRS Xingu apresenta superioridade em sua composição físico-química, fenólica e capacidade antioxidante frente a outras três cultivares que são comercializadas no sul do Brasil, a Tupy, Guarani e Xavante;

Avaliar se o uso de diferentes potências de micro-ondas aumenta a concentração de fenólicos, capacidade antioxidante e rendimento dos extratos de amora-preta, assim como se reduz o tempo de extração;

Verificar se o MHG apresenta eficiência positiva de extração de compostos fenólicos ao compará-lo com a extração exaustiva com solvente orgânico;

Verificar se o teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante reduzem com o número de frações extraídas no processo;

Apresentar a caracterização fenólica e capacidade antioxidante do extrato de amora-preta obtido por MHG, assim como a de diferentes frações coletadas do MHG e do coproduto do processo;

Identificar os compostos fenólicos presentes no extrato do MHG;

Verificar se o extrato e o coproduto do processo apresentam redução do teor mesófilos totais em comparação a fruta *in natura*;

Verificar se o extrato e o coproduto do processo apresentam qualidade microbiológica quanto a ausência de coliformes totais e termotolerantes e de salmonella sp, atendendo a legislação vigente;

Investigar se o custo do processo por MHG é menor quando comparado à extração com solvente orgânico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AMORA-PRETA

A amora-preta (*Rubus* spp.) é uma pequena fruta oriunda da amoreira-preta, uma planta arbustiva pertencente ao gênero *Rubus* (Figura 1), que apresenta o período de colheita entre o final do mês de outubro até início de fevereiro, variando de acordo com a cultivar (SANTOS et al., 2004). Essa cultura é caracterizada por apresentar rápido retorno econômico aos produtores, pois a primeira colheita das frutas ocorre logo no segundo ano de cultivo (ANTUNES et al., 2014). Além disso, o cultivo da amora-preta é incentivado devido as vantagens que apresenta como facilidade de manejo, sem a necessidade de aplicação demasiada de defensivos agrícolas e o baixo custo para a sua implementação, sendo bem aceito pelos produtores (ANTUNES, 2002). Essa fruta também apresenta elevado potencial de comercialização e industrialização, onde o seu suco concentrado e clarificado é utilizado como matéria-prima para a fabricação de produtos como geleias, caldas de sorvetes, xaropes, refrescos e sucos mistos (HIRSCH et al., 2012).

Figura 1 – Planta e frutas de amoreira-preta



Fonte: Autores.

O cultivo da amora-preta encontra condições favoráveis em praticamente toda a região Sul do Brasil, onde as temperaturas são mais baixas (INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, 2015), por isso o Rio Grande do Sul é o principal estado produtor de amora-preta

com estimativa de 2.209,5 toneladas em 239,2 hectares, seguido pelo estado de São Paulo (213,5 hectares), Minas Gerais (40 hectares), Paraná (22,1 hectares), Santa Catarina (10 hectares) e Espírito Santo (3,0 hectares) (ANTUNES et al, 2014).

A amora-preta vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa desde 2010, onde encontramos que a cultivar Tupy apresenta maior teor de tocoferóis quando comparado ao conteúdo de outras frutas, como pitanga, butiá, mirtilo, nêspera, jambolão, araçá roxo, physalis, pêra e pêsego (BARCIA et al., 2010). Em estudo para avaliar a estabilidade de seus principais fitoquímicos durante o período de armazenamento, pesquisadores do grupo determinaram que em diferentes temperaturas de armazenamento (-10, -18 e -80 °C) o conteúdo dos compostos fenólicos totais permaneceu inalterado na polpa de amora-preta da cultivar Tupy durante seis meses de armazenamento (JACQUES et al., 2010).

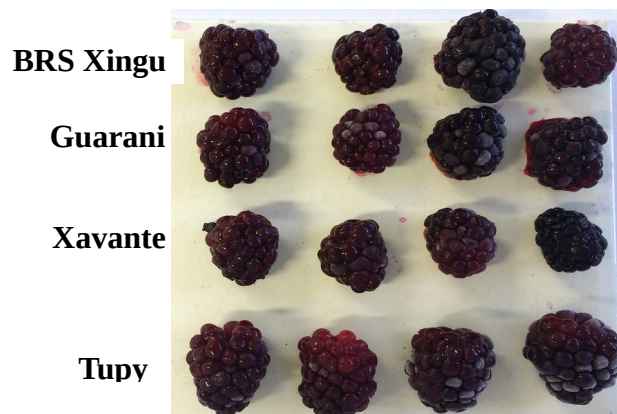
Elevados níveis de compostos fenólicos são encontrados em frutas de amora conferindo alta capacidade antioxidante e retardando ou impedindo a oxidação de moléculas (KAUME et al., 2012). A presença desses compostos pode estar associada à diminuição do risco de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e vários tipos de inflamação (KAUME et al., 2012). Jaques e Zambiasi (2011) reportam que o conteúdo total de compostos fenólicos difere em função da cultivar analisada, assim como o grau de maturação também pode influenciar na composição química de cultivares de amora, incrementando significativamente teores de açúcares totais, compostos fenólicos, incluindo antocianinas e ácido cinâmico, bem como a capacidade antioxidante de frutos no estágio ótimo de maturação comparados àqueles sub-maduros (MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2017).

A cultivar BRS Xingu (Figura 2), foi lançada pela Embrapa Clima Temperado no ano de 2015, a partir do cruzamento realizado em 2003 entre as cultivares Tupy e Arapaho (americana) (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2015). As amoras da cultivar BRS Xingu são frutas de tamanho médio a grande, preto-avermelhadas e sabor doce-ácido, apresentando a mesma faixa de adaptação que a cultivar Tupy (Figura 2), cerca de 200 a 300 horas de adaptação com temperaturas inferiores a 7,2 °C (EMBRAPA, 2015).

Essa cultivar foi desenvolvida com o intuito de prolongar o tempo de maturação e assim consequentemente o teor de açúcares aumentando também a produtividade, quando comparada a cultivar Tupy (EMBRAPA, 2015), que atualmente é a mais cultivada no mundo

(SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2017). Como vantagem a amora BRS Xingu se destacou pela produtividade, chegando a render cerca de 800 gramas a mais por planta, que equivale em torno de 3.264 toneladas/ha, comparando com a cultivar Tupy (SNA, 2017). A BRS Xingu apresenta colheita antecipada (quinze dias antes), comparada com outras cultivares e o período de colheita é estendido por mais quinze dias após o fim da colheita para a cultivar Tupy, trazendo vantagens econômicas para os fruticultores, proporcionando maior oferta da amora-preta em um período onde essa fruta não é facilmente ofertada (SANTOS, 2018).

Figura 2- Frutas de amora-preta das cultivares BRS Xingu, Guarani, Xavante e Tupy



Fonte: Autores.

3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMORAS-PRETAS

Conhecer a composição dos alimentos é algo importante para esta área, pois permite a caracterização de alimentos ainda novos e desconhecidos bem como saber se este apresenta características adequadas para o processamento ou estocagem (CECCHI, 2003).

As frutas são caracterizadas principalmente por apresentarem em sua composição nutrientes reguladores como minerais e fibras alimentares, por isso o seu consumo é considerado saudável (ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE NUTRIÇÃO, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015) recomenda o consumo diário de 400 g de frutas, pois são pobres em açúcar e gordura, proporcionando melhoras a saúde e previne o risco de doenças não transmissíveis (APN, 2017).

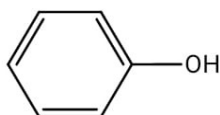
As amoras-pretas apresentam em sua composição elevadas concentrações de água (84 a 92,43%) que estão relacionadas a sua baixa conservação pós-colheita (CHIM, 2008; HIRSH

et al., 2012; SOUZA et al., 2014). O macronutriente majoritário nas amoras são os carboidratos, em torno de 7,10 a 10,27%, sendo que dentro desses encontram-se as fibras alimentares, em torno de 5,5 a 6%, componente este que fornece benefícios a saúde humana quando consumidas com frequência, pois são reconhecidos por auxiliarem na manutenção da saúde intestinal (LATULIPPE et al., 2013). Em menor proporção encontramos as proteínas (0,09 de 1,29%), lipídios (0,14 a 0,58%) e as cinzas (0,27 a 2,17%) (CHIM, 2008; LAMEIRO, 2012, HIRSH et al., 2012; LIMA, 2014). Mesmo apresentando-se em pequena quantidade as cinzas ou minerais desempenham uma função vital no desenvolvimento e boa saúde do corpo humano (GONDIM et al., 2005).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMORAS-PRETAS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas que apresentam um grupo fenol com um ou mais substituintes hidroxílicos (Figura 3), gerando uma diversidade desses compostos, dos quais já foram identificados mais de dez mil (TAIZ; ZEIGER, 2006). Existem dois grupos principais de fenólicos dentre os quais estão os flavonoides e os não flavonoides (BARCIA et al., 2015). Dentre os flavonoides encontramos as antocianinas, flavanóis e flavonóis, e entre os não flavonoides estão os ácidos fenólicos, como os ácidos benzoico e cinâmico e seus derivados, taninos e cumarinas (ANGELO; JORGE, 2007), sendo que ainda não foram identificados e relatados na literatura componentes do último grupo na amora-preta (LEE et al., 2012).

Figura 3- Estrutura química do fenol

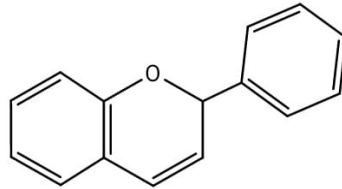


Fonte: Taiz e Zeiger (2006)

Os flavonoides (Figura 4) são antioxidantes polifenólicos de baixo peso molecular (15 átomos de carbono), constituídos por dois anéis aromáticos, que se unem a um anel heterocíclico, e o que diferencia cada classe de flavonoides é a substituição dos ligantes do anel central, e as substituições nos anéis das extremidades geram diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (ANGELO; JORGE, 2007). Na amora-preta encontramos

flavanóis como a epicatequina e a catequina e flavonóis como a quercetina e o kaempferol (LEE et al., 2012) que apresentam destaque por possuírem capacidade antioxidante elevada comparada com outros flavonoides (FERREIRA, et al., 2015).

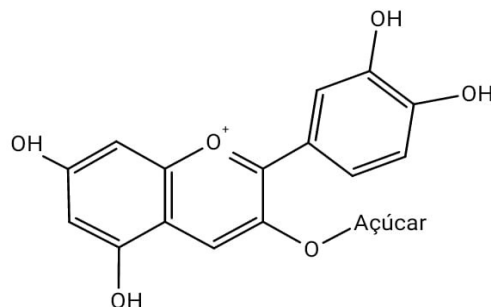
Figura 4- Estrutura química dos flavonoides



Fonte: Angelo e Jorge (2007)

As antocianinas são pigmentos naturais responsáveis pelas cores vermelha, roxa, rosa e azul da maioria dos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2006) e são consideradas algumas das substâncias mais importantes da classe dos flavonoides, onde se enquadram como pigmentos bioativos (SUI et al., 2019). Esses pigmentos apresentam em sua estrutura dois anéis de benzoíla e um anel heterocíclico com ligações de diversos açúcares (Figura 5) (SUI et al., 2019).

Figura 5 - Estrutura química da cianidina glicosilada na posição 3



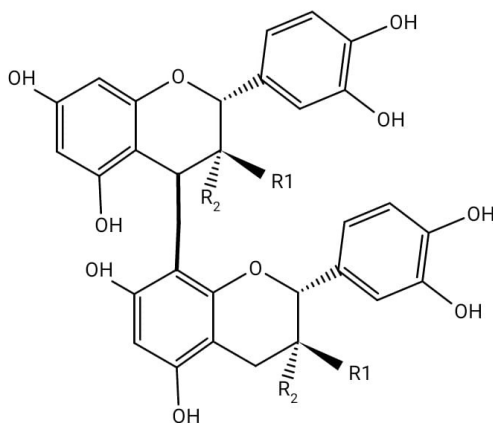
Fonte: Adaptado de Angelo e Jorge (2007)

Na amora-preta encontramos antocianinas em elevadas concentrações, sendo predominante a cianidina-3-glicosídeo (Figura-5), além de que já foi relatada a presença de mais oito cianidinas com diferentes ligantes, e outras antocianinas como a malvidina-3-arabinosídeo e perlagonidina-3-glicosídeo (LEE et al., 2012). Estudos recentes consideram a amora-preta como um alimento funcional devido aos seus polifenóis, sobretudo representado pelas antocianinas, que apresentam elevada atividade antioxidante e antidiabética (GOWD et

al., 2018). Sabe-se que para as antocianinas exercerem uma atividade biológica a ingestão diária recomendada é de 200 mg por dia (VALAVANIDIS e VLACHOGIANNI, 2013), então o consumo de amoras-pretas e os produtos dela derivados podem trazer os benefícios oriundos desse fitoquímico.

Os taninos condensados (Figura 6) são polímeros compostos pela condensação de duas ou mais unidades de flavanóis como catequina, epicatequina e seus galatos e são responsáveis pela adstringência dos alimentos (SARNECKIS et al., 2006). Eles estão presentes nos vegetais, principalmente em frutas vermelhas, e algumas bebidas como em vinhos (SERRANO et al., 2009). Na amora-preta já foram identificados e quantificados teores de taninos condensados, também denominados de procianidinas e notou-se a diferença no teor desses compostos em diferentes cultivares (VAN DE VELDE et al., 2016).

Figura 6- Estrutura química dos taninos condensados



(-)-Epicatequina R 1 = OH

R 2 = H

(+)-Catequina R 1 = H

R 2 = OH

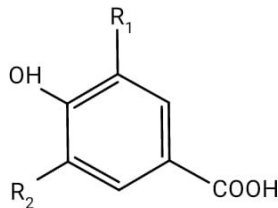
Fonte: Adaptado de Serrano (2009)

A ingestão de alimentos que contenham os taninos condensados está ligada a suas ações medicinais que implicam na prevenção de doenças, pois foi evidenciado que esses apresentam interações com sistemas biológicos, mostrando propriedades antivirais (TAKECHI et al., 1985), antibacterianas (CHUNG et al., 1993), inibidoras de enzimas (GYAMFI; ANIYA, 2002), antioxidantes, eliminadoras de radicais (SINGAL et al., 1998) e antimutagênicas (YU; SWAMINATHAN, 1987).

Outros compostos antioxidantes identificados em amoras-pretas são os ácidos fenólicos como derivados o ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido elágico, ácido

ferúlico e seus derivados, porém encontrados em quantidades menos expressivas do que as antocianinas, flavanóis e flavonóis (LEE et al., 2012). São caracterizados por possuírem um anel benzênico, uma carboxila ou grupamentos de hidroxila e metoxila, sendo divididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzoico (Figura 7a) e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 7b) (ANGELO; JORGE, 2007). O que diferencia esses grupos é a presença do ligante carboxila nos derivados ácidos hidroxibenzoicos e da metoxila nos ácidos hidroxicinâmicos e os radicais (R1 e R2) diferenciam os compostos dentro de cada classe (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 7- Estrutura química dos ácidos fenólicos



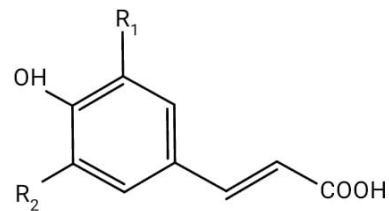
(a) Ácido hidroxibenzoico

Ácido p-hidroxibenzoico: R1= R2 = H

Ácido protocatecuico : R1= OH, R2 = H

Ácido vanílico: R1= OCH₃, R2 = H

Ácido siríngico : R1= R2 = OCH₃



(b) Ácidos hidroxicinâmicos

Ácido p-cumárico: R1= R2 = H

Ácido cafeico: R1=OH, R2 = H

Ácido ferúlico R1=OCH₃, R2 = H

Fonte: Angelo e Jorge (2007)

3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são intensamente estudados pelo fato de que estes compostos, que anteriormente eram apenas considerados como conservantes de alimentos, também impedem o estresse oxidativo, prevenindo uma série de doenças (CÖMERT; GÖKMEN, 2018), atuando como sequestradores de radicais livres ativos, formando compostos estáveis, protegendo moléculas biologicamente essenciais (NIKI, 2010).

Uma gama de substâncias que são consideradas antioxidante foram identificadas em fontes naturais (CÖMERT; GÖKMEN, 2018), portanto dietas que são compostas por alimentos que contêm antioxidantes produzem estímulos químicos que protegem o coração e os vasos sanguíneos contra danos oxidativos, prevenindo doenças cardiovasculares (HARASYM; OLEDZKI, 2014).

Uma forma analítica de mensurar a capacidade antioxidante de alimentos é através da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) a qual se expõem uma amostra do alimento a ação do 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), que gera a atividade de radicais livres (radical peroxila), e utiliza a fluoresceína como molécula alvo e o trolox (que se equivale a vitamina E, porém é solúvel em água) como padrão. O produto não fluorescente da fluoresceína é monitorado, medindo o quanto a amostra protegeu as moléculas vulneráveis (fluoresceína) da oxidação dos radicais livres (ALAM et al., 2012). Quanto maiores são os valores de ORAC, maior a capacidade antioxidante do alimento, mostrando que a amostra em questão protegeu a molécula alvo contra os danos de radicais livres (ALAM et al., 2012).

3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E QUÍMICA VERDE

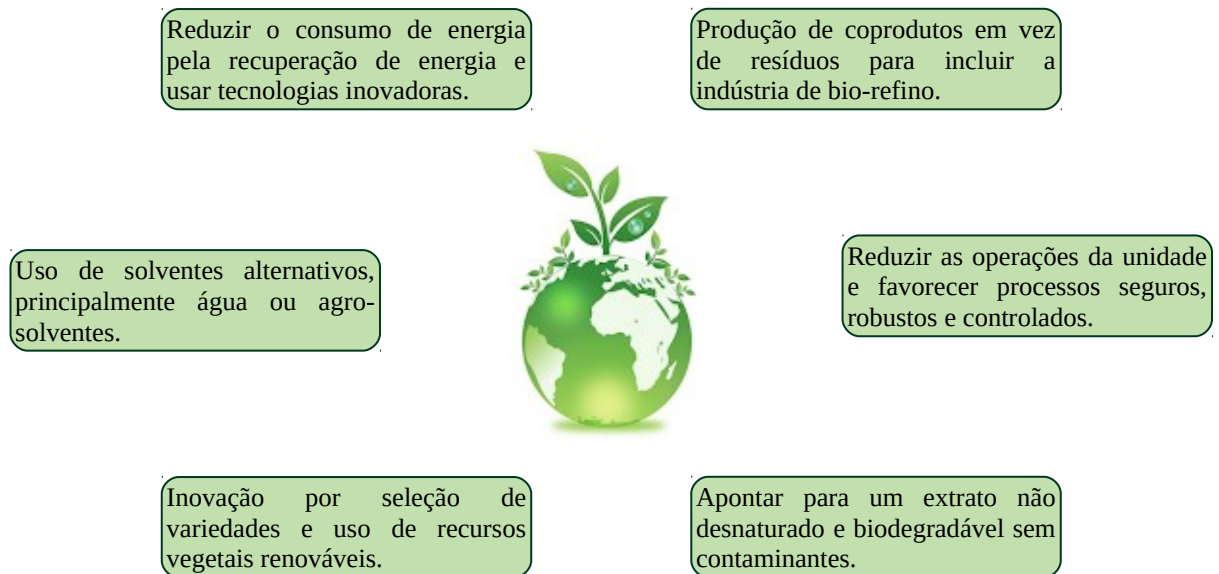
O processo de extração de compostos fenólicos para fins analíticos e para indústrias alimentícias e farmacêuticas ganhou importância pela interação destes compostos com a saúde, já que diversos componentes são retirados de produtos de origem vegetal e destinados ao consumo humano. Tradicionalmente, procedimentos de separação de componentes dos alimentos necessitam de preparo antes da extração, exigindo maior tempo para a obtenção do extrato, que pode levar de minutos até várias horas (ZILL-E-HUMA et al., 2009). A extração tradicional de compostos fenólicos utiliza solventes orgânicos como a acetona, metanol (ROCCHETTI et al., 2018) e acetato de etila (CELEP et al., 2019), que podem ser nocivos a saúde, além de gerarem grandes quantidades de resíduos que posteriormente causam danos ambientais.

Nos últimos anos, novas tecnologias verdes foram desenvolvidas a fim de otimizar o processo de extração de compostos fenólicos em frutas e torná-lo mais ecológico. Com isso foram desenvolvidos outros métodos de extração que empregam o uso de solventes naturais (CHANIOTI; TZIA, 2018) ou água (ERŞAN et al., 2018), extração de fluido supercrítico (VALADEZ-CARMONA et al., 2018), extração assistida por enzimas (MEINI et al., 2019), extração por micro-ondas (KAZEMI et al., 2019) e ultrassom (KADERIDES et al., 2019).

De acordo com Chemat et al., (2012) existem seis princípios nos quais o método de extração deve estar enquadrado para que seja considerado uma extração verde, que são métodos de extração que enquadram-se na química verde (Figura 8). O primeiro princípio se

refere à escolha da matéria-prima, onde devem ser empregadas variedades de recursos de plantas renováveis. O segundo princípio busca o uso de solventes alternativos, que não ofereçam impactos ambientais, e o terceiro diz respeito ao menor consumo de energia. A possibilidade de se utilizar o resíduo da extração visa a utilização de coprodutos ao invés de descartar o restante como resíduo (quarto princípio). Também busca-se que o processo seja seguro, robusto e controlado (como descrito no princípio cinco) e que o extrato seja biodegradável e livre de contaminantes, obedecendo ao sexto princípio.

Figura 8- Símbolo da química verde e os seis princípios da extração verde



Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Química

3.6 EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS DE HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE

Dentre as novas tecnologias verdes para a extração de compostos fenólicos encontra-se o micro-ondas por hidrodifusão e gravidade (MHG). Esse processo foi desenvolvido por Vian et al. (2008) com o intuito de extrair óleos essenciais de plantas aromáticas de modo rápido, seguro e barato. Porém já se mostrou como um método eficiente e de baixo custo para a extração de sucos de frutas (ameixa, damasco, uva e morango) (BITTAR et al., 2013; CENDRES et al., 2012; CENDRES et al., 2014; TURK et al., 2017), aromas, pigmentos (antocianinas e carotenoides) e compostos fenólicos (CENDRES et al., 2014).

Na tabela 1 estão apresentados os artigos de pesquisa originais publicados até o momento que utilizaram o MHG. Os dados foram extraídos da base de dados Science Direct no dia 21 de janeiro de 2019 utilizando como *Key word* a palavra *microwave hydrodiffusion and gravity*. Foram encontrados o total de 76 trabalhos publicados entre os anos de 2008 e 2019, dentre os quais 42 são pesquisas originais, 16 são artigos de revisão e 18 são capítulos de livros. Dentre eles observa-se que o MHG é amplamente empregado para a extração de óleos essenciais e que poucos trabalhos (5) são encontrados em relação a extração de compostos fenólicos em frutas.

Tabela 1- Trabalhos originais publicados com micro-ondas de hidrodifusão e gravidade

Ano	Autores	Área de aplicação	Matriz
2008	(VIAN et al., 2008)	Óleos essenciais	Hortelã e poejo
	(BOUSBIA et al., 2009)	Óleos essenciais	Casca de laranja
	(BOUSBIA et al., 2009)	Óleos essenciais	Alecrim
2009	(ZILL-E-HUMA et al., 2009)	Flavonoides	Cebola
	(FARHAT et al., 2009)	Óleos essenciais	Lavanda
	(FARHAT et al., 2010)	Óleos essenciais	Especiarias secas
2010	(OKOH et al., 2010)	Óleos essenciais	Rosmarino
	(BESOMBES et al., 2010)	Óleos essenciais	Lavanda
	(ZILL-E-HUMA et al., 2011; ZILL-E-HUMA et al., 2011)	Flavonoides	Cebola
2011	(CENDRES et al., 2011)	Suco	Ameixa, damasco, uva
	(MICHEL et al., 2011)	Compostos antioxidantes	Espinheiro do mar
	(SERESHTI et al., 2011)	Óleos essenciais	Oliva
	(CENDRES et al., 2012)	Suco	Ameixa
2012	(ASSAMI et al., 2012)	Óleos essenciais	Sementes
	(PÉRINO-ISSARTIER et al., 2013)	Óleos essenciais	Lavanda
2013	(BITTAR et al., 2013)	Suco com polifenóis	Uva
	(PÉREZ et al., 2014)	Compostos fenólicos	Alga
2014	(BINELLO et al., 2014)	Óleos essenciais	<i>Lamiaceae</i>

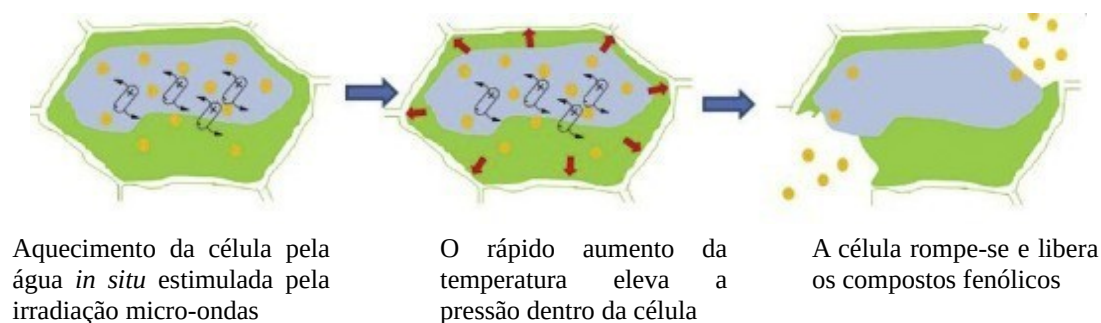
Ano	Autores	Área de aplicação	Matriz
2014	(CENDRES et al., 2014)	Suco com compostos fenólicos	Ameixa tomate, cereja e damasco
	(SONG et al., 2014)	Pesticidas	Arroz
2015	(BOUKROUFA et al., 2015)	Óleos essenciais, polifenóis e pectina	Casca de laranja
	(MEMARZADEH et al., 2015)	Óleos essenciais	Sálvia bakhtiari
	(PARADA et al., 2015)	Compostos fenólicos	Cogumelo
	(RIBEIRO-SANTOS et al., 2015)	Óleos essenciais	Alecrim
2016	(PÉRINO et al., 2016)	Compostos fenólicos	Alface
	(LÓPEZ-HORTAS et al., 2016)	Compostos fenólicos	Flores
	(BENMOUSSA et al., 2015)	Óleos essenciais	Sementes
	(GONZÁLEZ-RIVERA et al., 2016)	Óleos essenciais	Lavanda, alecrim, sálvia, sementes de funcho e cravo
	(SIXT et al., 2016)	Extrato	Teixo europeu
2017	(TURK et al., 2017)	Suco	Morango
2018	(BENMOUSSA et al., 2018)	Óleos essenciais	Cominho da Tunísia
	(LÓPEZ-HORTAS et al., 2018)	Método de secagem	Alga marrom
	(FERREIRA et al., 2018)	Método de secagem	Brócolis
	(ANGOY et al., 2018)	Polifenóis	Alface
	(CRISTÓBAL et al., 2018)	Análise econômica	Batata, tomate, frutas cítricas e azeitonas
	(GIACOMETTI et al., 2018)	Bioativos e óleos essenciais	Ervas
	(BADRI et al., 2018)	Óleos essenciais	Sementes

Ano	Autores	Área de aplicação	Matriz
2018	(TÜMEN et al., 2018)	Polifenóis	Pinheiro-bravo
2019	(RODRÍGUEZ-SEOANE et al., 2019)	Açúcares e polifenóis	Cogumelo
	(RAZZAGHI et al., 2019)	Óleos essenciais	Casca de laranja
	(LÓPEZ-HORTAS, et al., 2019)	Polifenóis	Alga

Fonte: Autores.

A extração dos compostos fenólicos com o MHG, por ser realizada em meio polar pela presença da água, se dá pelo aquecimento, que primeiramente é responsabilidade da rotação dipolar e, a medida que a temperatura aumenta, ele é dominado pela condução iônica (VINATORU et al., 2017). No primeiro momento (rotação dipolar), as moléculas dipolares tentam alinhar-se com o campo elétrico alternado produzido pelas micro-ondas e colidem entre as moléculas vizinhas produzindo calor (VINATORU et al., 2017). Na condução iônica ocorre uma colisão entre a água e os íons que estão em movimento pela influência do micro-ondas e isso causa aquecimento (VINATORU et al., 2017). Então o aquecimento da água *in situ* da fruta destrói as células vegetais onde estão os compostos fenólicos, transferindo esses compostos para o exterior da fruta, sendo esse o fenômeno físico chamado de hidrodifusão (Figura 9) (VINATORU et al., 2017).

Figura 9 – Efeito do micro-ondas na extração dos compostos fenólicos

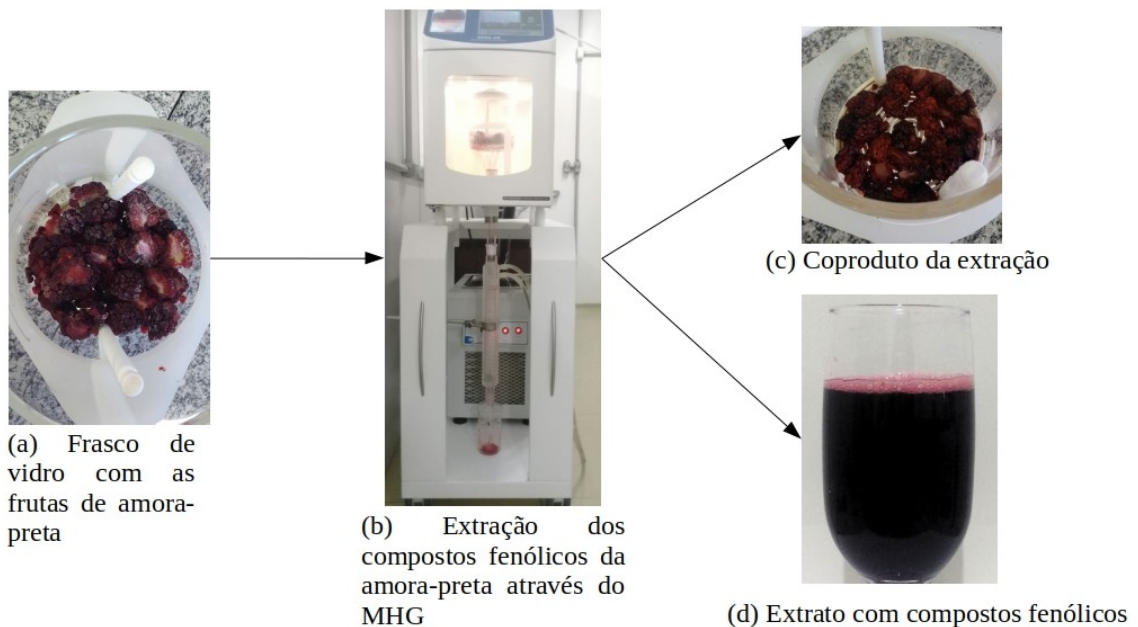


Fonte: Vinatoru et al. (2017).

O equipamento (MHG) consiste em um micro-ondas (Figura 10b), similar ao comercial, porém invertido, onde a extração se dá pela combinação entre o aquecimento por micro-ondas e a gravidade da Terra a pressão atmosférica (ZILL-E-HUMA et al., 2009), que faz com que os compostos descendam do reator para o condensador e sejam coletados na parte inferior do equipamento. Para isso os vegetais dos quais se objetiva retirar o extrato são depositados no recipiente do equipamento (Figura 10a), sem que seja necessária a adição de água e de nenhum outro tipo de solvente, portanto não serão gerados resíduos orgânicos que necessitam de tratamento adequado para o seu descarte (ZILL-E-HUMA et al., 2009).

De acordo com Turk et al. (2017), que obtiveram o suco de morango através desse equipamento, o ciclo do MHG pode ser dividido entre a fase de latência e a fase da extração. A primeira fase é caracterizada pelo período onde a energia eletromagnética é convertida em energia térmica, sem que haja a extração do líquido da fruta. Nesta fase é observado um pequeno aumento da temperatura do ambiente, e encerra-se quando as primeiras gotas do extrato começam a sair. Na segunda fase a transformação da energia eletromagnética em energia térmica continua, a célula da fruta é distendida e rompe-se, eliminando a água nela contida, e inicia a migração do líquido de dentro da célula para a superfície da fruta por difusão molecular. A maior parte do líquido cai devido a gravidade da terra e é coletado. Ao final do processo a fruta encontra-se encolhida e deformada, já que a remoção do seu conteúdo líquido é considerável (Figura 10c).

Figura 10 - Extração dos compostos fenólicos da amora-preta obtidos por MHG



Fonte: Autores.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

MANUSCRITO 1

CARACTERIZAÇÃO DA NOVA CULTIVAR DE AMORA-PRETA BRS XINGU

Este trabalho está em fase de revisão para ser submetido à revista Food Chemistry

Caracterização da nova cultivar de amora-preta BRS Xingu

Débora P. Moraes^a, Micheli Lazzaretti^a, Edi F. Ries^b, Francisco Javier Leyva-Jimenez^c, Jesús Lozano-Sánchez^{cd}, Márcia Vizzotto^e, Milene T. Barcia^{a*}

^a*Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^b*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^c*Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Alimentos Funcionais, Parque Tecnológico da Ciência da Saúde, Avenida del Conocimiento s / n, E-18100 Granada, Espanha*

^d*Departamento de Nutrição e Ciência dos Alimentos, Universidade de Granada, Campus de Cartuja, 18071 Granada, Espanha*

^e*Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil*

*Autor para quem a correspondência deve ser endereçada (e-mail: milene.barcia@ufsm.br; telefone: (55) 98100-0636)

Resumo: A cultivar BRS Xingu foi lançada pela EMBRAPA no ano de 2015 com o intuito de apresentar elevada produtividade. Devido a inexistência de estudos sobre esta cultivar, objetivou-se apresentar a composição físico-química, centesimal e fenólica da amora-preta BRS Xingu e sua capacidade antioxidante, assim como comparar com outras cultivares comercializadas, Guarani, Tupy e Xavante. A cultivar BRS Xingu obteve destaque com relação ao teor de antocianinas e taninos condensados, que foi superior as demais cultivares. A BRS Xingu apresentou maior capacidade antioxidante e teor de sólidos solúveis que a Tupy, a variedade mais cultivada no mundo. Na nova cultivar foram identificadas cinco antocianinas, sendo elas cianidinas ligadas a diferentes açúcares, cinco ácidos fenólicos e dez flavonoides não antociânicos. Assim, a BRS Xingu mostra-se como uma nova opção de amora-preta disponível com potencial para a industrialização e o consumo *in natura*.

Palavra-chave: BRS Xingu; composição centesimal; compostos fenólicos; antocianinas; taninos condensados, capacidade antioxidante; identificação de compostos fenólicos

1. Introdução

O consumo diário de 400 gramas de frutas frescas trazem uma série de benefícios a saúde (OMS, 2015), como a redução da chance de infarto, isquemia e hemorragia cerebral, assim como diminui a pressão arterial e a glicemia (Du et al., 2016). A amora-preta apresenta-se como uma boa opção de fruta para o consumo *in natura* ou para o processamento, sendo uma fruta de pequeno porte (Roleira et al., 2015). Também é caracterizada por ser cultura apropriada para pequenos produtores familiares, pois seu cultivo encontra condições favoráveis em praticamente toda a região Sul do Brasil, onde as temperaturas são mais baixas (Antunes, 2002). A amora-preta apresenta um elevado valor nutritivo, sendo rica em fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de ser fonte de compostos bioativos como os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas (Hirsch, Facco, Rodrigues, Vizzotto, & Emanuelli, 2012).

Pesquisas relatam que o conteúdo total de compostos fenólicos (Hirsch, Facco, Rodrigues, Vizzotto, & Emanuelli, 2012; Jacques, Pertuzatti, Barcia, Zambiasi, & Chim, 2010), cinzas e sólidos solúveis (Hirsch, Facco, Rodrigues, Vizzotto, & Emanuelli, 2012) da amora-preta variam de acordo com a cultivar, tornando imprescindível a caracterização química de cultivares individuais.

Durante 11 anos a Embrapa Clima Temperado esteve trabalhando no desenvolvimento da amora BRS Xingu, que foi lançada no ano de 2015, através do cruzamento entre a cultivar Tupy e a cultivar americana Arapaho (EMBRAPA, 2015). As amoras da cultivar BRS Xingu são frutas de tamanho médio a grande, preto-avermelhadas e sabor doce-ácido (EMBRAPA, 2015). Essa cultivar foi desenvolvida com o intuito de prolongar o tempo de maturação e assim consequentemente aumentar o teor de açúcares e maior produtividade, quando

comparada a cultivar Tupy (EMBRAPA, 2015), que é a mais cultivada no mundo (SNA, 2017).

Comparada a cultivar Tupy a amora-preta BRS Xingu se destacou pela produtividade, chegando a render cerca de 800 gramas a mais por planta, que resulta em um rendimento de 3.264 toneladas/ha a mais que a cultivar Tupy, e pelo seu período de colheita, (final de novembro até o início de janeiro) que é estendido por mais quinze dias após o fim da colheita para a cultivar Tupy, trazendo vantagens econômicas para os fruticultores, proporcionando maior oferta da amora-preta em um período onde essa fruta não é facilmente ofertada (SNA, 2017).

Considerando as vantagens agronômicas e de rendimento dessa nova cultivar, percebemos a necessidade de sua caracterização individual. Vale salientar que inexitem na literatura nacional e internacional estudos sobre a caracterização das frutas de amora-preta da cultivar BRS Xingu. Portanto este trabalho objetivou apresentar a composição centesimal, físico-química e de compostos fenólicos da fruta BRS Xingu, bem como sua capacidade antioxidante, assim como de outras três cultivares, Guarani, Tupy, e Xavante produzidas no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil) para efeito de comparação.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras

No estudo foram avaliadas frutas de amora-preta (*Rubus spp*) das cultivares BRS Xingu, Tupy, Guarani e Xavante obtidas nos anos de 2016 e 2017, na Embrapa Clima Temperado, localizada na cidade de Pelotas (Latitude: -31.776, Longitude: -52.3594 31° 46' 34" Sul, 52° 21' 34" Oeste), Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras colhidas foram selecionadas quanto à ausência de injúrias físicas. As frutas avaliadas (n=10) apresentavam em média 5,88; 5,58;

4,95; 3,53 gramas, 2,91; 2,34; 2,21; 2,07 cm de comprimento e 2,18; 1,87; 1,89; 1,75 cm de largura para as cultivares Tupy, Guarani, Xavante e BRS Xingu respectivamente (coeficiente de variação <13%, com precisão do paquímetro de 0,05 mm). Na avaliação de sólidos solúveis, pH, acidez titulável e cor utilizou-se a polpa triturada *in natura*. Para as análises de composição centesimal, com exceção da análise de umidade, as amostras foram secas em estufa a 55 °C até peso constante e os resultados foram expressos em % de fruta *in natura* (g / 100g). As amoras utilizadas para a obtenção do extrato de compostos fenólicos foram congeladas, liofilizadas e trituradas. Após a secagem e moagem, todas as amostras foram submetidas ao congelamento a -18°C até o momento das análises.

2. 2. Avaliação físico-química das frutas

A análise instrumental da cor das frutas foi realizada em colorímetro (Minolta CR-300) utilizando a escala Cielab. As determinações físico-químicas de pH, acidez, sólidos solúveis, foram realizadas de acordo com as metodologias descritas na AOAC (2016).

2.3. Composição centesimal

Os teores de umidade, cinzas, proteínas, carboidratos e fibra alimentar foram mensuradas pelos métodos descritos na AOAC (2016). A umidade das amoras-pretas foi determinada pela secagem em estufa a vácuo a 70 °C, até peso constante. A determinação de cinzas foi realizada por incineração da amostra em mufla a 550 °C. O nitrogênio total foi determinado pelo método de micro Kjeldahl, e o teor de proteína bruta, foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25.

A determinação dos teores de fibra alimentar total e fibra alimentar insolúvel foi realizada de acordo com o método enzimático-gravimétrico, utilizando-se as enzimas α -amilase, protease e amiloglicosidase, responsáveis por realizar a hidrólise enzimática do amido e das proteínas. A

fibra solúvel foi obtida através da diferença entre fibra alimentar total e fibra alimentar insolúvel (AOAC, 2016). A fração lipídica foi determinada através da extração a frio, seguindo as orientações descritas por Bligh & Dyer (1959).

A determinação de carboidratos foi realizada por diferença, sendo subtraído de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas (AOAC,2016).

2.4. *Obtenção do extrato para análise de compostos fenólicos*

Os extratos das frutas de amora-preta foram obtidos com uma solução aquosa composta de 20% de acetona e 0,35% de ácido fórmico conforme descrito por Bochi et al. (2014).

2.5. *Quantificação dos compostos fenólicos por espectrometria*

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico que emprega Folin-Ciocalteau (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1998). O teor de compostos fenólicos totais foram expressos em mg de ácido gálico (GAE) em cem gramas de fruta *in natura* (mg de GAE 100/g).

O teor de antocianinas monoméricas totais foi mensurado pela metodologia do pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Os resultados foram expressos em miligramas de cianidina-3-glicosídeo por cem gramas de fruta *in natura* (mg de cianidina-3-glicosídeo/100g).

A quantificação de taninos condensados totais foi mensurada pela diferença da absorbância dos compostos fenólicos totais solúveis em água e em sulfato de amônio menos os precipitados por metil celulose. A quantificação foi realizada com curva de calibração de epicatequina com leituras realizadas no espectrofotômetro e os resultados foram expressos em mg de epicatequina por cem gramas de fruta *in natura* (mg de epicatequina/100g) (Sarneckis et al., 2006).

2.6. Separação e identificação das antocianinas por HPLC-ESI-MSⁿ

As antocianinas foram separadas em um equipamento HPLC-ESI-MSⁿ (Agilent Technologies) com a coluna ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HT (2,1x100mm, 1,8-Micron) 600 Bar (Agilent) com a um fluxo de de 0,25 mL/min, a temperatura ambiente. As fases móveis utilizadas foram compostas de água, ácido fórmico, acetonitrila (88,5:8,5:3, v / v / v) (fase móvel A), e água, ácido fórmico, acetonitrila (41,5:8,5:50, v / v / v) (fase móvel B), e gradiente linear para o Solvente B de 0 min, 6%; 10 min, 30%; 20 min, 50%; 25 min, 6% (Barcia et al., 2014). Para a identificação das antocianinas utilizou-se o espectrômetro de massa por ionização por *electrospray* (ESI-MS) (Agilent Technologies, USA) com os seguintes parâmetros: temperatura do gás 300 °C, fluxo de gás seco de 5 L/min, nebulizador á 45 psi, voltagem do capilar de 3500 V e do fragmentador 5V e modo positivo (Barcia et al., 2014). Foram extraídos espectros de massas, que juntamente com o auxílio de dados da literatura, proporcionaram a tentativa de identificação das antocianinas da amora-preta.

2.7. Separação e identificação dos compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-TOF-MS

Soluções estoque de extratos de amora-preta na concentração de 5000 mg/L para cada cultivar foram preparadas dissolvendo-se a quantidade apropriada do extrato em metanol. A plataforma analítica aplicada para identificar os fenólicos em diferentes extratos de amora foi composta por uma série RRLC 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), um instrumento equipado com quatro blocos: um desgaseificador a vácuo, um auto amostrador, uma bomba binária e um detector espectrômetro de massa de tempo de voo TOF (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). O detector de MS foi acoplado a um sistema de HPLC com uma interface de *electrospray* ortogonal (ESI) (modelo G1607 da Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) operando no modo íon negativo.

A separação dos compostos fenólicos foi realizada em uma coluna C18 Zorbax Eclipse Plus de 150 mm x 4,6 mm id, 1,8 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) através do uso de uma fase móvel binária. Portanto, a fase móvel A foi preparada com 0,1% de ácido fórmico em água, enquanto a B foi metanol. A separação analítica foi realizada injetando 10 μL de cada extrato de amora-preta de acordo com o seguinte gradiente linear: 0 min (5% B); 42min (95% B), 45min (5% B), onde as condições iniciais foram mantidas por 5 minutos após cada análise, levando um total de 50 minutos por análise. A taxa de fluxo foi de 0,4 mL/min. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente (Jiménez-Sánchez et al., 2015).

Os parâmetros da fonte ESI foram otimizados e implementados da seguinte forma: voltagem capilar de + 4kV; temperatura do gás de secagem, 210 ° C; fluxo de gás de secagem, 9 L min⁻¹; e pressão de gás de nebulização, 2,3 bar. Os valores dos parâmetros de transferência foram: saída capilar, -120 V; skimmer 1, -40 V; hexapole 1, -23 V; Hexapolo de RF, 80 V; e skimmer 2, -22,5 V. A detecção foi realizada aplicando uma faixa de massa de 50-1500 m / z.

Além disso, para fornecer uma boa calibração, o espectrômetro de massa TOF foi calibrado externamente usando uma bomba de seringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, IL, EUA) que estava diretamente conectada à interface. A calibração do espectrômetro de massa externo foi realizada usando aglomerado de formiato de sódio (hidróxido de sódio 5 mol/L em água / iso-propanol 1/1 (v / v) com 0,1% de ácido fórmico) no modo de regressão quadrática de calibração de alta precisão (HPC) (Leyva-Jiménez, Lozano-Sánchez, Borrás-Linares, Arráez-Román, & Segura-Carretero, 2018). Os dados de massa dos íons moleculares adquiridos foram gerenciados pelo software de análise DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics), que utiliza um algoritmo CHNO que aumenta a confiança nas fórmulas moleculares sugeridas.

2.8. Separação e quantificação dos compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD

Para a quantificação dos compostos fenólicos não antociânicos injetou-se 20 µL da amostra purificada, como descrito por Giusti & Wrolstad (2001), no equipamento HPLC-DAD (Shimadzu). Empregamos a coluna de fase reversa Hypersil Gold C-18 (5 µm de partícula, 150mm, 2,1mm) com a temperatura do forno de 38 °C e duas fases móveis, compostas por 5% metanol, 0,1% de ácido fórmico e água milli-Q (Fase móvel A) e por acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel B) com fluxo de 1,0 mL/min. O gradiente linear para a fase móvel B foi de 0 min, 0%; 21 min, 4%; 55 min, 16%; 70 min, 50%; 72 min, 100%; 83 min, 0% até o fim da corrida aos 92 minutos (Quatrin et al., 2019). Para a quantificação das diferentes classes de fenólicos foram utilizadas curvas de calibração de epicatequina com concentração de 10,75 a 107,50 mg/L (280 nm, flavanóis), ácido clorogênico (320 nm, ácidos hidroxicinâmicos) de 2,38 a 2,28 mg/L e quercetina-3-glicosídeo (360 nm, flavanóis) na faixa de 12,33 a 123,33 mg/L. Todas as curvas de calibração externa possuem pontos equidistantes e apresentaram R² superior a 0,99.

2.9. Separação e quantificação das antocianinas por HPLC-UV-Vis

A separação das antocianinas foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-Shimadzu). A coluna utilizada foi a Zorbax 2,1 mm x 150 mm 3,5 µm de tamanho de partícula Elipse XDB, com fluxo de 0,5 mL/min e temperatura do forno de 38 °C. As duas fases móveis são compostas por água acidificada com 3% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O gradiente linear foi de 0 min 8%; 25 min, 32%; 27 min, 90% e 39 min, 8% de B, e a corrida ocorreu no total de 50 minutos. A quantificação foi realizada com curva de calibração com padrão de cianidina-3-glicosídeo com leituras no comprimento de onda de 520 nm.

O método foi avaliado através dos parâmetros de validação descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2015). Foram avaliados parâmetros de linearidade ($R^2= 0,9998$), faixa de trabalho (0,2 mg/L a 45,2 mg/L de cianidina-3-glicosídeo), precisão interdias (Coeficiente de variação (CV%) de 0,09 a 8,43%) e intradias (CV% de 0,83 a 1,60%), limite de detecção (0,18 mg/L) e limite de quantificação (0,56 mg/L).

2.10. Capacidade de Absorção de Radical Oxigênio/ORAC

Para mensurar a capacidade antioxidante das frutas utilizamos metodologia de capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC) (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001), onde estima-se a capacidade sequestradora de um antioxidante pela formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C. Mede-se por espectrometria o comprimento de onda de excitação (485 nm) e o comprimento de onda de emissão (528 nm) do produto não fluorescente da fluoresceína, marcadora de fluorescência, que reagiu com o radical peroxila (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). Os resultados foram expressos em mmol de trolox por 100 gramas de fruta *in natura*.

2.11 Análise Estatística

Todas as análises, assim como as extrações foram realizadas em triplicata (n=3). A análise estatística foi feita através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey (entre cultivares) e Duncan (entre anos) para avaliar diferenças entre os grupos e correlação de Pearson. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. Também empregou-se a análise de componentes principais (PCA) utilizado para avaliar a contribuição dos compostos estudados durante dois anos de cultivo em quatro cultivares de frutas de amora-preta.

3. Resultados e Discussões

3.1. Características físico-químicas das frutas de amora-preta

Os macronutrientes presentes em maior quantidade nas amoras-pretas são os carboidratos (**Tabela 1.**), onde observamos que as cultivares do ano de 2016 apresentaram maior concentração. Em relação a 2017 a BRS Xingu apresentou o maior teor, diferindo estatisticamente de todas as outras cultivares. Esses dados correlacionam-se com o teor de sólidos solúveis, indicando que a cultivar BRS Xingu apresentou o maior teor de açúcares solúveis dissolvidos comparada a Tupy em ambos os anos. O maior conteúdo de carboidratos no primeiro ano deve-se ao menor teor de umidade das frutas nesse ano, ocasionado provavelmente pelas condições climáticas, pois no ano de 2016 a pluviosidade (1200 a 1400 mm) anual foi menor que em 2017 (1400 a 1600 mm) (INMET, 2018). Sendo assim observamos que as plantas de 2016 receberam maior período de insolação que as de 2017, o que provavelmente aumentou a quantidade de carboidratos devido a maior taxa de fotossíntese. As frutas de plantas que recebem maior insolação contêm maior teor de açúcares, pelo fato de que estas realizam fotossíntese em mais dias do ano e conseguem transportar suas reservas de açúcar para as frutas (Taiz & Zeiger, 2006). As amoras-pretas são compostas principalmente de água (85 a 90%), apresentado elevados valores de umidade em ambos os anos. Elevadas concentrações de água nas frutas de amora-preta estão relacionadas a sua baixa conservação pós-colheita (Chim, 2008).

A cultivar BRS Xingu apresentou teores comparáveis das frações de fibra alimentar com a cultivar Tupy em 2017, sendo ainda as frações total e solúvel superiores na nova cultivar no ano de 2016, mostrando que a BRS Xingu também apresenta-se rica em fibras alimentares como as demais cultivares de amora-preta (Souza et al., 2014). As fibras dietéticas fornecem

benefícios à saúde humana quando consumidas com frequência, pois elevados teores de fibras são reconhecidos por auxiliarem na manutenção da saúde intestinal (Latulippe et al., 2013).

As amoras avaliadas apresentaram baixo conteúdo de proteínas (1 a 1,50%) e lipídios (0,35 a 1%), comportamento característico de pequenas frutas (berries), pois estas geralmente não apresentam conteúdo lipídico e proteico elevados (Souza et al., 2014). O teor de cinzas (0,22 a 0,50%) se relaciona com a quantidade de minerais, que são micronutrientes necessários para desempenhar funções vitais no desenvolvimento e na boa saúde do corpo humano (Gondim, Moura, Dantas, Medeiros, & Santos, 2005). No entanto, observamos que a BRS Xingu apresentou elevada concentração de cinzas (0,32%) comparada com as outras cultivares no ano de 2016 e que houve um acréscimo de 0,10% no seu teor no ano de 2017.

A nova cultivar mostrou-se ideal para a fabricação de geleia, pois apresentou pH entre 3,0 e 3,4, que facilita a formação de gel, não sendo necessária a adição de acidulantes para a formulação desse produto (Torrezan, 1998). Pela acidez titulável foi observado que a BRS Xingu não diferenciou-se da cultivar Guarani em ambos os anos sendo que em 2017 também assemelhou-se a cultivar Tupy, e apresentou diferença intracultivar entre os anos de 2016 e 2017. Os resultados encontrados podem estar relacionados às mudanças de produção de ácidos orgânicos, como os ácidos málico, lactoisocítrico, isocítrico, cítrico, ascórbico, fosfórico, fumárico, shiquímico e quínico (Kaume, Howard, & Devareddy, 2012), que diferem de acordo com a cultivar (Kafkas, Koşar, Türemiş, & Başer, 2006), e por outras influências externas como o tempo de colheita, estágio de amadurecimento, clima, condições do solo, exposição ao sol, localização da fruta na planta e manipulação pós-colheita (Acosta-Montoya et al., 2010). A relação entre os sólidos solúveis e a acidez é utilizada como parâmetro que indica a palatabilidade das frutas, relacionada ao seu sabor, sendo esse um

atributo de importância para o consumo de frutas *in natura* (Chim, 2008). A BRS Xingu apresentou essa razão ($^{\circ}$ Brix/Acidez) de 11,83 no ano de 2016 e 8,21 em 2017, mostrando que a nova cultivar possui equilíbrio correlacionando esses parâmetros, pois quanto maior for essa relação (> 5) melhor será o sabor da fruta (Brugnara, 2016).

3.2. Análise de cor

Todas as amoras-pretas apresentaram cor vermelha escura, coloração típica de amoras-pretas maduras, sendo essa coloração possivelmente decorrente do elevado teor de antocianinas, compostos responsáveis pela coloração vermelha e roxa de muitas frutas (Chim, 2008), no entanto, a presença destes compostos nas frutas não apresentou correlação positiva com as análises de coloração avaliadas. Os valores de L^* , que se relacionam com o eixo da luminosidade, foram baixos, tendendo ao preto, o que indica que as amoras-pretas apresentam tonalidades escuras (**Tabela 2. e Fig. S1.**).

Os valores positivos de a^* mostram que as amoras-pretas apresentam tendência ao vermelho, e os valores positivos de b^* mostram que essas frutas apresentam maior tendência ao amarelo. A cor é um importante parâmetro para produtores e consumidores, pois indica se a fruta apresenta as condições ideais para comercialização e consumo (Hirsch, Facco, Rodrigues, Vizzotto, & Emanuelli, 2012), portanto BRS Xingu apresenta coloração esperada para amoras-pretas por assemelhar-se com outras cultivares já existentes no mercado, indicando que a mesma provavelmente será visualmente aceita pelos consumidores.

As amoras-pretas colhidas em 2017 apresentaram maior tendência ao vermelho que as da safra de 2016. Esses resultados podem estar correlacionados ao pH e a acidez das frutas, pois notamos que as frutas colhidas em 2017 possuem maior porcentagem de ácidos orgânicos e pH mais baixo que as de 2016. Pela correlação de Pearson constatamos que os valores de a^*

estão correlacionados com o pH ($p = -0,5$) e com a acidez ($p = 0,67$), que é explicada pela tendência de mudança a cor das antocianinas com a variação da acidez do meio onde estão, que resultam em alterações estruturais e conseqüentemente na cor (Yoshida, Mori, & Kondo, 2009). Quanto mais próximo do pH 4,0 maior a predominância da forma quinoidal das antocianinas, que possuiu maior tendência de estarem com cores voltadas ao azul, o que também explica os menores valores de b^* nas amoras de 2016, ou seja, elas apresentam menor tendência ao amarelo do que as cultivares de 2017 (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009).

3.4. Compostos fenólicos antociânicos e não antociânicos identificados nas frutas de amoras-pretas

Na amora-preta encontramos predominantemente compostos da classe dos flavonoides dentre os quais já foram identificados e quantificados antocianinas, como a cianidina-3-glicosídeo, flavanóis como a epicatequina e a catequina e flavonóis como a quercetina e o kaempferol (Lee et al., 2012). O perfil antociânico da BRS Xingu é semelhante ao perfil das amoras-pretas das cultivares Tupy e Guarani sendo composto por cinco antocianinas, sendo elas a cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-xilosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-malonilglicosídeo e cianidina-3-dioxalil-glicosídeo, sendo que essa última não foi identificada na cultivar Xavante (**Tabela 3.**). Outras antocianinas como a cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-sofrosídeo, cianidina-3-glicosilrutinosídeo, malvidina-3-arabinosídeo, malvidina-3-galactosídeo, e perlagonidina-3-glicosídeo foram identificadas em amoras-pretas em outros trabalhos (Lee, Dossett, & Finn, 2012) porém não foram identificadas nas quatro cultivares estudadas.

Os onze compostos fenólicos não antociânicos que foram identificados na nova cultivar (**Tabela 4.**), também estão presentes nas outras três cultivares. Como mencionado anteriormente,

a classe de fenólicos mais abundante foi a dos flavonoides, sendo que na BRS Xingu encontrou-se flavonóis como derivados de quercetina, além de dois flavanóis (epicatequina e catequina hexuronídeo) e o Kaempferol hexoside isômero 1, sendo esse último identificado em todas as cultivares. Encontramos cinco ácidos fenólicos, entre eles três isômeros de ácido clorogênico, no qual foram identificados em todas as amoras-pretas analisadas, o ácido vanílico glicosilado, que foi encontrado em todas as amoras exceto na Guarani, e o ácido elágico pentosídeo que também está presente na Xavante. Identificamos compostos como apigenina pentosídeo, purascenina e isoramnetina hexuronídeo na amora-preta da cultivar Xavante, sendo que até o momento não foram relatados na literatura esses compostos na amora-preta.

3.5. Quantificação de compostos fenólicos e capacidade antioxidante

A amora-preta BRS Xingu se destacou entre as cultivares em relação às antocianinas e taninos condensados apresentando teores superiores ($p \leq 0,05$) as demais cultivares nos dois anos (**Tabela 5**). As antocianinas são os compostos fenólicos majoritários das amoras-pretas, e o maior teor desses compostos na BRS Xingu mostra que a nova cultivar é uma fruta em potencial pois estudos recentes vem demonstrando que as antocianinas apresentam propriedades antidiabéticas (Gowd, Bao, & Chen, 2018), além de suas conhecidas propriedades antioxidantes (Sui, Zhang, Jiang, & Zhou, 2018). Além disso, a BRS Xingu possui em média 27 mg de taninos condensados e esses compostos podem exercer atividades antioxidantes (Takechi, Tanaka, Takehara, Nonaka, & Nishioka, 1985), antivirais (Chung, Wei, & Johnson, 1998) e reduzir os fatores de riscos de doenças cardiovasculares (Singal, Khaper, Palace, & Kumar, 1998) e diabetes mellitus (Gyamfi & Aniya, 2002). O teor de antocianinas (Carbone et al., 2009) e taninos condensados (Plahar, Annan, & Nti, 1997) é

influenciado pela genética da planta, sendo comum haver variações de acordo com a cultivar, condições ambientais e época do ano em que são cultivadas (Da Cruz et al., 2017).

Os resultados de capacidade antioxidante mostram que a amora BRS Xingu (2,50 mmol/100g em 2016 e 4,62 mmol/100g em 2017) apresentou mesma capacidade antioxidante da Guarani (2,54 mmol/100g em 2016 e 4,85 mmol /100g em 2017), sendo superior que a da Tupy (1,46 vezes em 2016 e 1,94 vezes em 2017) e inferior a da Xavante (1,19 vezes em 2016 e 1,34 vezes em 2017) em ambos os anos. A menor capacidade antioxidante da Tupy e a maior da Xavante podem ser explicadas pela sua composição fenólica. Na cultivar Tupy não foram identificados três derivados da quercetina e um derivado da catequina, enquanto na Xavante encontramos maior número de compostos derivados do Kaempferol e da quercetina, que apresentam elevada capacidade antioxidante (Ferreira, Turon, Regina, & Couto, 2015). Também notamos que a capacidade antioxidante foi maior no ano de 2017 para todas as cultivares e que isso ocorreu devido ao aumento do teor de flavanóis, como a epicatequina e catequina, os quais apresentam efeito sinérgico com os flavonóis, como a quercetina-3-glicosídeo provocando um aumento da capacidade antioxidante (Hidalgo, Sánchez-Moreno, & de Pascual-Teresa, 2010). O teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frutas é influenciado por vários fatores, como a maturação (Mikulic-Petkovsek, Koron, Zorenc, & Veberic, 2017), condições ambientais, e climáticas que podem explicar a diferença de quantidade desses compostos entre diferentes anos (Acosta-Montoya et al., 2010).

3.6. Análise de componentes principais

Pela análise de componentes principais (PCA) vemos que a PC1 foi responsável por explicar 38,33% da variância total dos dados, enquanto PC2 apresentou 27,22% e PC3 14,03%, sendo que os três componentes principais explicam 79,58% das variâncias dos resultados (**Fig. 1.**)

Os dois primeiros componentes principais são responsáveis por 65,55% da variância total dos resultados enquanto PC1 e PC3 juntos explicam 52,36%. Na PC1 e PC2 a BRS Xingu 2016 difere-se das demais por apresentar menor teor de fibras insolúveis, onde a encontramos no quadrante superior direito. Quando avaliamos PC1 com PC3 a variável fibra insolúvel está demonstrada no quadrante superior, assim como as cultivares Xavante e Guarani (ano 2016 e 2017), diferentemente da BRS Xingu e da Tupy que estão no quadrante inferior, em ambos os anos. A separação da cultivar Tupy 2016, demonstrada no PC1 e PC3 pode ser explicada pelo teor de fibra total, que é inferior para essa cultivar.

Também vemos que a BRS Xingu do ano de 2017 na PC1 e PC2 a se assemelha as cultivares Xavante e Guarani pelo teor similar de flavonóis, porém em PC1 e PC3 ela aparece separada dessas cultivares por apresentar maior teor de taninos condensados e antocianinas. Já a cultivar Tupy 2017 se encontra no quadrante inferior esquerdo pela sua maior tendência ao vermelho (a*). Em PC1 e PC3 as cultivares de 2016 e 2017 são separadas pela diferença entre o teor de cinzas, umidade, carboidratos, lipídios, acidez titulável e a tendência ao amarelo (b*). Vemos que a BRS Xingu se assemelhou a cultivar Tupy em ambos os anos estudados. No ano de 2016 apresentou comportamento similar a Tupy principalmente pelo seu teor proteínas enquanto em 2017 foi devido ao parâmetro de cor L*. Ao realizarmos a PCA constatamos a relação entre as diferentes cultivares de amora-preta estudadas em dois anos. Notamos que elas tenderam a se assemelhar entre os mesmo ano de cultivo e as mesmas cultivares, ou seja, a cultivar BRS Xingu se assemelhou a cultivar Tupy no ano de 2016 e 2017 enquanto a cultivar Xavante se assemelhou a Guarani em ambos os anos.

4. Conclusão

Este trabalho apresenta uma nova cultivar de amora-preta que se destaca pelo maior teor de antocianinas e taninos condensados. Assim, comprovamos que além da alta produtividade relatada para a nova cultivar, a BRS Xingu apresenta características superiores a outras cultivares comerciais como à cultivar Tupy como o maior teor de sólidos solúveis, flavanóis e capacidade antioxidante. Assim mostrando-se como uma nova opção de amora-preta disponível com potencial para a industrialização e o consumo *in natura*, bem como para obtenção dos benefícios associados ao consumo dos compostos fenólicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela concessão de bolsa as três primeiras autoras. A Embrapa Clima Temperado pelo fornecimento das frutas de amoras-pretas utilizadas neste trabalho e a Tecnoglobo (Curiba, PR, Brasil) por nos doar as enzimas utilizadas para a análise de fibra alimentar. Agradecemos pela infraestrutura do CIDAF da Universidade de Granada/Espanha de responsabilidade do Professor Dr. Antonio Segura Carretero. Ao Projeto FAPERGS N°17/2551-0000780-8 (Edital 01/2017-ARD), Programa Fipe “Enxoval” CCR (Edital 014/2017 PRPGP/UFSM) e Programa Pibic/CNPq/UFSM (Edital 005/2017) pelo apoio financeiro, assim como aos editais Capes 24/2012 e 11/2009- Pró-equipamentos institucionais.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

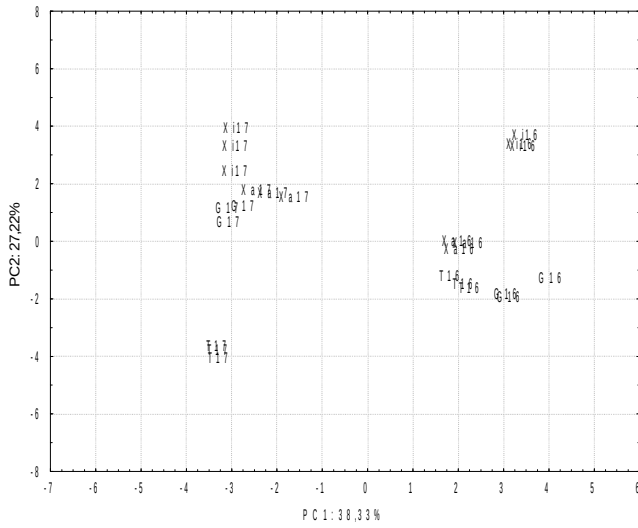
- Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M., & Castro, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, *119*(4), 1497–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- ANVISA. (2003). RE No 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial Da República Federativa Do Brasil, 2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos).
- Antunes, L. E. C. (2002). Amora-Preta: Nova Opção De Cultivo No Brasil. *Ciência Rural*, *32*(1), 151–158. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100026>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2016). Official methods of analysis of AOAC international (20th ed.. Arlington, Virginia, USA: AOAC International. *Association of Official Agricultural Chemists.*, 1(Volume 1).
- APN (Associação Portuguesa de Nutrição). (2017). *Colher Saber, E-book nº45*. Retrieved from http://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/AW_EBook_ColherSaber.pdf
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Rodrigues, D., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & Godoy, H. T. (2014). Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). *Food Research International*, *62*, 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.051>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1963). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Canadian Journal ...*, *37*.
- Bochi, V. C., Barcia, M. T., Rodrigues, D., Speroni, C. S., Giusti, M. M., & Godoy, H. T. (2014). Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*, *164*(2014), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.031>
- Brasil. (2015). Manual de garantia da qualidade analítica. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. <https://doi.org/10.1107/S1744309112015230>
- Brugnara, E. C. (2016). Produção , época de colheita e qualidade de cinco variedades de amoreira-preta em Chapecó , SC, (49), 71–75.
- Carbone, F., Preuss, A., De Vos, R. C. H., D'Amico, E., Perrotta, G., Bovy, A. G., ... Rosati, C. (2009). Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell and Environment*, *32*(8), 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01994.x>

- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Chim, J. F. (2008). Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus* sp.) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e light. *Faculdade de Agronomia, Doutorado*.
- Chung, K. T., Wei, C. I., & Johnson, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*, 9(4), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00028-4)
- Cunha, Mário Antônio Alves da Lima, K. P. de, Santos, Q. V. A., Heinz, O. L., & Schmidt, C. A. P. (1615). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Blackberry Vinegar Produced By Successive Acetification Cycles: Production, Characterization And Bioactivity Parameters. *Arch. Biol. Technol. v. Arch. Biol. Technol. V*, 595959(December). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150136>
- Da Cruz, M. D. C. M., Moreira, R. A., Fagundes, M. C. P., Dos Santos, A. S., De Oliveira, J., & De Souza, J. R. S. (2017). Qualidade de amora-preta produzida em diferentes épocas em condições de clima temperado úmido. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 12(2), 142–147. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i2a5431>
- Du, H., Li, L., Bennett, D., Guo, Y., Key, T. J., Bian, Z., ... Chen, Z. (2016). Fresh Fruit Consumption and Major Cardiovascular Disease in China. *New England Journal of Medicine*, 374(14), 1332–1343. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501451>
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). (2015). Cultivar de amoreira preta BRS Xingu.
- Ferreira, V. B., Turon, T., Regina, S., & Couto, M. (2015). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Organic Vegetables Consumed in Brazil, (June), 798–804. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.69083>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (August 2001), 0–13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gondim, J. A. M., Moura, M. D. F. V, Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., & Santos, K. M. (2005). 27658, 25(4), 825–827.

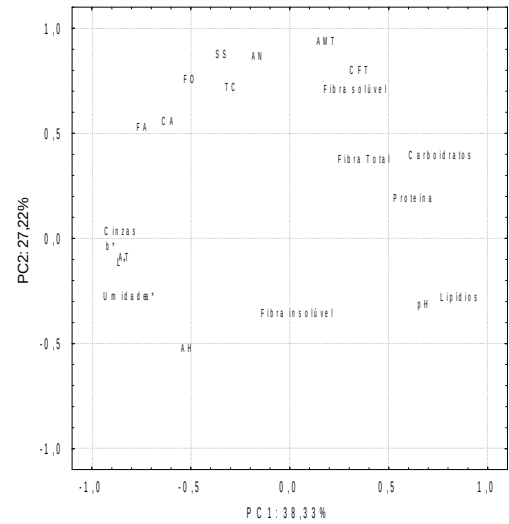
- Gowd, V., Bao, T., Wang, L., Huang, Y., Chen, S., Zheng, X., ... Chen, W. (2018). Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. *Food Chemistry*, 269(July), 618–627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.020>
- Gyamfi, M. A., & Aniya, Y. (2002). Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea. *Biochemical Pharmacology*, 63(9), 1725–1737. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)00915-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)00915-2)
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.097>
- Hirsch, G. E., Facco, E. M. P., Rodrigues, D. B., Vizzotto, M., & Emanuelli, T. (2012). Physicochemical characterization of blackberry from the Southern Region of Brazil. *Ciência Rural*, 42(5), 942–942.
- Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). (2019). Temperatura média anual. Retrieved February 10, 2019, from <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/page&page=anomaliaTempMediaAnual>
- Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Zambiazzi, R. C., & Chim, J. F. (2010). Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. *Química Nova*, 33(8), 1720–1725. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000800019>
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Marti, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, 182, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.008>
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 732–736. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.023>
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>

- Latulippe, M. E., Meheust, A., Augustin, L., Benton, D., Berčák, P., Birkett, A., ... Berezovsky, M. (2013). ILSI Brazil International Workshop on Functional Foods: A narrative review of the scientific evidence in the area of carbohydrates, microbiome, and health. *Food and Nutrition Research*, 57(October 2017). <https://doi.org/10.3402/fnr.v57i0.19214>
- Lee, J., Dossett, M., & Finn, C. E. (2012). Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130(4), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.022>
- Leyva-Jiménez, F. J., Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2018). Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from Lippia citriodora leaves. *Food Research International*, 109(April), 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.035>
- Mikulic-Petkovsek, M., Koron, D., Zorenc, Z., & Veberic, R. (2017). Do optimally ripe blackberries contain the highest levels of metabolites? *Food Chemistry*, 215, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.144>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Plahar, W. A., Annan, N. T., & Nti, C. A. (1997). Cultivar and processing effects on the pasting characteristics, tannin content and protein quality and digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(4), 343–356. <https://doi.org/10.1023/A:1007994612607>
- Quatrin, A., Pauletto, R., Maurer, L. H., Minuzzi, N., Nichelle, S. M., Carvalho, J. F. C., ... Emanuelli, T. (2019). Characterization and quantification of tannins, flavanols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: a comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.01.018>
- Roleira, F. M. F., Tavares-Da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>

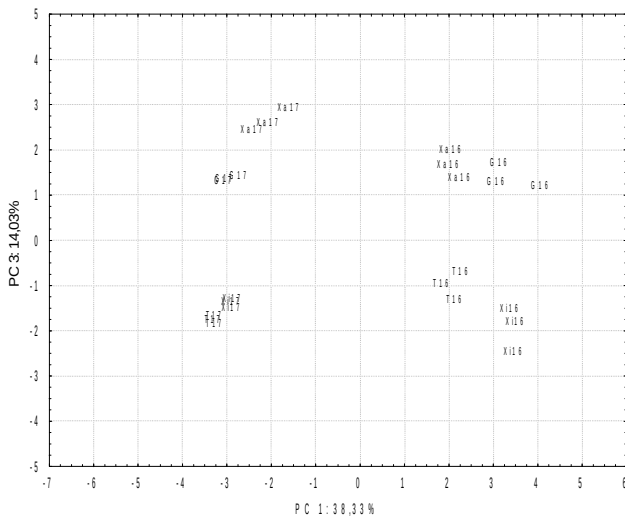
- Sarneckis, C. J., Damberg, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00042.x>
- Singal, P. K., Khaper, N., Palace, V., & Kumar, D. (1998). The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovascular Research*, 40(3), 426–432. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00244-2)
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- SNA (Sociedade Nacional de Agricultura) (2017). Amora-preta: nova cultivar é fonte de saúde e renda. Retrieved January 21, 2019, from <https://www.sna.agr.br/amora-preta-nova-cultivar-e-fonte-de-saude-e-renda/>
- Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Da Silva, T. L. T., De Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.125>
- Sui, X., Zhang, Y., Jiang, L., & Zhou, W. (2018). *Anthocyanins in Food. Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21669-7>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia Vegetal - Taiz & Zeiger - 3ª edição.pdf*.
- Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G. I., & Nishioka, I. (1985). Structure and antiherpetic activity among the Tannins. *Phytochemistry*, 24(10), 2245–2250. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83018-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83018-6)
- Torrezan, R. (1998). Manual para produção de geléias de frutas em escala industrial. *Embrapa*, 27p.
- WHO. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. World Health Organization. 2015.
- Yoshida, K., Mori, M., & Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: From chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*, 26(7), 884–915. <https://doi.org/10.1039/b800165k>



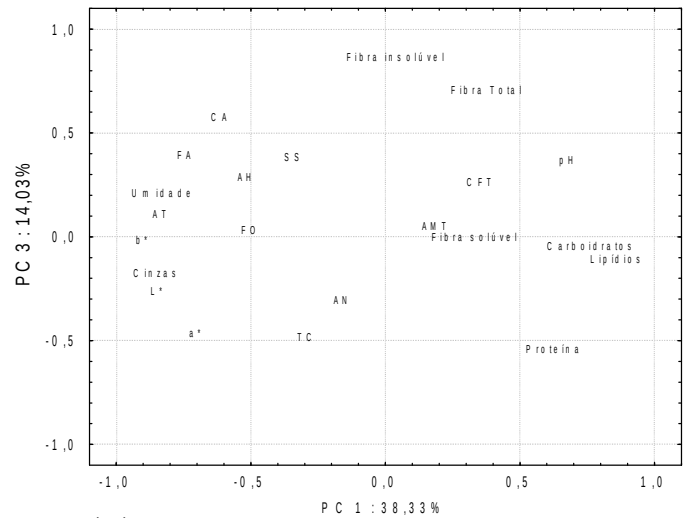
(A)



(B)



(C)



(D)

T: Tupy, G: Guarani, Xa: Xavante, Xi: BRS Xingu, 16: 2016; 17: 2017. Gráficos das amostras (A e C) e variáveis (B e D) demonstradas nos três principais componentes das variáveis estudadas em quatro diferentes cultivares de amora-preta em dois anos de cultivo.

Fig. 1. Análise de componentes principais (PCA) de amoras-pretas das safras de 2016 e 2017.

Tabela 1

Composição centesimal, pH, sólidos solúveis (SS) e acidez titulável (AT) de amoras-pretas.

Ano	2016				2017			
Cultivar/ Análise	Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu	Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu
Umidade	87,35±1,87 ^{aA}	87,72±0,17 ^{aB}	86,59±0,63 ^{aB}	85,79±0,47 ^{aB}	89,30±0,03 ^{bA}	90,32 ±0,17 ^{aA}	90,09 ±0,25 ^{aA}	88,42 ±0,28 ^{cA}
Lipídios	0,90±0,15 ^{abA}	1,00±0,03 ^{aA}	0,78±0,15 ^{bA}	0,76±0,05 ^{bA}	0,49±0,00 ^{bB}	0,50±0,00 ^{aB}	0,35±0,00 ^{dB}	0,43±0,00 ^{cB}
Proteína	1,22±0,02 ^{bA}	1,47±0,03 ^{aA}	1,11±0,04 ^{cA}	1,49±0,04 ^{aA}	1,00±0,08 ^{aB}	1,17±0,06 ^{aB}	1,14±0,10 ^{aA}	1,17±0,05 ^{aB}
Fibra total	6,65±0,19 ^{aA}	5,44±0,19 ^{bA}	6,18±0,12 ^{aB}	6,60±0,07 ^{aA}	6,34±0,37 ^{aA}	4,88±0,40 ^{bA}	7,13±0,45 ^{aA}	5,07±0,34 ^{bB}
Fibra insolúvel	5,13±0,21 ^{aA}	4,80±0,317 ^{aA}	5,37±0,12 ^{aA}	3,49±0,43 ^{bA}	4,81±0,50 ^{abA}	4,40±0,80 ^{bB}	5,38±0,53 ^{aA}	3,92±0,42 ^{cbA}
Fibra solúvel	1,52±0,01 ^{bA}	0,62±0,05 ^{cA}	0,80±0,00 ^{cB}	3,11±0,37 ^{aA}	1,53±0,39 ^{aA}	0,48±0,33 ^{bA}	1,75±0,11 ^{bA}	1,15±0,10 ^{abB}
Cinzas	0,27 ±0,02 ^{bB}	0,25±0,02 ^{bcB}	0,22±0,00 ^{cB}	0,32±0,01 ^{aB}	0,42±0,04 ^{aA}	0,49±0,05 ^{aA}	0,41±0,02 ^{aA}	0,42±0,02 ^{aA}
Carboidratos	10,25±1,87 ^{aA}	9,55±0,25 ^{aA}	11,54±0,60 ^{aA}	11,64±0,50 ^{aA}	8,80±0,23 ^{bB}	7,52±0,21 ^{cB}	8,01±0,18 ^{cB}	9,56±0,29 ^{aB}
pH	3,72±0,06 ^{aA}	3,39±0,10 ^{bA}	3,30±0,13 ^{bA}	3,22±0,04 ^{bA}	3,16±0,02 ^{abB}	3,13±0,06 ^{bB}	3,24±0,01 ^{aA}	3,11±0,02 ^{bB}
SS (°Brix)	7,50±0,00 ^{bB}	7,33±0,57 ^{bA}	9,00±0,00 ^{aB}	9,00±0,00 ^{aB}	10,00±0,00 ^{aA}	6,83±0,28 ^{bA}	10±0,00 ^{aA}	10,17±0,28 ^{aA}
AT (% de ácido cítrico)	0,90 ±0,06 ^{bcB}	1,00 ±0,05 ^{abB}	1,04 ±0,06 ^{aA}	0,76 ±0,06 ^{cB}	1,27 ±0,00 ^{aA}	1,19±0,01 ^{abA}	1.06 ±0,06 ^{bA}	1,24 ±0,06 ^{aA}

Os resultados estão expressos em % (g/100 gramas de fruta *in natura*). Valor médio ± desvio padrão (n = 3). Coeficiente de variação <10%. As médias seguidas de mesma letra minúscula no mesmo ano não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05). As médias seguidas de mesma letra maiúscula para a mesma cultivar em anos diferentes não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05).

Tabela 2

Parâmetros de cor das cultivares de amoras-pretas.

Ano	2016				2017			
Cultivar	Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu	Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu
L*	26,64 ±0,06 ^{bA}	26,94±0,11 ^{aB}	26,74±0,05 ^{abB}	26,88 ±0,14 ^{abB}	27,37±0,46 ^{cA}	28,84±0,06 ^{aA}	27,91±0,13 ^{bcA}	28,18±0,14 ^{abA}
a*	8,45±0,28 ^{abB}	8,92±0,30 ^{aB}	7,77±0,02 ^{cB}	8,07±0,4 ^{bcB}	10,59±0,50 ^{bA}	12,20±0,41 ^{aA}	10,65±0,10 ^{cA}	10,96±0,24 ^{bA}
b*	1,36 ±0,08 ^{aB}	1,14±0,05 ^{bB}	1,35±0,09 ^{aB}	0,81±0,02 ^{cB}	2,95±0,27 ^{aA}	2,76±0,22 ^{aA}	1,74±0,13 ^{bA}	2,82±0,11 ^{aA}

L*: luminosidade; a*: tendência ao vermelho; b*: tendência ao amarelo.

Valor médio ± desvio padrão (n = 3). Coeficiente de variação <10%. As médias seguidas de mesma letra minúscula no mesmo ano não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05). As médias seguidas de mesma letra maiúscula para a mesma cultivar em anos diferentes não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05).

Tabela 3

Tempo de retenção (TR) e espectros de massas para tentativa de identificação de compostos fenólicos antociânicos em amoras-pretas.

TR (min)	íon molecular e íon produto (m/z)	Tentativa de identificação	Cultivar			
			Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu
4,847	449-287	Cianidina-3-glicosídeo	x	x	x	x
4,848	419-287	Cianidina-3-xilosídeo	x	x	x	x
6,112	595-287	Cianidina-3-rutinosídeo	x	x	x	x
9,509	535-287	Cianidina-3-malonilglicosídeo	x	x	x	x
10,686	593-287	Cianidina-3-dioxalilglicosídeo	x	x		x

*Nas cultivares onde aparece o “x” foi detectada a presença do composto.

Tabela 4

Tempo de retenção (TR), espectros de massas e fórmula molecular para tentativa de identificação de compostos fenólicos não antocianicos em amoras-pretas.

TR (min)	Íon molecular (m/z)	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	Cultivar			
				Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu
4,0	282,0831	C ₉ H ₁₆ NO ₉	NI 1			x	
4,5	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Isômero de ácido clorogênico 1	x	x	x	x
4,9	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Isômero de ácido clorogênico 2	x	x	x	x
5,4	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Isômero de ácido clorogênico 3	x	x	x	x
9,5	180,0666	C ₉ H ₁₀ NO ₃	NI 3	x	x	x	x
13,5	329,0878	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	Ácido vanílico glicosídeo		x	x	x
14,2	368,0987	C ₁₆ H ₁₈ NO ₉	NI 4		x	x	x
17,2	357,0827	C ₁₅ H ₁₇ O ₁₀	Ácido dihidrocaféico hexuronídeo			x	
17,3	341,0878	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Cafeoil hexosídeo		x		
17,7	396,0936	C ₁₇ H ₁₈ N ₇ O ₈	NI 5		x		

17,9	203,0925	C ₉ H ₁₅ O ₅	NI 6	x		x	
18,6	289,0608	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	Catequina	x			
21,0	447,0933	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Isômero de Kaempferol hexosídeo 1	x	x	x	x
21,2	465,1038	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	Catequina hexuronídeo	x		x	x
21,8	289,0718	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	Epicatequina	x		x	x
22,8	431,1923	C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀	NI 7			x	
23,3	401,0878	C ₂₀ H ₁₇ O ₉	Apigenina pentosídeo			x	
23,8	461,1664	C ₂₃ H ₂₉ O ₁₀	Purpurascenina			x	
24,8	475,0882	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	Isômero de Kaempferide hexuronídeo 1	x	x	x	x
24,8	485,1089	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁	Epigalocatequina-3-O-siringate	x			
28,1	477,0675	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	Quercetina hexuronídeo	x	x	x	x
28,2	433,0412	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂	Ácido elágico pentosídeo			x	x
28,3	463,0882	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	Quercetina hexosídeo	x		x	x
28,4	609,1461	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Rutina	x		x	x
29,0	607,1305	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₆	Quercetina 3-O-[6"-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-β-D-galactosídeo]		x		
29,3	433,0776	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	Quercetina pentosídeo			x	
29,6	491,0831	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	Isoramnetina hexuronídeo			x	
30,0	300,9990	C ₁₅ H ₅ O ₈	Ácido elágico			x	

30,7	447,0933	$C_{21}H_{19}O_{11}$	Isômero de Kaempferol hexosídeo 2				x	
31,0	461,0725	$C_{21}H_{17}O_{12}$	Isômero de Kaempferol hexuronídeo 2				x	
32,4	711,3786	$C_{33}H_{59}O_{16}$	NI 8	x				
38,4	517,3025	$C_{37}H_{41}O_2$	NI 9	x				
39,3	503,3378	$C_{30}H_{47}O_6$	NI 10	x	x		x	x
40,0	531,3539	$C_{28}H_{51}O_9$	NI 11			x	x	
40,3	503,3237	$C_{26}H_{47}O_9$	NI 12	x		x	x	x
41,1	531,3327	$C_{31}H_{47}O_9$	NI 13			x	x	x
41,6	531,3327	$C_{31}H_{47}O_9$	NI 14			x	x	x

*Nas cultivares onde aparece o "x" foi detectada a presença do composto. **Não Identificado (NI)

Tabela 5

Compostos fenólicos e capacidade antioxidante das amoras-pretas nos anos de 2016 e 2017.

Ano	2016				2017			
Cultivar / Análise	Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu	Guarani	Tupy	Xavante	BRS Xingu
AMT ¹	86,94 ± 3,75 ^{bA}	79,80 ± 7,37 ^{bA}	86,99 ± 1,65 ^{bA}	108,78 ± 5,92 ^{aA}	88,76 ± 3,94 ^{bA}	53,27 ± 4,58 ^{cB}	92,32 ± 6,33 ^{bA}	113,99 ± 11,33 ^{aA}
CFT ²	381,52 ± 14,60 ^{bA}	309,22 ± 7,70 ^{cA}	521,83 ± 48,93 ^{aA}	513,15 ± 8,72 ^{aA}	350,16 ± 14,59 ^{bA}	227,42 ± 6,44 ^{cB}	447,32 ± 33,40 ^{aA}	477,45 ± 7,88 ^{aB}
TC ³	11,11 ± 0,84 ^{cB}	19,89 ± 1,23 ^{bA}	17,95 ± 0,88 ^{bB}	26,29 ± 2,28 ^{aA}	18,16 ± 0,48 ^{cA}	19,48 ± 1,48 ^{bcA}	22,31 ± 1,38 ^{bA}	27,92 ± 2,23 ^{aA}
CA ⁴	2,54 ± 0,07 ^{bB}	1,74 ± 0,19 ^{cB}	2,98 ± 0,16 ^{aB}	2,49 ± 0,20 ^{bB}	4,85 ± 0,19 ^{bA}	2,38 ± 0,26 ^{cA}	6,18 ± 0,27 ^{aA}	4,62 ± 0,18 ^{bA}
FA ³	4,62 ± 0,09 ^{cB}	3,35 ± 0,13 ^{cB}	10,67 ± 1,02 ^{aB}	6,18 ± 0,46 ^{bB}	28,86 ± 2,07 ^{aA}	8,40 ± 0,80 ^{cA}	22,36 ± 2,17 ^{bA}	23,77 ± 2,12 ^{bA}
AH ⁵	0,36 ± 0,01 ^{cB}	0,50 ± 0,03 ^{bB}	0,59 ± 0,03 ^{aB}	0,29 ± 0,01 ^{dA}	0,53 ± 0,03 ^{bA}	0,81 ± 0,03 ^{aA}	0,72 ± 0,05 ^{aA}	0,33 ± 0,11 ^{cA}
FO ⁶	9,33 ± 0,02 ^{bB}	12,60 ± 0,93 ^{aA}	10,41 ± 0,89 ^{bB}	12,66 ± 1,05 ^{aB}	14,48 ± 0,99 ^{aA}	10,00 ± 0,72 ^{bA}	15,11 ± 1,50 ^{aA}	16,71 ± 1,31 ^{aA}
AN ¹	85,66 ± 7,67 ^{cB}	128,19 ± 10,60 ^{bA}	104,08 ± 7,86 ^{bcB}	157,83 ± 15,37 ^{aA}	138,22 ± 13,70 ^{bA}	90,98 ± 6,80 ^{cB}	125,72 ± 8,60 ^{bA}	168,45 ± 11,58 ^{aA}

Antocianinas monoméricas totais (AMT) e Antocianinas (AN)¹: mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de fruta *in natura*. Compostos fenólicos totais (CFT)²: mg de ácido gálico/100g de fruta *in natura*. Taninos condensados (TC) e flavanóis (FA)³: mg de epicatequina/100g de fruta *in natura*. Capacidade antioxidante (CA)⁴: mmol de trolox/100g de fruta *in natura*. Ácidos hidroxicinâmicos (AH)⁵: mg de ácido clorogênico/100g de fruta *in natura*. Flavonóis (FO)⁶: mg de quercetina-3-glicosídeo/100g de fruta *in natura*. Valor médio ± desvio padrão (n = 3). As médias seguidas de mesma letra minúscula no mesmo ano não diferem entre si pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05). As médias seguidas de mesma letra maiúscula para a mesma cultivar em anos diferentes não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05). Coeficiente de variação <10%.

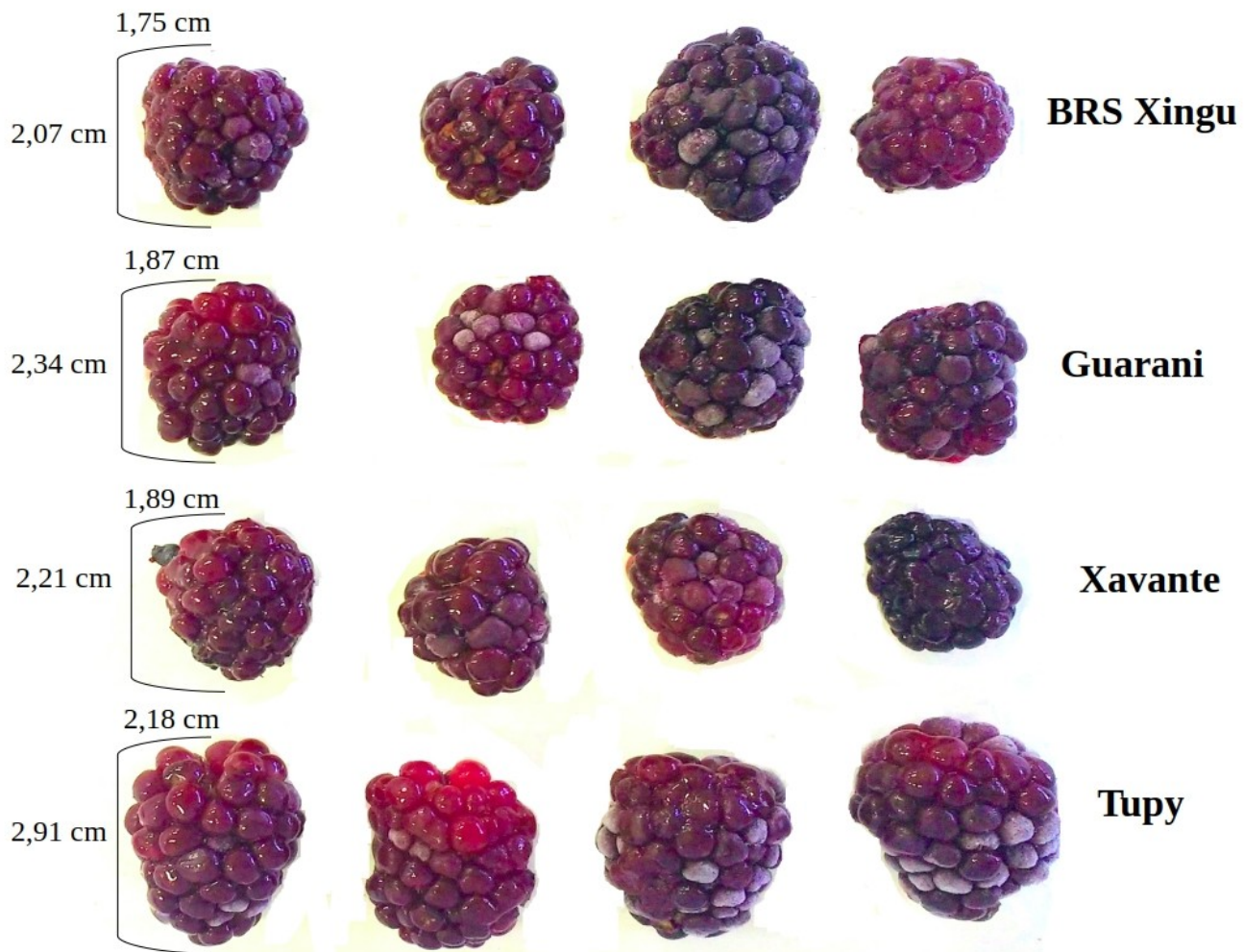
Material Suplementar

Fig. S1. Frutas de amora-preta das cultivares BRS Xingu, Guarani, Xavante e Tupy, com especificação de altura e comprimento das frutas em centímetro (cm).

MANUSCRITO 2

MICRO-ONDAS DE HIDRODIFUSÃO E GRAVIDADE: UM PROCESSO
SUSTENTÁVEL PARA A OBTENÇÃO DE EXTRATO DE AMORA-PRETA RICO EM
COMPOSTOS FENÓLICOS

Este trabalho está em fase de revisão para ser submetido à revista Food Chemistry

Micro-ondas de hidrodifusão e gravidade: um processo sustentável para a obtenção de extrato de amora-preta rico em compostos fenólicos

Débora P. Moraes^a, Daniele F. Ferreira^a, Carla A. A. Farias^a, Juliano S. Barin^a, Edi F. Ries^b,
Giovani L. Zabot^c, Márcia Vizzotto^d, Jesús Lozano-Sánchez^{ef}, Milene T. Barcia^{a*}

^a*Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^b*Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil*

^c*Universidade Federal de Santa Maria Campus Cachoeira do Sul, Universidade Federal de Santa Maria, Cachoeira do Sul, RS, Brasil*

^d*Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil*

^e*Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Alimentos Funcionais, Parque Tecnológico da Ciência da Saúde, Avenida del Conocimiento s / n, E-18100 Granada, Espanha*

^f*Departamento de Nutrição e Ciência dos Alimentos, Universidade de Granada, Campus de Cartuja, 18071 Granada, Espanha*

*Autor para quem a correspondência deve ser endereçada (e-mail: milene.barcia@ufsm.br; telefone: (55) 98100-0636)

Resumo: O objetivo do presente estudo foi verificar se o micro-ondas de hidrodifusão e gravidade (MHG) proporciona a remoção de um extrato de amora-preta com elevada concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Verificou-se que isto foi possível com 500 Watts e 10 minutos de extração. O extrato apresentou maior conteúdo fenólico e capacidade antioxidante, além de possuir baixo custo de obtenção com redução de custos, frente a extração exaustiva, e segurança microbiológica. Extraíu-se pela primeira vez o Hidroxiresveratrol em amoras devido ao método de extração utilizado. A análise das frações obtidas no processo mostrou que o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante reduzem nas últimas frações, reduzindo o tempo de extração para 8 minutos. O coproduto apresentou composição fenólica, capacidade antioxidante e qualidade microbiológica adequadas para o aproveitamento em outros alimentos. Assim, apresentamos um método eficiente, rápido, econômico e ecológico para a extração de fenólicos de amora-preta.

Palavras-chave: otimização de extração; antocianinas; análise microbiológica; identificação de compostos fenólicos; análise econômica; extração verde; hidroxiresveratrol

1. Introdução

Elevadas concentrações de compostos fenólicos são encontradas em frutas de amora-preta (*Rubus sp.*), e lhes conferem alta capacidade antioxidante (Kaume, Howard, & Devareddy, 2012), que são responsáveis por apresentar efeitos benéficos a saúde humana (Gülçin, 2012). A extração desses compostos é realizada tradicionalmente através de solventes orgânicos (extração sólido-liquído), que apresentam elevado custo e demandam maior tempo de extração, apresentam toxicidade, além de gerarem grandes quantidades de resíduos que posteriormente causam danos ambientais (Zill-e-huma, 2010). A extração sólido-liquído é um método de extração tradicional utilizada para remover os compostos fenólicos de alimentos, tanto em escala laboratorial como em industrial, no qual utiliza-se solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona e diclorometano, que são geralmente combinados com a água (Wen et al., 2019). Pelas desvantagens em extrair os compostos fenólicos de amora-preta pelo método tradicional, tem-se buscado outros meios sustentáveis, rápidos e economicamente viáveis para realizar a extração destes compostos (Garcia-Salas, Morales-Soto, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2010). Métodos alternativos como a extração líquido pressurizado (Machado, Pasquel-Reátegui, Barbero, & Martínez, 2014), extração com fluido supercrítico (Reátegui et al., 2014) e extração assistida por ultrassom (Machado et al., 2018) já foram empregados para a extração de compostos fenólicos de amora-preta.

Outra alternativa para extração desses compostos é a extração através da técnica de micro-ondas por hidrodifusão e gravidade (MHG), um método sustentável que realiza a extração de compostos fenólicos sem a adição de solventes e de modo rápido, que resulta em outras vantagens como o baixo consumo de energia e baixos níveis de contaminantes presentes no extrato (Bittar, Perino-Issartier, Dangles, & Chemat, 2013), assim como apresenta a capacidade de reduzir o conteúdo microbiano (Bozkurt-Cekmer & Davidson, 2016). Mesmo

que os compostos fenólicos sejam termossensíveis (Zhang, Chen, & Wang, 2014), é possível que através dessa técnica esses compostos sejam preservados, devido ao tempo reduzido de exposição a altas temperaturas.

O equipamento (MHG) consiste em um micro-ondas, similar ao comercial, porém invertido, onde a extração se dá pela combinação entre o aquecimento por micro-ondas e a gravidade da Terra a pressão atmosférica (Zill-e-Huma, Abert Vian, Maingonnat, & Chemat, 2009), que faz com que os compostos descendam do reator para o condensador e sejam coletados na parte inferior do equipamento. Um estudo que utilizou a coleta de diferentes frações de sucos de frutas extraídos com MHG, mostra que os polifenóis totais de ameixa, tomate, cereja e damasco foram extraídos nos primeiros minutos. Adicionalmente, uma alta concentração de antocianinas foi encontrada na metade do processo de extração, não sendo necessário completar a remoção total do extrato da fruta para se obter um produto rico nesses bioativos (Cendres, Hoerlé, Chemat, & Renard, 2014).

Portanto o nosso objetivo foi verificar se o MHG proporciona a remoção de um extrato de amora-preta com elevada concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras de amora-preta

Foram utilizadas amoras-pretas da cultivar Tupy obtidas no ano de 2017 na Embrapa Clima Temperado localizada na cidade de Pelotas, RS, Brasil. As frutas foram mantidas sob congelamento a -18 °C até o momento das extrações, assim como todos os extratos obtidos após as extrações até o momento das análises.

2.2. Otimização univariada da potência de extração para o MHG

A extração foi realizada com o equipamento MHG (modelo NEOS-GR, Itália), incluindo um sensor infravermelho de temperatura, um frasco de vidro com capacidade de 2 litros com uma

rede de filtros e tampa de politetrafluoretileno (PTFE) e um condensador de vidro, o qual permaneceu conectado a um banho ultratermostático a 10 °C. Utilizou-se 200 gramas de amora-preta congeladas cortadas ao meio. Foram avaliadas as potências de 300, 400, 500 e 600 Watts até se obter o volume máximo de extrato sem queimar a fruta. O extrato foi coletado em provetas. O tempo de extração apresentado foi o que a fruta ficou exposta a radiação micro-ondas sem ocorrer a queima, porém esperou-se até que toda a água da fruta que foi condensada fosse coletada na proveta, correspondendo esse ao volume total de extrato obtido. Para a escolha da melhor potência foram avaliados o tempo de extração, volume de extrato, capacidade antioxidante, teor de antocianinas monoméricas totais e compostos fenólicos totais.

2.3. Extração de compostos fenólicos com solventes orgânicos

A extração com solvente orgânico (exaustiva) para a amora-preta *in natura* e para o coproduto da extração por MHG foi realizada conforme o protocolo descrito por Bochi et al., (2014), o qual utiliza uma solução aquosa com 20% de acetona e 0,35% de ácido fórmico.

2.4. Obtenção das frações de extrato de amora-preta por MHG

O extrato de 200 gramas de frutas congeladas e cortadas ao meio foi coletado através da cavidade inferior do MHG e cada fração foi composta por 20 mL de extrato. As frações foram depositadas em tubos de falcon de 50 mL (Cendres, Hoerlé, Chemat, & Renard, 2014).

2.5. Determinação dos compostos fenólicos por espectrometria UV-visível

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método colorimétrico utilizando Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1998). A leitura foi realizada com comprimento de onda de 760 nm e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por litro de extrato e em mg de ácido gálico por 100 gramas de coproduto.

A concentração de antocianinas monoméricas totais foi baseada nas transformações estruturais reversíveis do cromóforo das antocianinas, que possui a capacidade de absorver energia, em função da mudança de pH do meio, manifestando diferentes espectros de absorção, segundo a metodologia do pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Os valores foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo por litro de extrato e mg cianidina-3-glicosídeo por 100 gramas de coproduto.

A quantificação de taninos condensados totais foi mensurada empregando a metil celulose para a precipitação dos taninos condensados, na qual baseia-se na diferença da absorbância dos compostos solúveis em água e sulfato de amônio (fenólicos) menos os precipitados por metil celulose (taninos). A quantificação foi feita com curva de calibração de epicatequina com leituras realizadas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm (Sarneckis et al., 2006) e os resultados foram expressos em mg de epicatequina por litro de extrato e mg de epicatequina por 100 gramas de coproduto.

2.6. Avaliação da capacidade de absorção de radical oxigênio - ORAC

A capacidade antioxidante foi avaliada pela metodologia de capacidade de absorção de radical oxigênio. O método baseia-se na atividade sequestradora de um antioxidante pela formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2' – azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C, que reage com a proteína Fluoresceína, marcadora de fluorescência, formando um produto não fluorescente, que é medido por espectrofotometria (excitação 485 nm e emissão 528 nm) (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). A quantificação foi realizada com o padrão de trolox e os resultados foram expressos em μmol de trolox por litro de extrato e μmol de trolox por 100 gramas de coproduto.

2.7. Separação e identificação dos compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-TOF-MS

A separação cromatográfica do extrato de amora-preta na concentração de 5000 mg/L feita em uma coluna C18 Zorbax Eclipse Plus de 150 mm x 4,6 mm id, 1,8 μ m (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) através da aplicação de uma fase móvel binária. Neste sentido, a água acidificada com 0,1% de ácido fórmico foi utilizada como solvente A, enquanto o metanol foi usado como solvente B. Para a separação dos compostos foram injetados 10 μ L da amostra seguindo este gradiente linear: 0 min (5% B); 42min (95% B), 45min (5% B), onde as condições iniciais foram mantidas por 5 minutos após cada análise, levando um total de 50 minutos por análise. A taxa de fluxo foi de 0,4 mL/min. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente (Jiménez-Sánchez et al., 2015).

A plataforma analítica aplicada para identificar os fenólicos foi composta por uma série RRLC 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), um instrumento equipado com quatro blocos: um desgaseificador a vácuo, um auto amostrador, uma bomba binária e um detector espectrômetro de massa de tempo de voo TOF (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). O detector de MS foi acoplado a um sistema de HPLC com uma interface de electrospray ortogonal (ESI) (modelo G1607 da Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) operando no modo íon negativo. Os parâmetros da fonte ESI foram a voltagem capilar de +4kV; temperatura do gás de secagem, 210 ° C; fluxo de gás de secagem, 9 L/min; e pressão de gás de nebulização, 2,3 bar. Os valores dos parâmetros de transferência foram: saída capilar, -120 V; skimmer 1, -40 V; hexapole 1, -23 V; Hexapolo de RF, 80 V; e skimmer 2, -22,5 V. A detecção foi realizada aplicando uma faixa de massa de 50-1500 m / z. O espectrômetro de massa TOF foi calibrado externamente usando uma bomba de seringa Cole Palmer 74900-00-05 (Vernon Hills, IL, EUA) que estava diretamente conectada à interface. A calibração do espectrômetro de massa externo foi realizada usando aglomerado de formiato de sódio

(hidróxido de sódio 5 mol/L em água / iso-propanol 1/1 (v / v) com 0,1% de ácido fórmico) no modo de regressão quadrática de calibração de alta precisão (HPC) (Leyva-Jiménez, Lozano-Sánchez, Borrás-Linares, Arráez-Román, & Segura-Carretero, 2018). Os dados de massa dos íons moleculares foram adquiridos pelo software de análise DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics).

2.8. Separação e identificação das antocianinas por HPLC-ESI-MSⁿ

Soluções de extrato de amora foram introduzidas a uma taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ e foram separadas na coluna ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HT (2.1x100mm, 1.8-Micron) 600 Bar (Agilent). As fases móveis utilizadas no HPLC foram compostas por Solvente A: água, ácido fórmico, acetonitrila (88,5:8,5:3, v / v / v), Solvente B: água, ácido fórmico, acetonitrila (41,5:8,5:50, v / v / v), com fluxo de 0,25 mL/min, com gradiente linear para o Solvente B de 0 min, 6%; 10 min, 30%; 20 min, 50%; 25 min, 6%. A temperatura do gás foi de 300 °C e o fluxo de gás seco foi de 5 L/min. O nebulizador permaneceu em 45 psi. A voltagem do capilar foi de 3500 V e do fragmentador 5V. Nitrogênio foi usado como gás de nebulização e como gás de colisão. Íons moleculares foram detectados usando o modo positivo. Os experimentos com variação da energia de colisão induzida por dissociação (CID) foram realizados no modo positivo, em que a energia de colisão foi de 15 eV e o fragmentador de 5V (Barcia et al., 2014). A identificação das antocianinas nos extratos foi realizada com base na literatura e nos espectros de massa por ionização por *electrospray* (ESI-MS) adquiridos em um equipamento Agilent Technologies 6460 Triplo quadrupolo 6460 (LC/MS-MS) (Agilent Technologies, USA).

2.9. Separação e quantificação dos compostos fenólicos não antociânicos por HPLC-DAD

Os extratos foram previamente purificados com cartuchos de SPE C18 para remover interferentes e concentrar a amostra de acordo com a metodologia de Giusti & Wrolstad

(2001), antes de ser injetado no HPLC-DAD (Shimadzu). Duas fases móveis foram utilizadas, compostas por 5% metanol, 0,1% de ácido fórmico e água milli-Q (Fase móvel A) e por acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel B) com o gradiente linear para a fase móvel B de 0 min, 0%; 21 min, 4%; 55 min, 16%; 70 min, 50%; 72 min, 100%; 83 min, 0% até o fim da corrida aos 92 minutos. Injetou-se 20 µL da amostra contendo os compostos fenólicos não antocianínicos em uma coluna de fase reversa Hypersil Gold C-18 (5 µm de partícula, 150mm, 2,1mm) com a temperatura do forno de 38 °C (Quatrin et al., 2019). Para a quantificação das diferentes classes de fenólicos foram utilizadas curvas de calibração de epicatequina (280 nm, flavanóis), ácido clorogênico (320 nm, ácidos hidroxicinâmicos) e quercetina-3-glicosídeo (360 nm, flavanóis). As curvas de calibração externa possuem pontos equidistantes e apresentaram R^2 superior a 0,99. As faixas das curvas de calibração foram de 10,75 a 107,50 mg/L para a epicatequina, de 2,38 a 2,28 mg/L de ácido clorogênico e 12,33 a 123,33 mg/L para a quercetina-3-glicosídeo.

2.10. Quantificação das antocianinas por HPLC-UV-Vis

A separação das antocianinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a coluna Zorbax (2,1 mm x 150 mm 3,5 µm de tamanho de partícula) Elipse XDB, com fluxo de 0,5 mL/min e temperatura do forno de 38 °C. Empregaram-se duas fases móveis onde a fase móvel A foi composta por água acidificada com 3% de ácido fórmico e a fase móvel B composta por acetonitrila. O gradiente linear foi de 0 min 8%; 25 min, 32%; 27 min, 90% e 39 min, 8% de B, e o tempo total de corrida ocorreu em 50 minutos. A quantificação das antocianinas foi feita com curva de calibração com padrão de cianidina-3-glicosídeo ($R^2=0,9993$) com dez pontos equidistantes na faixa de 0,2 a 45,2 mg/L, através do HPLC/UV-visível com leituras no comprimento de onda de 520 nm. O método foi validado, como mostra o manuscrito 1.

2.11. Análise microbiológica

A fruta *in natura*, o extrato e o coproduto obtido por MHG foram avaliados quanto à qualidade microbiológica através de análises de enumeração de mesófilos aeróbios totais e salmonella sp, coliformes totais e termotolerantes (APHA, 2001).

2.12. Análise de cor das diferentes frações coletadas com MHG

A análise instrumental da cor das frações foi realizada em colorímetro (Minolta CR-300) utilizando a escala Cielab.

2.13. Análise econômica

Com base em descobertas experimentais, foi elaborado um fluxograma (**Fig. S1.**) no software SuperPro Designer 9.0® (Intelligen Inc., Scotch Plains, NJ, EUA) para simular parâmetros econômicos de processamento de amora por MHG e por extração exaustiva. Os parâmetros econômicos avaliados no estudo foram o custo de fabricação (COM) e a contribuição percentual dos custos discriminados no COM: custo da matéria-prima (CRM), custo da mão de obra operacional (COL), custo das utilidades (CUT) e investimento em capital fixo (FCI).

Em primeiro lugar, os custos totais de ambos os equipamentos de escala de laboratório foram determinados com base na cotação local (ano de referência: 2018; **Tabela S1**). O equipamento para a extração exaustiva em escala de laboratório foi de US \$ 2590,14, enquanto o equipamento para a extração de MHG em escala de laboratório foi de US \$ 20.392,54. Os resultados experimentais de extração em escala de laboratório foram utilizados como dados de entrada no simulador, incluindo os tempos de cada etapa. Outros dados de entrada consistiram em custo da amora-preta, custo de solventes, salário, taxa de depreciação, taxa de manutenção e tempo de vida do projeto, entre outros (**Tabela S2**). Para ambos os métodos de extração, um investimento fixo adicional de 20% foi incluído para o equipamento extra contábil não listado no material suplementar.

A redução do custo do equipamento para a capacidade desejada pode ser feita pela lei de energia (Eq. (1)) (Green e Perry, 2007; Smith, 2005; Turton et al., 2012), onde M é uma constante dependendo do equipamento tipo, C1 é o custo do equipamento com capacidade Q1, e C2 é o custo base conhecido para equipamentos com capacidade Q2. Os valores de M foram obtidos da literatura científica (Green e Perry, 2007; Peters e Timmerhaus, 1991; Smith, 2005; Turton et al., 2012).

$$C_1 = C_2 \left(\frac{Q_1}{Q_2} \right)^M$$

O rendimento e a composição dos extratos obtidos na escala piloto foram assumidos como tendo o mesmo comportamento daqueles obtidos na escala de laboratório. O COM e a contribuição percentual dos custos discriminados (FCI, CRM, COL e CUT) foram avaliadas seguindo os modelos típicos determinados no software de simulação. Para escala piloto, as capacidades foram aumentadas 100 vezes para a extração MHG e 1000 vezes para a extração exaustiva quando comparadas à escala laboratorial. Não foram levados em consideração a diferença no custo de trabalho operacional ocasionado devido as normas de segurança do trabalho, que são diferentes entre cada um dos processos, nem o custo de remoção do solvente e tratamento de resíduos da extração exaustiva.

2.14. Análise estatística

A análise estatística foi feita através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Duncan para avaliar diferenças entre os grupos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

3. Resultados e Discussões

3.1. Otimização da melhor potência de extração para o MHG

Os parâmetros avaliados (**Fig. 1.**) mostram que a potência adequada para a extração foi a de 500 W onde a extração durou em torno de 10 minutos. Nessas condições conseguimos extrair os compostos fenólicos em um menor período de tempo, sendo esse requisito o responsável pela a escolha dessa potência, pois essa se iguala estatisticamente ($p \leq 0,05$) a potência de 400 W em todos os parâmetros avaliados exceto o tempo. O tempo reduzido de extração em comparação com a extração a 400 W (**Tabela S3**), leva um aumento do rendimento de extrato por hora de trabalho (aproximadamente 810 mL/h para 500 watts e 638,30 mL/h para 400 W). Ao compararmos a potência de 500 W com a maior (600 W) e com a menor potência testada (300 W), vemos que com 300 W houve a redução do rendimento do extrato (9 mL) devido ao tempo que a amora ficou exposta a radiação de micro-ondas que provocou a evaporação de parte da água da fruta. Com 600 W ocorre a redução do teor de compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante mostrando que potências maiores levam a degradação de compostos fenólicos e conseqüentemente reduzem a capacidade antioxidante. A degradação de compostos fenólicos ocasionada pelo uso de potências elevadas no micro-ondas já é conhecida, onde Vinatoru, Mason, & Calinescu (2017) ressalta que deve-se reduzir a energia utilizada na extração, pois o excesso de energia pode levar a degradação de compostos bioativos, como os compostos fenólicos. Além disso, os compostos fenólicos não antociânicos presentes na amora-preta, como a epicatequina (flavanóis) e derivados de quercetina (flavanóis), são compostos termossensíveis e provavelmente foram degradados, diminuindo assim a capacidade antioxidante do extrato (Zhang, Chen, & Wang, 2014). Desta forma, as condições otimizadas de potência de extração de 500 W permitiu a remoção do

maior volume de extrato com elevada concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em um curto período de tempo (10 minutos).

3.2. Comparação entre métodos de extração

O extrato obtido pelo MHG apresentou características favoráveis em comparação com a extração exaustiva com solvente orgânico (**Fig. 2B.** e **Tabela S4**). Observou-se que no MHG consegue-se produzir um extrato concentrado em compostos fenólicos e com maior capacidade antioxidante (cerca de 50 vezes superior). Além disso a extração com MHG é cerca de 3,6 vezes mais rápida que a extração com solvente orgânico, que demora aproximadamente 36 minutos, levando-se em consideração o tempo de agitação e filtração da amostra. A extração por MHG não torna possível a remoção total dos compostos fenólicos das frutas (**Fig. 2A**) como na extração exaustiva, porém possibilita remover esses compostos sem a adição de nenhum tipo de solvente, apenas os carrega na água *in situ*.

Essa tecnologia apresenta vantagens frente à extração com solventes orgânicos, sendo considerada uma tecnologia verde obedecendo aos seis princípios da extração verde (Chemat, Vian, & Cravotto, 2012), por não gerar quantidades significativas de CO₂ e garantir que o extrato apresente elevado grau de pureza e maior segurança (Ekezie, Sun, D. W., & Cheng, 2017). Em comparação com o método de extração orgânico a tecnologia de MHG apresenta vantagens quando se refere ao rendimento e ao teor de fenólicos, além de ser amigável ao meio ambiente por não apresentar nenhum contaminante químico.

3.3. Caracterização do extrato obtido por MHG

O extrato da amora-preta é composto majoritariamente por antocianinas, que representam em torno de 85% da composição fenólica. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam menor representatividade do total do extrato, configurando apenas 1% da sua composição. Os flavanóis e flavonóis representam juntos 14% do extrato. Portanto o extrato da amora-preta

obtido pelo MHG é caracterizado principalmente por ser rico em antocianinas. Estudos recentes consideram a amora-preta como um alimento funcional devido aos seus polifenóis, sobretudo representados pelas antocianinas, que apresentam elevada atividade antioxidante e antidiabética (Gowd, Bao, & Chen, 2018). Assim como a fruta *in natura* o extrato dessa fruta também pode apresentar os efeitos benéficos à saúde.

No presente trabalho foram identificados 17 compostos fenólicos não antociânicos (**Tabela. 1**) e 5 antocianinas. Dentre os ácidos fenólicos e seus derivados encontramos derivados de ácido cafeico (isômeros de ácido clorogênico e cafeoil hexosídeo). O ácido elágico também foi identificado, assim como o seu derivado acrescentado de uma pentose. Na literatura encontramos o ácido gálico na composição da amora-preta (Mertz, Cheynier, Günata, & Brat, 2007; Pavlović et al., 2016), porém no extrato de MHG foi identificado apenas o seu derivado ácido gálico hexosídeo. O estilbeno hidroxiresveratrol foi identificado no extrato de amora-preta pela primeira vez. Os estilbenos são compostos relativamente apolares, porém a utilização de solventes polares como a água submetida a irradiação com micro-ondas torna-se uma boa opção para extrair esses compostos, pois a água absorve eficientemente a energia na frequência de micro-ondas (Martins & Alvarez, 2010), o que pode ter favorecido a retirada desse composto da fruta.

Os flavonoides são a família de polifenóis com maior número de compostos identificados na amora-preta. Encontramos flavanóis como as (epi) catequinas, flavonóis como os derivados de quercetina e de kaempferol e duas flavonas, uma derivada da apigenina e outra purascenina. Em relação as antocianinas foram identificadas cinco cianidinas com diferentes ligantes provavelmente ligados na posição 3, pelos dados descritos na literatura (Lee, Dossett, & Finn, 2012).

Constatou-se a redução do teor de mesófilos aeróbios totais encontrados na fruta *in natura* ($4,6 \times 10^2$ UFC/g) para o extrato obtido por MHG ($2,9 \times 10^1$ UFC/mL). Isso ocorre devido aos efeitos de inativação microbiana causada pelo micro-ondas, por isso essa tecnologia é utilizada em processos de pasteurização e esterilização, com a vantagem de que ainda não foram relatadas na literatura a resistência de micro-organismos patogênicos ao aquecimento por micro-ondas (Bozkurt-Cekmer & Davidson, 2016). No extrato foi confirmada a ausência salmonella sp (25 mL) e de coliformes (<10 NMP/mL) no teste presuntivo, mostrando que não possui coliformes totais e nem termotolerantes neste produto. Constatamos assim a baixa contagem de mesófilos totais e a ausência de salmonella, coliformes totais e termotolerantes no produto. Apesar de na legislação brasileira não constar padrões de contagem de mesófilos aeróbios totais para extrato/sucos de frutas (ANVISA, 2001) a maioria dos micro-organismos patogênicos que estão presentes em alimentos são pertencentes ao grupo dos mesófilos (Húngaro et al., 2014), sendo interessante a realização desta análise pois ela é utilizada como um indicador de qualidade dos alimentos (Lavinhas, Almeida, Miguel, Lopes, & Valiente-Mesquita, 2006). Comparado aos limites de quantificação da água (5×10^2) (ANVISA, 2001), os teor de mesófilos totais do extrato de amora-preta é considerado baixo, pois apresentou um ciclo logaritmo a menos que o especificado para essa bebida.

3.4. Composição fenólica das frações do extrato

De modo geral, o teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidantes das frações de extratos obtidos por MHG decrescem significativamente a partir da fração 5 (80 ml de extrato coletado).

Percebemos que os últimos 40 mL do extrato de amora-preta (fração 5 e 6) são responsáveis por apenas 4% da capacidade antioxidante do extrato integral (**Fig. 3.**). Esse resultado já era

esperado, já que nessas duas frações foram encontrados menores teores de todos os compostos fenólicos mensurados (**Tabela S5**).

Observamos que durante a coleta das duas últimas frações o condensador do equipamento ficou límpido, sendo extraídas poucas gotas com coloração vermelha, diferente de como este permanece durante a extração das primeiras frações (1, 2, 3 e 4) em que escoava pelo condensador um extrato vermelho intenso. Isso ocorre porque nas últimas frações (5 e 6) a água que evaporou condensa-se na tampa do recipiente de vidro e volta para o estado líquido, descendo por gravidade nos últimos mL de extrato.

A coloração menos intensa (com maior tendência ao branco e menor tendência ao azul) (**Fig. S3 e tabela S6**), da fração 6 é devido a diminuição da antocianinas, que são os compostos fenólicos majoritários da amora-preta, responsáveis pela coloração vermelha escura da fruta e que são encontradas em pequenas proporções nessa fração. Aos 4:26± 0:11 minutos foi coletada a fração 1, aos 5:51±0:04 a 2, aos 6:07±0:30 a 3, 8:09±0:04 a 4, 9:26±0:13 a 5 e aos 10 minutos a radiação micro-ondas foi desligada e completou-se a coleta da fração 6. Com isso percebemos que para obter um extrato com maior concentração de fenólicos e capacidade antioxidante coletam-se somente os primeiros 80 mL, que são retirados com 8:10 minutos de extração, proporcionando a redução de 2 minutos ao tempo.

3.5. Caracterização do coproduto da extração

Ao final do processo a fruta encontra-se encolhida e deformada no frasco de vidro do MHG, já que a remoção do seu conteúdo líquido é considerável, porém o coproduto da extração também pode apresentar potencial bioativo. No coproduto foram encontradas concentrações consideráveis de antocianinas monoméricas totais (91,12±8,86 mg de cianidina-3-glicosídeo/100 gramas de coproduto), compostos fenólicos totais (641,04±59,42 mg de ácido gálico/100 gramas de coproduto), taninos condensados (51,66±5,11 mg de epicatequina/100 gramas de

coproduto) antocianinas ($119,80 \pm 13,54$ mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 gramas de coproduto), flavanóis ($12,31 \pm 0,63$ mg de epicatequina por 100 gramas de coproduto), de ácidos hidroxicinâmicos ($1,72 \pm 0,16$ mg de ácido clorogênico por 100 gramas de coproduto) e flavonóis ($20,69 \pm 2,05$ mg de quercetina-3-glicosídeo/100 gramas de coproduto), que são responsáveis pela sua elevada capacidade antioxidante ($9325,91 \pm 1369,70$ μmol de trolox/100 gramas de coproduto). Notamos que os compostos fenólicos assim como a capacidade antioxidante foram superiores a da fruta *in natura* (**Tabela S4**) pelo fato de grande parte da água ser removida da fruta, o que resultou na concentração desses compostos. Pela análise microbiológica constatou-se que não há contaminação por mesófilos aeróbios totais (< 10 UFC/g), de salmonella sp /25g de coliformes totais e termotolerantes (< 10 NMP/g), devido ao fato de a fruta ter permanecido 10 minutos em contato com a radiação micro-ondas que levou a eliminação desses micro-organismos. Em virtude dos fatos mencionados nota-se que o coproduto da extração apresenta potencial para ser aplicado em outros alimentos, aumentando o seu teor de compostos fenólicos e assim obedecendo ao quarto princípio da química verde, que prioriza a utilização de coprodutos da extração (Chemat et al., 2012).

3.6. Análise econômica

A avaliação econômica é uma análise importante que contribui com informações valiosas para dar suporte às decisões sobre o processo e para incentivar mais avanços em aplicações comerciais. De fato, esse deve ser tecnológica e economicamente viável. Neste estudo, a avaliação econômica fornece resultados de COM e custos detalhados (**Fig. 4.**) para o processamento de amora-preta em escalas de laboratório ou piloto. Tais parâmetros são as principais respostas avaliadas nessa área (Hatami et al., 2019; Zobot et al., 2018; Johner et al., 2018). Nesse caso, a extração promissora de MHG foi comparada com a extração exaustiva. O COM foi apresentado com base no volume de extrato, massa de ácido gálico (GAE) no

extrato, ou massa de cianidina-3-glicosídeo (CGE) no extrato (**Fig. 4.**). Esses cenários foram avaliados porque a composição dos extratos foi diferente nas extrações exaustivas e MHG, conforme apresentado e discutido nas seções anteriores.

Os valores de COM foram menores para a extração de MHG, contabilizando apenas US \$ 0,25 por 100 mL de extrato ou US \$ 1,99 por cada grama de GAE no extrato. Esses resultados econômicos corroboram os resultados experimentais, cujos compostos fenólicos foram mais concentrados nos extratos de MHG e a capacidade antioxidante foi maior. Os baixos valores de COM para os extratos de MHG também são atribuídos ao tempo de processamento, que foi menor que a extração exaustiva. Conseqüentemente, um extrato mais concentrado pode ser obtido por este método promissor durante um turno diário.

Ao comparar as escalas, a escala piloto apresentou valores menores de COM do que a escala laboratorial. Esse comportamento era esperado porque algumas despesas extras podem ser otimizadas. Por exemplo, o mesmo trabalhador pode operar um equipamento que processa 1 kg/h ou um equipamento que processa 100 kg/h. Naturalmente, um trabalhador adicional pode ser necessário para executar as atividades adicionais (pré-tratamento, armazenamento, etc.) para capacidades maiores. No entanto, um aumento de 100 vezes na capacidade não requer um aumento de 100 vezes no número de trabalhadores. Portanto, a contribuição percentual de COL no COM é reduzida. Neste estudo, o valor do COL estava na faixa de 54,62 a 79,35% para a escala laboratorial e na faixa de 0,95 a 3,19% para a escala piloto (**Fig. 4.**). Não conseguimos encontrar uma avaliação econômica feita para a extração de compostos fenólicos pelo MHG para comparar nossos resultados. Mesmo assim, alguns trabalhos relatados na literatura científica utilizando outros métodos promissores para obter compostos fenólicos de frutas (como extração com fluidos supercríticos) por serem aplicados em áreas relacionadas a

alimentos (Zabot et al., 2017; Viganó et al., 2017) demonstram comportamentos semelhantes em termos de redução de COM aos obtidos neste estudo.

Conforme detalhado na Seção 2.13, os quatro componentes da COM avaliados neste trabalho são CRM, COL, FCI e CUT. Portanto, a influência do aumento de escala nas porcentagens de cada componente é mostrada na Figura 4. O CRM aumentou na escala piloto (até 86,59%) porque um aumento de 100 vezes na capacidade precisa de 100 vezes mais amora. A CUT também aumentou na escala piloto porque o consumo de eletricidade, água e outras utilidades está diretamente relacionado à quantidade de amora processada. Embora o equipamento MHG seja mais caro que o equipamento convencional para extração exaustiva, o FCI não excedeu 1,91% do COM em escala piloto. De fato, o principal ponto a ser negociado é o custo de compra das frutas. Se for significativamente reduzido, o COM também é reduzido significativamente, tornando o processo ainda mais atraente.

4. Conclusão

Este trabalho comprovou a eficiência do MHG para a obtenção de um extrato de amora-preta com maior concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, onde se empregou a potência de 500 W que proporcionou a obtenção do extrato em aproximadamente 10 minutos. Também notamos que o teor de compostos fenólicos assim como a capacidade antioxidante reduzem nas últimas frações obtidas no processo, reduzindo assim o tempo de extração para 8 minutos. O extrato do MHG apresenta baixa contagem de mesófilos totais, ausência de coliformes totais e termotolerantes. O extrato tem elevada capacidade antioxidante e é composto majoritariamente por cinco antocianinas e dezessete compostos fenólicos não antociânicos, dentre os quais foi relatada pela primeira vez a identificação do estilbeno hidroxiresveratrol em extrato de amora-preta. Em comparação à extração exaustiva, o MHG apresentou baixo custo de obtenção do extrato, em termos de custo de fabricação, e

maior concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Além disso, a técnica permite obtenção de um coproduto com potencial de aplicação em alimentos, pois nele encontra-se elevada concentração de compostos fenólicos e não foi encontrada a presença de micro-organismos mesófilos e coliformes totais e termotolerantes. O MHG é um processo de extração sustentável na qual não se adiciona nenhum tipo de solvente e não gera nenhum resíduo, onde as frutas de amora-preta são aproveitadas em sua totalidade. Esses achados apresentam um novo método de extração verde de fenólicos de amora-preta, onde o extrato pode apresentar potencial para a indústria alimentícia, sendo consumido na forma de suco ou aplicado diretamente em outros alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pela concessão de bolsa as três primeiras autoras. Agradecemos a Embrapa Clima Temperado pelo fornecimento das frutas de amoras-pretas utilizadas neste trabalho e apoio dos editais Capes 24/2012 e 11/2009- Pró-equipamentos institucionais. Agradecemos pela infraestrutura do CIDAF da Universidade de Granada/Espanha de responsabilidade do Professor Dr. Antonio Segura Carretero.. Também agradecemos ao Projeto FAPERGS N°17/2551-0000780-8 (Edital 01/2017-ARD), Programa Fipe “Enxoval” CCR (Edital 014/2017 PRPGP/UFSM) e Programa Pibic/CNPq/UFSM (Edital 005/2017) pelo apoio financeiro.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. (2001). Resolução- RDC N° 12, de 02 de Janeiro de 2001.

- American Public Health Association – APHA (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington. 316 p.
- Barcia, M. T., Pertuzatti, P. B., Rodrigues, D., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., & Godoy, H. T. (2014). Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). *Food Research International*, 62, 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.051>
- Bittar, S. Al, Perino-Issartier, S., Dangles, O., & Chemat, F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 141(3), 3268–3272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.134>
- Bochi, V. C., Barcia, M. T., Rodrigues, D., Speroni, C. S., Giusti, M. M., & Godoy, H. T. (2014). Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*, 164(2014), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.031>
- Bozkurt-Cekmer, H., & Davidson, P. M. (2016). *Microwaves for microbial inactivation-efficiency and inactivation kinetics*. *The Microwave Processing of Foods: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100528-6.00011-5>
- Cendres, A., Hoerlé, M., Chemat, F., & Renard, C. M. G. C. (2014). Different compounds are extracted with different time courses from fruits during microwave hydrodiffusion: Examples and possible causes. *Food Chemistry*, 154(May 2015), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.004>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Ekezie, F. G. C., Sun, D. W.; Cheng, J. H. (2017). Acceleration of microwave-assisted Applying, extraction processes of food components by integrating technologies and &, emerging solvents: A review of latest developments. *Trends in Food Science Technology*, 67, 160–172.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (August 2001), 0–13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>

- Gowd, V., Bao, T., & Chen, W. (2018). Antioxidant potential and phenolic profile of blackberry anthocyanin extract followed by human gut microbiota fermentation. *Food Research International*, (866), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.001>
- Green, D., & Perry, R. (2007). Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth ed., McGraw-Hill Education, New York.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Hatami, T., Johner, J. C. F., Zobot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2019). Supercritical fluid extraction assisted by cold pressing from clove buds: Extraction performance, volatile oil composition, and economic evaluation. *Journal of Supercritical Fluids*, 144, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.003>
- Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. V., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 3, 213–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00059-0>
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Marti, N., Saura, D., Valero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Characterization of polyphenols, sugars, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations. *Food Chemistry*, 182, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.008>
- Johner, J. C. F., Hatami, T., Zobot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2018). Kinetic behavior and economic evaluation of supercritical fluid extraction of oil from pequi (*Caryocar brasiliense*) for various grinding times and solvent flow rates. *Journal of Supercritical Fluids*, 140, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.016>
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- Lavinas, F. C., Almeida, N. C., Miguel, M. A., Lopes, M. L., & Valiente-Mesquita, V. L. (2006). Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju in natura armazenado em diferentes condições de estocagem. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(4), 875–883. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400026>
- Leyva-Jiménez, F. J., Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2018). Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from *Lippia citriodora* leaves. *Food Research International*, 109(April), 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.035>

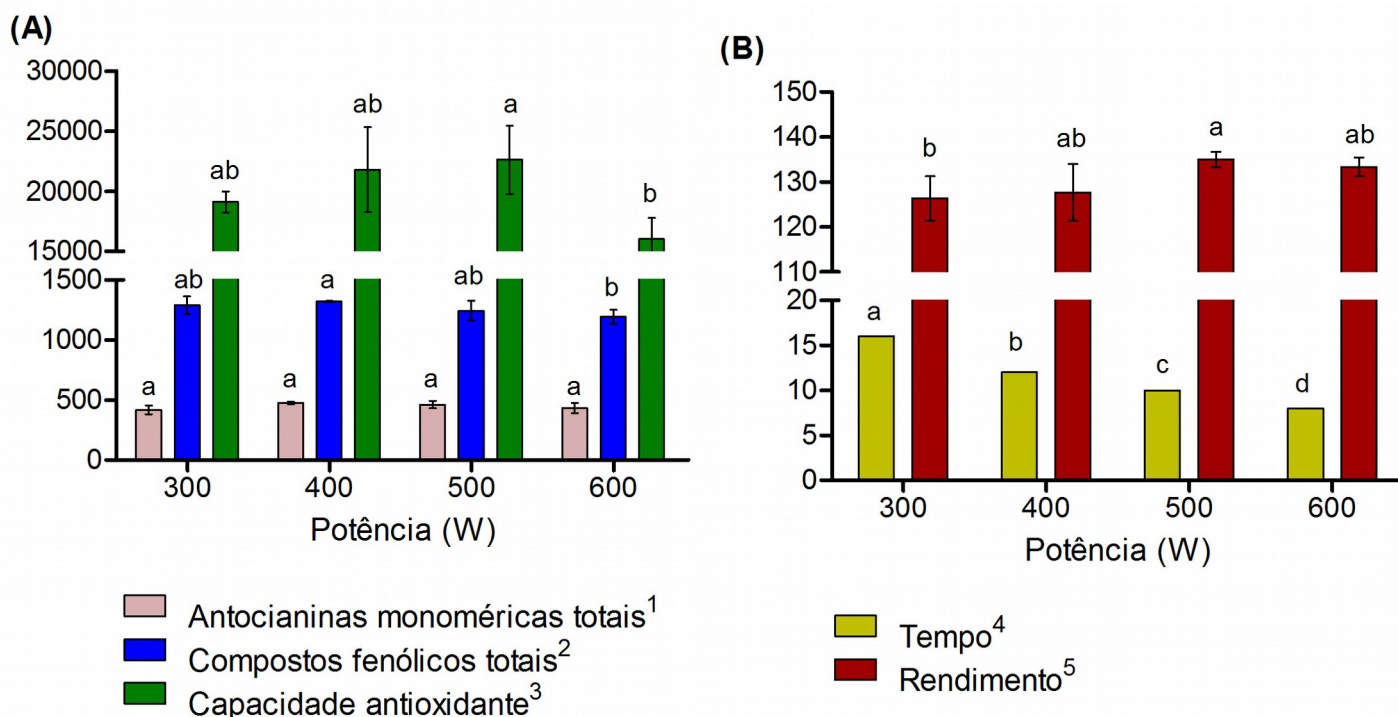
- Machado, A. P. da F. (2014). Extração de compostos bioativos do bagaço da amora-preta (*Rubus spp.*) utilizando líquidos pressurizados. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- Machado, A. P. da F., Rueda, M., Barbero, G. F., Martín, Á., Cocero, M. J., & Martínez, J. (2018). The Journal of Supercritical Fluids Co-precipitation of anthocyanins of the extract obtained from blackberry residues by pressurized antisolvent process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 137(January), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.013>
- Machado, A. P. de F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2014). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus L.*) residues: a comparison with conventional methods. *FRIN*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- Martins, D. de L., & Alvarez, H. M. (2010). Carboxylic acid chlorides as arylating agents in the palladium-catalyzed Heck reaction - The Blaser reaction. *Revista Virtual de Química*, 2(4), 280–297. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100026>
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616–8624. <https://doi.org/10.1021/jf071475d>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Pavlović, A. V., Papetti, A., Zagorac, D. Č. D., Gašić, U. M., Mišić, D. M., Tešić, Ž. L., & Natić, M. M. (2016). Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial Crops and Products*, 87, 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.052>
- Peters, M.S. Timmerhaus, K.D. (1991). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, Fourth ed., McGraw-Hill, Auckland.
- Quatrin, A., Pauletto, R., Maurer, L. H., Minuzzi, N., Nichelle, S. M., Carvalho, J. F. C., ... Emanuelli, T. (2019). Characterization and quantification of tannins, flavanols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: a comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.01.018>
- Reátegui, J. L. P., Machado, A. P. da F., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2014). The Journal of Supercritical Fluids Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus sp.*) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The*

Journal of Supercritical Fluids, 94, 223–233.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.019>

- Sarneckis, C. J., Damberg, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00042.x>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smith, R. (2005). *Chemical Process Design and Integration*, Wiley, Chichester.
- Turton, R., Bailie, R.C., Whiting, W.B., Shaeiwitz, J.A., Bhattacharyya, D. (2012). *Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes*, Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Viganó, J., Zabet, G. L., & Martínez, J. (2017). Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 122, 88-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.006>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Wen, P., Hu, T. G., Linhardt, R. J., Liao, S. T., Wu, H., & Zou, Y. X. (2019). Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology. *Trends in Food Science and Technology*, 83(October 2018), 138–158. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.017>
- Zabet, G. L., Moraes, M. N., & Meireles, M. A. A. (2018). Process integration for producing tocotrienols-rich oil and bixin-rich extract from annatto seeds: A techno-economic approach. *Food and Bioprocess Processing*, 109, 122-138. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.007>
- Zabet, G. L., Bitencourte, I. P., Tres, M. V., & Meireles, M. A. A. (2017). Process intensification for producing powdered extracts rich in bioactive compounds: An economic approach. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 261-273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.10.003>

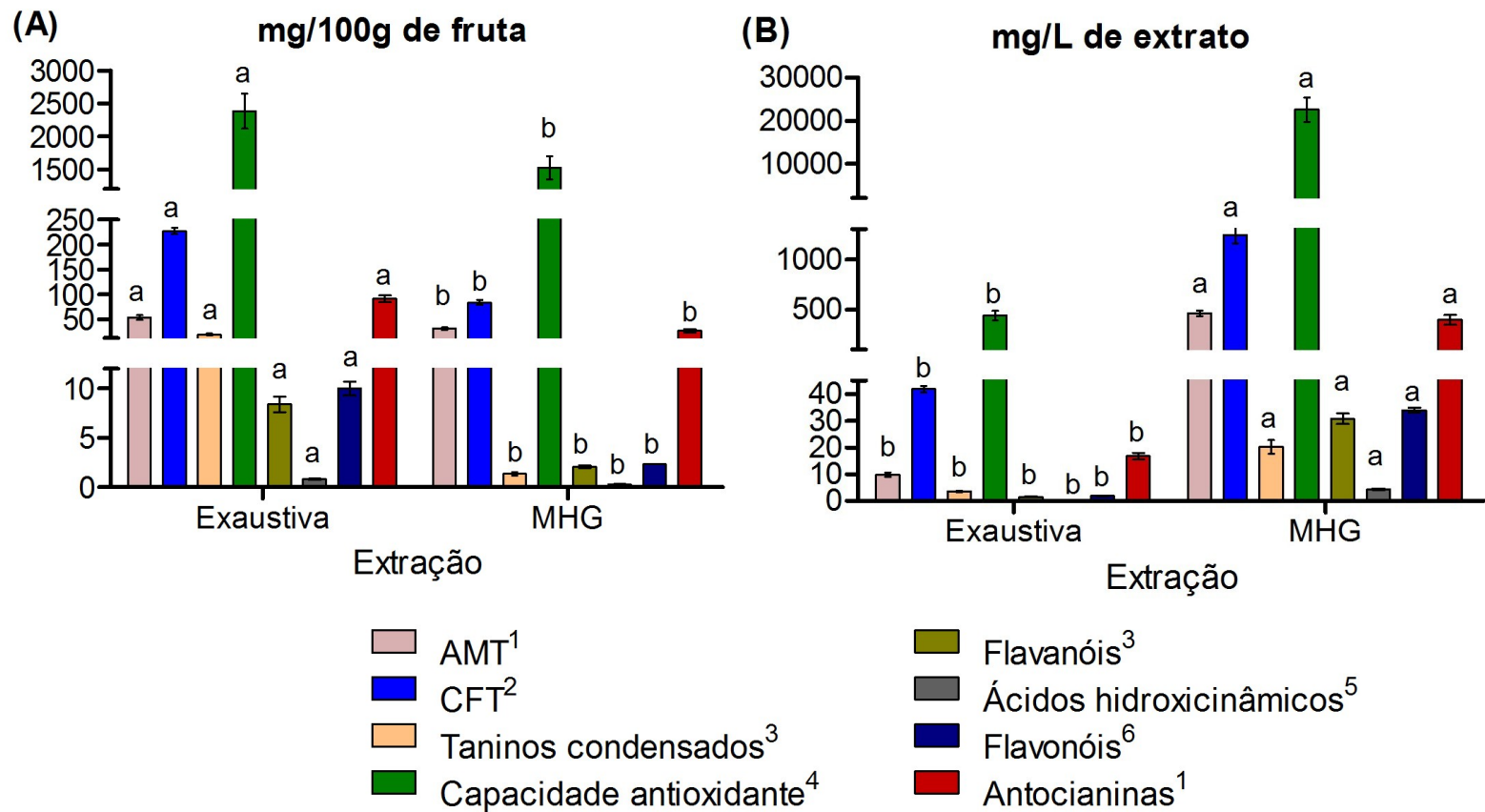
Zhang, X., Chen, F., & Wang, M. (2014). Antioxidant and antiglycation activity of selected dietary polyphenols in a cookie model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1643–1648. <https://doi.org/10.1021/jf4045827>

Zill-e-huma, H. (2010). *Microwave Hydro-diffusion and gravity: a novel technique for antioxidants extraction*



¹mg de cianidina-3-glicosídeo/L de extrato. ²mg de ácido gálico/L de extrato. ³μmol de trolox/L de extrato. ⁴minutos. ⁵mL.

Fig. 1. Antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, tempo de extração e rendimento dos extratos obtidos das diferentes potências otimizadas.



¹mg de cianidina-3-glicosídeo por 100g de fruta ou por L de extrato. ²mg de ácido gálico por 100g de fruta ou por L de extrato. ³µmol de trolox por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁴µg ou mg de epicatequina por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁵mg de quercetina-3-glicosídeo por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁶mg de ácido clorogênico por 100g de fruta ou por L de extrato.

Fig. 2. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante removidos das amoras-pretas pela extração exaustiva e por MHG (A) e compostos fenólicos e capacidade antioxidante de extratos de amora-preta obtidos pela extração exaustiva e por MHG (B).

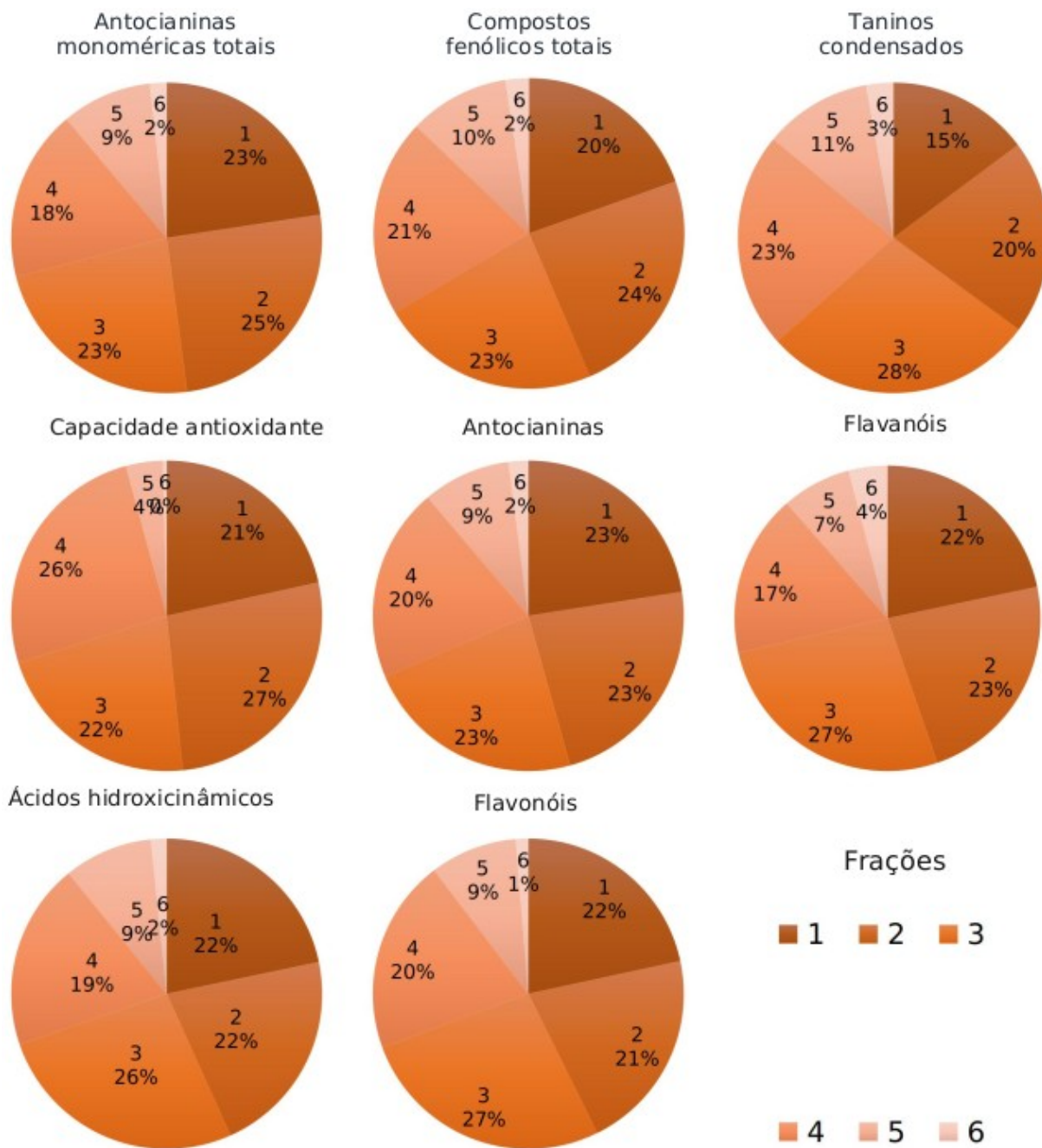


Fig. 3. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frações obtidas por MHG.

Valores expressos em % do extrato total.

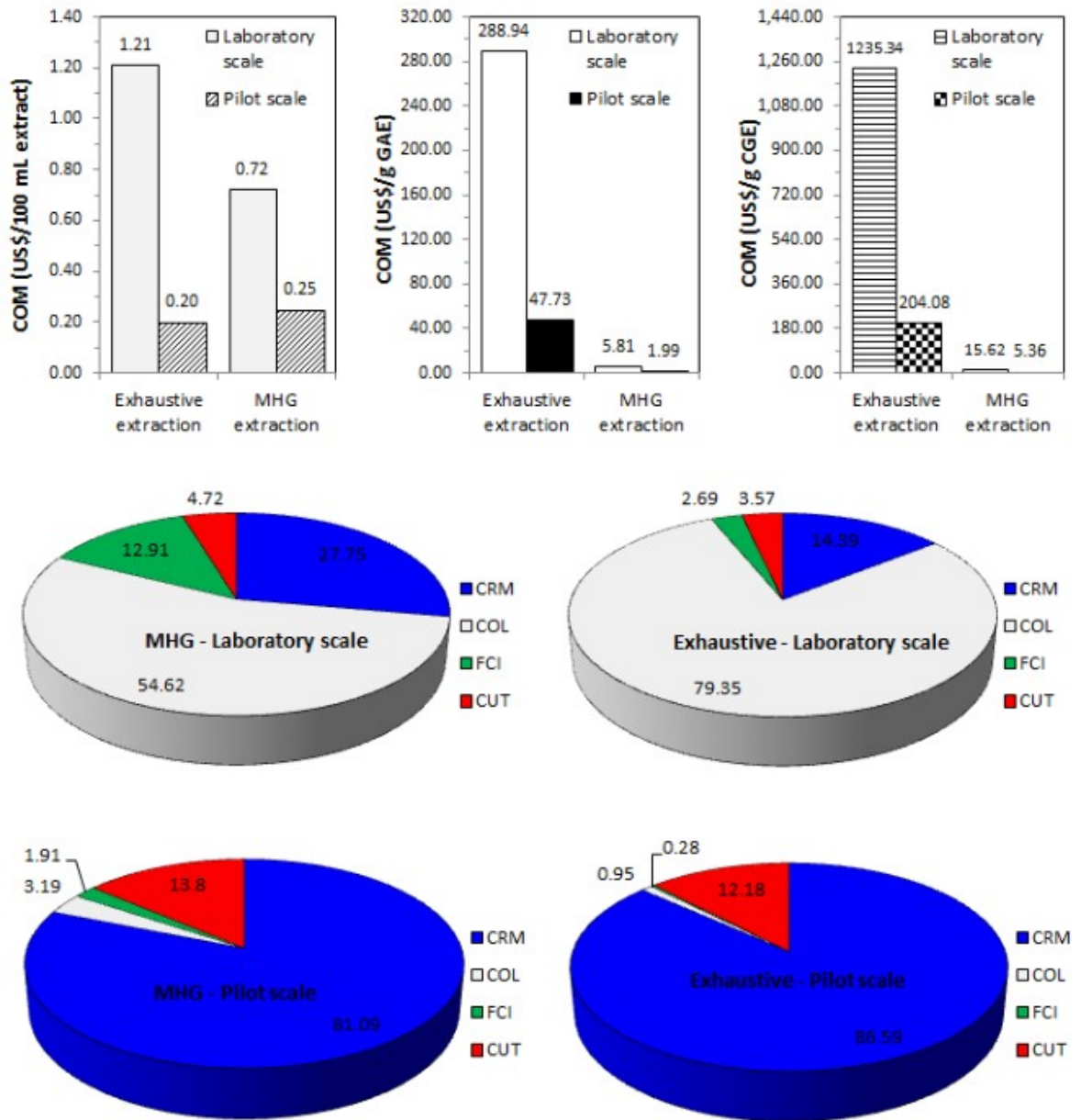


Fig. 4. Custo de fabricação (COM) e percentual de contribuição (%) dos custos detalhados (custo da matéria-prima (CRM), custo de trabalho operacional (COL), investimento de capital fixo (FCI) e custo de utilidades (CUT)) dos extratos obtidos por extração exaustiva (exhaustive) e extração MHG em escala laboratorial (laboratory scale) ou piloto; GAE: ácido gálico equivalente; CGE: equivalente de cianidina-3-glicosídeo.

Tabela 1

Tempo de retenção (TR) e espectros de massas para a tentativa de identificação de compostos fenólicos não antociânicos e antociânicos nos extratos de amora-preta obtidos por MHG.

Compostos fenólicos não antociânicos			
TR (min)	Íon molecular (m/z)	Fórmula molecular	Tentativa de identificação
4,9	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Isômero de ácido clorogênico 2
5,4	353,0878	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	Isômero de ácido clorogênico 3
8,9	513,1461	C ₁₉ H ₂₉ O ₁₆	NI
9,2	243,0617	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	Hidroxi-resveratrol
9,5	180,0666	C ₉ H ₁₀ NO ₄	NI
10,1	331,0671	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	Ácido gálico hexosídeo
14,2	368,0987	C ₁₆ H ₁₈ NO ₉	NI
17,3	341,0878	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Cafeoil hexosídeo
17,9	203,0925	C ₉ H ₁₅ O ₅	NI
18,6	289,0608	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	Catequina
21,0	447,0933	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	Isômero de kaempferol hexosídeo 1
21,2	465,1038	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	Catequina hexuronídeo
21,8	289,0718	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	Epicatequina
22,8	431,1923	C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀	NI
23,3	401,0878	C ₂₀ H ₁₇ O ₉	Apigenina pentosídeo
23,8	461,1664	C ₂₃ H ₂₉ O ₁₀	Purpurascenina
28,1	477,0675	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	Quercetina hexuronídeo
28,2	433,0412	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂	Ácido elágico pentosídeo
28,3	463,0882	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	Quercetina hexosídeo
28,4	609,1461	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Rutina

29,0	607,1305	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₆	Quercetina 3-O-[6''-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-β-D-galactosídeo]
30,0	300,9990	C ₁₅ H ₅ O ₈	Ácido elágico
39,3	503,3378	C ₃ H ₄ O ₆	NI

Compostos fenólicos antociânicos

TR (min)	íon molecular e íon produto (m/z)	Tentativa de identificação
4,847	449-287	Cianidina-3-glicosídeoglicosídeo
4,848	419-287	Cianidina-3-xilosídeo
6,112	595-287	Cianidina-3-rutinosídeo
9,509	535-287	Cianidina-3-malonilglicosídeo
10,686	593-287	Cianidina-3-dioxalilglicosídeo

*Não identificado (NI).

Material Suplementar**Tabela S1**

Custos de base para equipamentos do MHG e extração exaustiva.

Item	M^a	Custo unitário (US\$)^b	Quantidade (un.)	Total de custo (US\$)
Equipamentos – Extração exaustiva				
Mixer	0,59	46,77	1	46,77
Balança	0,60	1318,20	1	1318,20
Agitador	0,49	337,74	1	337,74
Kitassato	0,40	23,52	1	23,52
Bomba de vácuo	0,55	810,22	1	810,22
Alonga de borracha	0,40	5,67	1	5,67
Funil de Büchner	0,40	38,02	1	38,02
Papel filtro	0	0,01	1000	10,00
Total (US\$)				2590,14
Equipamentos - MHG				
Sistema do MHG	0.59	19.072,73	1	19.072,73
Balança	0.60	1.319,81	1	1.319,81
Total MHG (US\$)				20.392,54

^a M constante dependendo do tipo de equipamento, baseado em Green e Perry (2007), Peters e Timmerhaus (1991), Smith (2005) e Turton et al. (2012).

^b Cotação direta para o ano de referência de 2018.

Tabela S2

Dados econômicos de entrada usados para simular o custo de fabricação de extratos de amora-preta obtidos por MHG e extração exaustiva em escalas de laboratório e piloto.

Dados de entrada	Escala laboratorial	Escala piloto	Dimensão
<i>Investimento de capital fixo (FCI)</i>			
Planta exaustiva	2590,14	133.161,25	US\$
Planta MHG	20.392,54	309.595,05	US\$
Taxa de depreciação anual	10	10	%
Taxa de manutenção anual	6	6	%
Vida do projeto	25	25	Ano
Tempo anual trabalhado	2640	7920	h/ano
Tempo diário trabalhado	8	24	h/dia
<i>Custo da matéria-prima (CRM)</i>			
Amora-preta	1,35	1,35	US\$/kg
Acetona	11,21	11,21	US\$/L
Ácido fórmico	17,12	17,12	US\$/L
Água destilada	4,00	4,00	US\$/m ³
<i>Custo do trabalho operacional (COL)</i>			
Salário (com benefícios e administração)	3,20	3,20	US\$/h /trabalhador
Número de trabalhadores por turno	1	2	Trabalhador/ turno
Número de turno diário	1	3	Turno
Salário total diário	24,80	24,80	US\$/dia
<i>Custo de utilidades (CUT)</i>			
Água (para limpeza)	1,07	1,07	US\$/m ³
Eletricidade	0,27	0,27	US\$ kW/h

Tabela S3

Tempo de extração, rendimento, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos de amora-preta obtidos por MHG em diferentes potências.

Potência (Watts)	Tempo (Min)	Rendimento (mL)	Antocianinas monoméricas totais¹	Compostos fenólicos totais²	Capacidade antioxidante³
300	16:13±0:19 ^a	126,33±4,93 ^b	417,98±35,27 ^a	1287,85±74,02 ^{ab}	19114,06±875,68 ^{ab}
400	12:04±0:30 ^b	127,66±6,35 ^{ab}	476,71±8,52 ^a	1319,56±5,74 ^a	21794,82±3530,03 ^{ab}
500	10:10±0:14 ^c	135,00±1,73 ^a	462,47±30,55 ^a	1243,20±84,46 ^{ab}	22620,15±2848,95 ^a
600	8:05±0:02 ^d	133,33±2,08 ^{ab}	433,55±40,39 ^a	1192,66±56,21 ^b	16006,02±1781,78 ^b

¹mg de cianidina-3-glicosídeo/L de extrato. ²mg de ácido gálico/L de extrato. ³µmol de trolox/L de extrato.

Valor médio ± desvio padrão (n = 3). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05). Coeficiente de variação <15%.

Tabela S4

Compostos fenólicos e capacidade antioxidante removidos das amoras-pretas pela extração exaustiva e por MHG e compostos fenólicos e capacidade antioxidante de extratos de amora-preta obtidos pela extração exaustiva e por MHG.

Extração	MHG		Exaustiva	
	mg/100g	mg/L	mg/100g	mg/L
Antocianinas monoméricas totais¹	31,18±2,16 ^B	462,47±30,55 ^a	53,27±4,58 ^A	9,80±0,84 ^b
Compostos fenólicos totais²	83,89±5,34 ^B	1243,20±84,46 ^a	227,41±6,43 ^A	41,85±1,18 ^b
Taninos condensados³	1,36±0,165 ^B	20,23±2,60 ^a	19,48±1,48 ^A	3,58±0,27 ^b
Capacidade antioxidante⁴	1523,64±174,15 ^B	22620,15±2848,95 ^a	2383,96±266,15 ^A	439,06±49,30 ^b
Antocianinas¹	26,92±3,37 ^B	396,43±50,10 ^a	90,98±6,80 ^A	16,74±1,26 ^b
Flavanóis³	2,09±0,14 ^B	34,00±0,78 ^a	227,41±6,43 ^A	1,84±0,13 ^b
Ácidos hidroxicinâmicos⁵	0,30±0,02 ^B	4,39±0,29 ^a	0,81±0,06 ^A	0,15±0,01 ^b
Flavonóis⁶	2,30±0,05 ^B	30,77±2,04 ^a	10,00±0,72 ^A	1,55±0,15 ^b

¹mg de cianidina-3-glicosídeo por 100g de fruta ou por L de extrato. ²mg de ácido gálico por 100g de fruta ou por L de extrato. ³µg de epicatequina por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁴µmol de trolox por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁵mg de quercetina-3-glicosídeo por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁶mg de ácido clorogênico por 100g de fruta ou por L de extrato. ⁷mg de epicatequina por 100g de fruta ou por L de extrato.

Valor médio ± desvio padrão (n = 3). As médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05). As médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05) Coeficiente de variação <15%.

Tabela S5

Compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frações de extratos de amoras-pretas obtidos por MHG.

Fração	Antocianinas monoméricas totais¹	Compostos fenólicos totais²	Taninos condensados³	Capacidade antioxidante⁴	Antocianinas¹	Flavonóis⁵	Ácidos hidroxicinâmicos⁶	Flavanóis³
1	462,96±45,41 ^a	1273,36±124,58 ^{ab}	20,18±2,09 ^{bc}	23029,64±644,04 ^a	493,88±13,48 ^a	38,80±3,70 ^a	4,55±0,43 ^a	39,44±3,86 ^{ab}
2	529,15±30,00 ^a	1563,00±54,56 ^a	28,61±2,02 ^{ab}	28657,15±1429,54 ^a	506,99±33,02 ^a	37,90±3,02 ^a	4,52±0,44 ^a	39,22±0,36 ^{ab}
3	495,07±48,26 ^a	1491,74±144,59 ^a	41,04±2,68 ^a	23257,26±1308,19 ^a	499,10±45,30 ^a	48,22±4,59 ^a	5,56±0,09 ^a	48,45±1,85 ^a
4	376,88±31,30 ^a	1338,46±25,66 ^a	32,12±3,54 ^{ab}	27437,15±1458,67 ^a	442,83±44,33 ^a	36,41±2,08 ^a	4,07±0,09 ^a	31,17±2,28 ^b
5	223,44±5,79 ^b	680,03±53,64 ^{bc}	14,66±1,22 ^{bc}	4090,26±290,90 ^b	201,20±16,48 ^b	16,19±1,49 ^b	1,93±0,11 ^b	13,38±1,12 ^c
6	37,12±3,67 ^c	158,85±8,35 ^c	1,74±0,18 ^c	431,24±9,82 ^b	44,55±3,95 ^b	2,17±0,08 ^b	1,28±0,44 ^b	7,44±0,73 ^c

¹mg de cianidina-3-glicosídeo/L de extrato. ²mg de ácido gálico/L de extrato. ³mg de epicatequina/L de extrato. ⁴μmol de trolox/L de extrato. ⁵mg de quercetina-3-glicosídeo/L de extrato. ⁶mg de ácido clorogênico/L de extrato.

Valor médio ± desvio padrão (n = 3). As médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05). Coeficiente de variação <15%.

Tabela S6

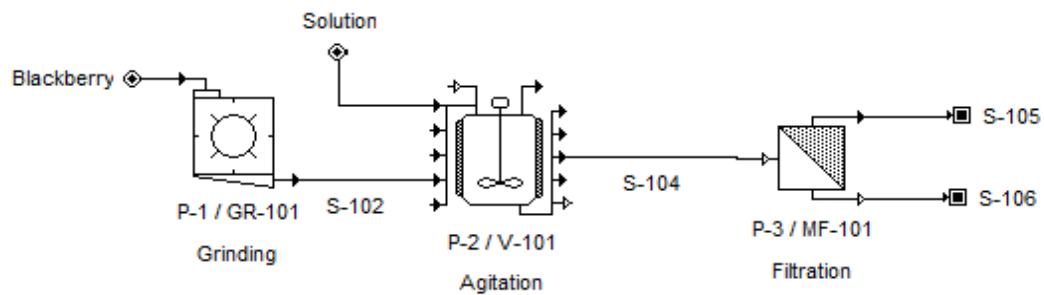
Parâmetros de cor das frações de extratos de amora-preta obtidos por MHG

Fração	L*	a*	b*
1	37,19±0,85 ^b	4,48±0,41 ^b	-1,12±0,09 ^c
2	37,17±0,48 ^b	3,86±0,35 ^b	-0,91±0,09 ^c
3	37,22±0,09 ^b	3,70±0,32 ^b	-0,49±0,03 ^{bc}
4	37,37±0,24 ^b	4,47±0,25 ^b	-0,85±0,05 ^c
5	38,59±0,80 ^b	8,35±0,33 ^b	1,12±0,12 ^b
6	49,44±0,88 ^a	17,51±0,43 ^a	3,63±0,32 ^a

L*: luminosidade; a*: valores positivos indicam tendência ao vermelho e negativo verde; b*: valores positivos indicam tendência ao amarelo e negativo ao azul.

Valor médio ± desvio padrão (n = 3). As médias seguidas de pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação <10%

Extração exaustiva - fluxograma



Extração com MHG - fluxograma

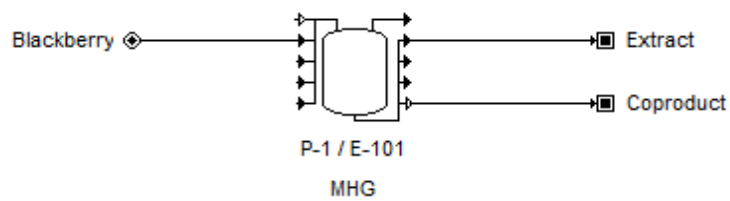


Fig. S1. Fluxograma das extrações exaustiva e por MHG.

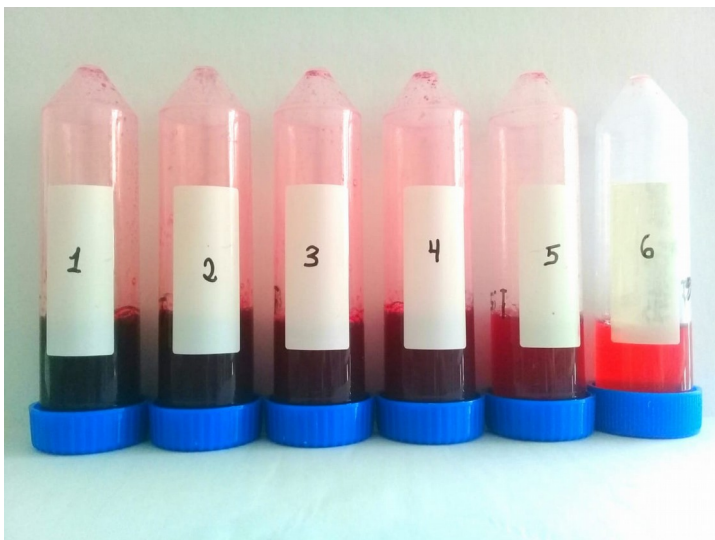
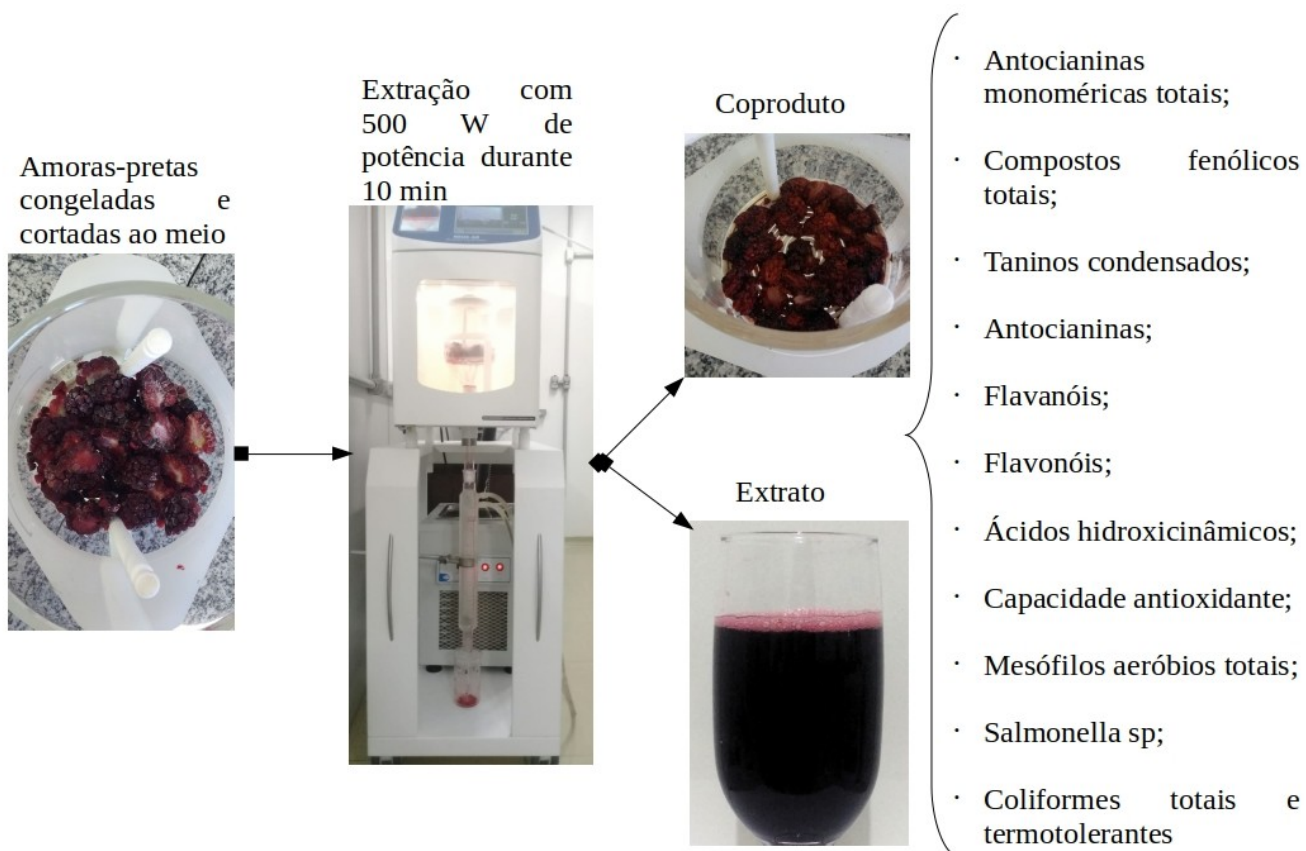


Fig. S2. Diferente frações coletadas com MHG.

Ilustração do processo de MHG



5 DISCUSSÃO GERAL

Ao avaliarmos a composição físico-química e fenólica das quatro diferentes cultivares de amora-preta percebemos que a BRS Xingu apresenta elevada concentração de fibras (5,84%), cinzas (0,37%) e carboidratos (10,63%) e apresenta maior concentração de sólidos solúveis (9,58 °Brix) em comparação com a cultivar Tupy (7,08 °Brix), sendo esse um dos parâmetros principais objetivados pelos desenvolvedores dessa cultivar (EMBRAPA, 2015).

A cultivar BRS Xingu apresentou maior teor de antocianinas (111,38 mg de cianidina-3-glicosídeo /100g) e taninos condensados (27,11 mg epicatequina /100g) do que as cultivares Tupy, Guarani e Xavante, mostrando que essa nova cultivar apresenta maior concentração desses fenólicos do que as cultivares que são comercializadas no Rio Grande do Sul.

Pelo fato de a amora-preta conter nutrientes essenciais para a manutenção da boa saúde como os compostos fenólicos, as fibras alimentares e as cinzas, ressalta-se a importância de se obter mais uma cultivar de amora-preta no mundo, e que apresenta vantagens de maior produtividade. A BRS Xingu não só é uma variedade de amora-preta que possui vantagens agrônomicas como também pode ser explorada por indústrias que retiram pigmentos naturais de frutas para a aplicação como corante natural em alimentos, pois apresenta elevado conteúdo de antocianinas.

Ao conhecermos a composição das frutas de amora-preta percebemos que essas possuem elevadas concentrações de compostos fenólicos, o que nos leva a buscar uma aplicabilidade para esta fruta que apresenta compostos com potencial bioativo, porém apresenta baixa vida de prateleira devido a sua elevada concentração de umidade. Portanto o micro-ondas de hidrodifusão e gravidade foi escolhido para tornar possível a extração e aproveitamento dos compostos fenólicos da amora-preta, porém de modo sustentável.

Ao avaliarmos diferentes potências percebemos que ao empregarmos o processo do MHG a 500 watts consegue-se extrair satisfatoriamente os compostos fenólicos com o menor tempo (10 minutos) de extração sem que seja necessária a adição de nenhum tipo de solvente, sendo que os compostos foram carreados apenas com a água presente na própria fruta. Pela comparação com outras potências verificamos que a potência de 500 watts não diferiu da potência de 400 watts, exceto quanto ao tempo de extração, que foi dois minutos a menos comparada com a de 400 watts.

O estudo das frações proporcionou a redução de 2 minutos no tempo de extração na qual encontramos maior concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante nos primeiros 80 mL de extrato (frações 1, 2, 3 e 4), onde os volumes finais (40 mL: frações 5 e 6) apresentam baixa capacidade antioxidante e compostos fenólicos, sendo que nessas frações se encontram a água da fruta que evaporou durante a extração e condensou-se na tampa do frasco de vidro e escoou por gotejamento. O estudo das frações possibilitou reduzir a extração para oito minutos, obtendo um extrato ainda mais rico em compostos fenólicos e com maior capacidade antioxidante.

O MHG apresentou efeito de diminuição de um ciclo logarítmico no teor de mesófilos aeróbios totais no extrato comparado com a fruta *in natura* e fez com que a fruta (coproduto) após a extração não apresenta-se a presença desses micro-organismos, mostrando que além de extrair os compostos fenólicos esse método também possibilita a redução do número de mesófilos, eliminando a necessidade de tratamento térmico do extrato após a sua obtenção. Também vemos que ambos os produtos resultantes desse processo mostram a ausência de coliformes totais e termotolerantes, parâmetro esses que apresentam as condições sanitárias do alimento.

O coproduto da extração, ainda apresentou elevada concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, além da ausência de mesófilos totais e de coliformes totais e termotolerantes, mostrando que ainda apresenta potencial para a aplicação em outros produtos como na produção de bolos, tortas, barras de cereal e farinha de amora-preta.

Os custos de extração dos compostos fenólicos de amora-preta com o MHG foram mais baixos comparado a extração com solvente orgânico (exaustiva) em termos de custo de fabricação (COM). Para a extração de MHG em escala de laboratório, o COM foi de apenas US \$ 0,72 por 100 mL de extrato. Quando a capacidade foi aumentada 100 vezes (escala piloto), o COM foi reduzido aproximadamente 2,9 vezes, chegando a US \$ 0,25 por 100 mL de extrato.

Além disso o MHG apresenta maior vantagem em relação ao tempo e a geração de resíduo, já que na extração exaustiva o solvente precisa ser retirado para que os compostos fenólicos possam ser aplicados para o consumo humano, além de que esse resíduo químico deve ser tratado adequadamente. Todavia o MHG não utiliza a adição de solventes e o seu coproduto pode ser utilizado para outros fins, gerando mais lucro aos fabricantes do extrato sem causar impacto ambiental.

Para a extração dos compostos fenólicos de amora-preta utilizamos a cultivar Tupy, pelo fato de ela ser a mais cultivada no mundo (SNA, 2017), e tornar possível a reprodução do método por pesquisadores de outros países. Porém observamos que a Tupy é a que apresenta menor quantidade de fenólicos e capacidade antioxidante comparada com as cultivares Guarani, Xavante e BRS Xingu. Como o MHG apresentou eficiência na extração dos compostos fenólicos da cultivar Tupy também pode-se processar extratos com maior capacidade antioxidante, empregando a cultivar Xavante, ou com elevado teor de antocianinas e taninos condensados utilizando a BRS Xingu. Contudo o plantio dessas cultivares deve ser incentivado para que possam ser empregadas para a obtenção de extratos ainda mais concentrados em compostos fenólicos e com maior capacidade antioxidante.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta uma nova cultivar de amora-preta, a BRS Xingu, a qual apresenta elevadas concentrações de compostos fenólicos e carboidratos, incluindo fibras alimentares. Foram identificados dentre os compostos fenólicos cinco antocianinas, cinco ácidos fenólicos e dez flavonoides não antociânicos. A BRS Xingu se destaca entre cultivares já comercializadas no Rio Grande do Sul pela sua elevada concentração de antocianinas e taninos condensados, e possui capacidade antioxidante semelhante a da cultivar Guarani.

Ao testarmos diferentes potências utilizando o processo sustentável MHG verificamos que é possível obter um extrato com maior concentração de composto fenólicos com o menor tempo de extração empregando a potência de 500 watts durante 10 minutos. Esse processo apresenta eficiência positiva comparado ao método de extração exaustiva que utiliza solvente orgânico, pois com o MHG consegue-se um extrato mais concentrado em compostos fenólicos o que lhe confere capacidade antioxidante 50 vezes superior ao extrato do método exaustivo. Também notamos que o teor de fenólicos e a capacidade antioxidante reduzem significativamente nas últimas frações obtidas no processo, onde a redução da capacidade antioxidante foi de aproximadamente 5,6 vezes para a fração 5 e de 53,4 vezes na fração 6. Isso demonstra que o processo de MHG pode ser realizado com o tempo total de 8 minutos e mantendo a eficiência na extração dos compostos fenólicos.

O extrato do MHG apresenta baixa contagem de mesófilos totais, ausência de coliformes totais e termotolerantes. Nele encontramos elevada capacidade antioxidante, devido ao seu conteúdo fenólico sendo composto majoritariamente por cinco antocianinas, e também apresenta outros dezessete compostos fenólicos não antociânicos. Além do mais, apresentou baixo custo de obtenção do extrato, comparado a extração com solvente orgânico em termos de custo de fabricação.

Além disso o coproduto da extração pode ser utilizado em outros alimentos, pois nele encontra-se elevada concentração de compostos fenólicos e a ausência de micro-organismos mesófilos e de coliformes, tanto totais como termotolerantes. Esse processo de extração se enquadra na química verde, por não necessitar de nenhum tipo de solvente e não produzir resíduos químicos e orgânicos, pois consegue-se aproveitar toda a fruta (extrato e coproduto).

Sendo assim este trabalho colaborou para se obter maior conhecimento da composição de amoras-pretas e demonstra a composição de uma nova cultivar a ser popularizada no mercado internacional, e apresenta o processo do MHG, que é eficientemente rápido, econômico e ecológico para a extração de compostos fenólicos de amora-preta que apresentam potencial bioativo.

REFERÊNCIAS

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01–09, 2007.
- ALAM, N. et al. e BRISTI. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 11, p. 143–153, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>>.
- ANGOY, A. et al. Development of microwave-assisted dynamic extraction by combination with centrifugal force for polyphenols extraction from lettuce. **LWT**, v. 98, p. 283–290, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.059>>.
- 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. et al. Produção de amora-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 100–111, 2014.
- ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE NUTRIÇÃO (APN). **Colher Saber**, 2017. Porto, Portugal. Disponível em: <http://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/AW_EBook_ColherSaber.pdf>.
- ASSAMI, K. et al. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 62, p. 99–105, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.09.003>>.
- BADRI, W. et al. Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 234–242, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.022>>.
- BARCIA, M. T. et al. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE Determination by HPLC of ascorbic acid and tocopherols in fruits. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 381–390, 2010.
- BARCIA, M. T. et al. Vinification By-products and Their Phenolic Compounds. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4A, p. 18–23, 2015. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/ajfst/3/4A/4>>.
- BENMOUSSA, H. et al. Enhanced solvent-free microwave extraction of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil seeds using double walled reactor. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.010>>.
- BENMOUSSA, H. et al. Microwave hydrodiffusion and gravity for rapid extraction of essential oil from Tunisian cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds: Optimization by response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 633–642, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.036>>.

BESOMBES, C. et al. Instant controlled pressure drop extraction of lavender essential oils: Fundamentals and experimental studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 44, p. 6807–6815, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.050>>.

BINELLO, A. et al. **Effect of microwaves on the in situ hydrodistillation of four different Lamiaceae. Comptes Rendus Chimie**, v. 17, n. 3, p. 181–186, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.007>>.

BITTAR, S. A. et al. An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3268–3272, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.134>>.

BOUKROUFA, M. et al. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 72–79, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.015>>.

BOUSBIA, N. et al. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 3, p. 409–413, 2009.

BOUSBIA, N. et al. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 355–362, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106>>.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2003. 207 p.

CELEP, E. et al. Influence of extraction method on enzyme inhibition, phenolic profile and antioxidant capacity of *Sideritis trojana* Bornm. **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 360–365, 2019.

CHANIOTI, S.; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 48, p. 228–239, 2018.

CENDRES, A. et al. An innovative process for extraction of fruit juice using microwave heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1035–1041, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.028>>.

CENDRES, A. et al. Comparison between microwave hydrodiffusion and pressing for plum juice extraction. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 229–237, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.027>>.

CENDRES, A. et al. Different compounds are extracted with different time courses from fruits during microwave hydrodiffusion: Examples and possible causes. **Food Chemistry**, v. 154, p. 179–186, 2014.

CHIM, J F. **Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus sp.*) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e light**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade de Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2008.

CHUNG K.T. et al. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds, *Lett. Appl. Microbiol.* v. 17, p. 29–32, 1993.

CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76–93, 2018.

CRISTÓBAL, J. et al. Techno-economic and profitability analysis of food waste biorefineries at European level. **Bioresource Technology**, v. 259, n. January, p. 244–252, 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cultivar de amoreira preta BRS Xingu**, 2015.

EKEZIE, F. G. C. et al. Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 160-172, 2017.

ERŞAN, Sevcan et al. Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. **Food Chemistry**, v. 253, p. 46–54, 2018.

FARHAT, A. et al. A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 47, p. 7345–7350, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.062>>.

FARHAT, A. et al. Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy. Experimental and theoretical study. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 26, p. 5077–5085, 2009.

FERREIRA, S. S. et al. Microwave assisted dehydration of broccoli by-products and simultaneous extraction of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 386–393, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.053>>.

FERREIRA, V. B. et al. Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Organic Vegetables Consumed in Brazil. **Food Nutri Sci** n. 6, p. 798–804, 2015.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GIACOMETTI, J. et al. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. **Food Research International**, v. 113,, p. 245–262, 2018.

GONDIM, J. A. M. et al. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v. 25, n. 4, p. 825–827, 2005.

GONZÁLEZ-RIVERA, J. et al. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 308–318, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.011>>.

GOWD, et al. Antioxidant potential and phenolic profile of blackberry anthocyanin extract followed by human gut microbiota fermentation. **Food Research International**, n. 866, p. 0–1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.001>>.

GYAMFI, M. A.; Aniya, Y. Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea. **Biochem. Pharmacol**, v. 63, p. 1725–1737, 2002.

HARASYM, J.; OLEDZKI, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 511–517, 2014.

HIRSCH, G. E. et al. Physicochemical characterization of blackberry from the Southern Region of Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.942-947, 2012.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ (IAPAR). Pesquisa mostra que amora-preta é boa opção para regiões mais frias do Estado, 2015. Disponível em <<http://www.iapar.br/2015/08/1781/Pesquisa-mostra-que-amora-preta-e-boa-opcao-para-regioes-mais-frias-do-Estado.html>>. Acesso em 27 out. 2017.

JACOTET-NAVARRO, M. et al. Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. **Green Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 3106–3115, 2016.

JACQUES, A. C. et al. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720–1725, 2010.

JACQUES, A. C. et al. Nota científica: compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do estado do rio grande do sul. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 123–127, 2009. Disponível em: <<http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/html/busca/PDF/v12n2371a.pdf>>.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 245-260, jan./mar. 2011.

KADERIDES, K. et al. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 137, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270118314363>>.

KAUME, L. et al. The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5716–5727, 2012.

KAZEMI, M. et al. Pistachio green hull pectin: Optimization of microwave-assisted extraction and evaluation of its physicochemical, structural and functional properties. **Food Chemistry**, v. 271, p. 663–672, 2019.

LEE, et al. Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 785–796, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.022>>.

LAMEIRO, M. G. S. **Fitoquímicos e atividade metabólica de extratos de amora-preta (Rubus sp.) e de mirtilo (Vaccinium sp.) em ratos**. 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2012.

LATULIPPE, M. E. et al. ILSI Brazil International Workshop on Functional Foods: A narrative review of the scientific evidence in the area of carbohydrates, microbiome, and health. **Food and Nutrition Research**, v. 57, 2013.

LIMA, K. P. **Produção De Vinagre Como Estratégia De Aproveitamento Tecnológico Da Amora-Preta: Avaliação Do Processo Submerso E Do Processo Lento**. 2014. 120 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, PR, 2014.

LÓPEZ-HORTAS, L. et al. Microwave hydrodiffusion and gravity (MHG) processing of *Laminaria ochroleuca* brown seaweed. **Journal of Cleaner Production**, v. 197, p. 1108–1116, 2018.

LÓPEZ-HORTAS, L. et al. Flowers of *Ulex europaeus* L.-Comparing two extraction techniques (MHG and distillation). **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 6, p. 718–725, 2016.

LÓPEZ-HORTAS, L. et al. Valorisation of edible brown seaweeds by the recovery of bioactive compounds from aqueous phase using MHG to develop innovative hydrogels. **Process Biochemistry**, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511318317021>>.

MEINI, M. R. et al. Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. **Food Chemistry**, v. 283, p. 257–264, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619301050>>.

MEMARZADEH, S. M, et al. Chemical composition and yield of essential oils from Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) under different extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 809–816, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.068>>.

MERTZ, C. et al. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8616–8624, 2007.

MICHEL, T. et al.. Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1380–1386, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.112>>.

MIKULIC-PETKOVSEK, M. et al. Do optimally ripe blackberries contain the highest levels of metabolites? **Food Chemistry**, v. 215, p. 41–49, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.144>>.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503–515, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. World Health Organization. 2015. Disponível em: <<https://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en>>.

OKOH, O. O. et al. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 308–312, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.084>>.

PAGOT, E. Cresce o consumo de amora-preta. Disponível em: <<http://www.avindima.com.br/?p=9176>>. Acesso em 11 fevo. 2019.

PARADA, M, et al. Sequential extraction of *Hericium erinaceus* using green solvents. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 397–404, 2015.

PÉREZ, L. et al.. Microwave hydrodiffusion and gravity processing of *Sargassum muticum*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 981–988, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.020>>.

PÉRINO-ISSARTIER, S. et al. A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1305, p. 41–47, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.024>>.

- PÉRINO, S.e et al. Laboratory to pilot scale: Microwave extraction for polyphenols lettuce. **Food Chemistry**, v. 204, p. 108–114, 2016.
- RAZZAGHI, S. E. et al. Operational efficiencies of six microwave based extraction methods for orange peel oil. **Journal of Food Engineering**, v. 241, p. 26–32, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.018>>.
- RIBEIRO-SANTOS, R. et al. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 355–368, 2015.
- ROCCHETTI, G. et al. Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves. **Food Research International**, v. 115, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.046>>.
- RODRÍGUEZ-SEOANE, P. et al. **Innovative technologies for the extraction of saccharidic and phenolic fractions from *Pleurotus eryngii***. **LWT**, v. 101, p. 774–782, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.062>>.
- SANTOS, A. M. et al. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta**. 2004.
- SANTOS, S. T. **Caracterização De Genótipos De Amoreira-Preta (*Rubus Spp*) na Condição Edafoclimática De Curitiba-SC**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba, Graduação em Agronomia, Curitiba, SC, 2018.
- SARNECKIS, C. J. et al. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 12, n. 1, p. 39–49, 2006.
- SERESHTI, H. et al. Optimized ultrasonic assisted extraction-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography for determination of essential oil of *Oliveria decumbens* vent. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 29, p. 4593–4598, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.037>>.
- SERRANO, J. et al. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 2, p. 310–329, 2009.
- SINGAL, P. K. et al. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. **Cardiovasc. Res.**, v. 40, p. 426–432 1998.
- SIXT, M. et al. Process design for integration of extraction, purification and formulation with alternative solvent concepts. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 6, p. 733–748, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2015.12.016>>.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA (SNA). **Amora-preta: nova cultivar é fonte de saúde e renda**. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/amora-preta-nova-cultivar-e-fonte-de-saude-e-renda/>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

SONG, W. et al. A fast, simple and green method for the extraction of carbamate pesticides from rice by microwave assisted steam extraction coupled with solid phase extraction. **Food Chemistry**, v. 143, p. 192–198, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.101>>.

SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.125>>.

SUI, X. et al. **Anthocyanins in Food.: Encyclopedia of Food Chemistry: Elsevier**, p. 10-17 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21669-7>>.

TAKECHI, M. et al. Structure and antihypertensive activity among the Tannins. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2245–2250, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Artmed, 2006. 643 p.

TÜMEN, İ. et al. Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 235–246, 2018.

TURK, M. et al. Alternative process for strawberry juice processing: Microwave hydrodiffusion and gravity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 626–633, 2017.

VAN DE VELDE, F. et al. Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 82–91, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.01.008>>.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T. **Plant polyphenols: Recent advances in epidemiological research and other studies on cancer prevention**. 1. ed. 2013. v. 39. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62615-8.00008-4>>.

VIAN, M. A. et al. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, n. 1–2, p. 14–17, 2008.

VINATORU, M. et al. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 159–178, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>>.

YU, C. L.; SWAMINATHAN, B. Mutagenicity of proanthocyanidins. **Food Chem. Toxicol.** v. 25, p. 135–139, 1987.

ZILL-E-HUMA et al. A novel idea in food extraction field: Study of vacuum microwave hydrodiffusion technique for by-products extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 2, p. 351–360, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.045>>.

ZILL-E-HUMA et al. A remarkable influence of microwave extraction: Enhancement of antioxidant activity of extracted onion varieties. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1472–1480, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.112>>.

ZILL-E-HUMA et al. Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7700–7707, 2009.

ZUCOLOTO, M. et al. **Fruticultura Tropical : Diversificação e consolidação**. Alegre, ES: CAUFES, 2015. 186 p.