

BÁRBARA AVANCINI TEIXEIRA

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE
ANTOCIANINAS E FENÓLICOS TOTAIS DE FRUTAS VERMELHAS
PRODUZIDAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Teixeira, Bárbara Avancini, 1989-

T266o
2018

Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas e fenólicos totais de frutas vermelhas produzidas no Brasil / Bárbara Avancini Teixeira. – Viçosa, MG, 2018. xi, 45 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Paulo César Stringheta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-43.

1. Extração (Química). 2. Otimização combinatória.
3. Antocianinas. 4. Fenóis. 5. Amora. 6. Mirtilo. 7. Morango.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.022

BÁRBARA AVANCINI TEIXEIRA

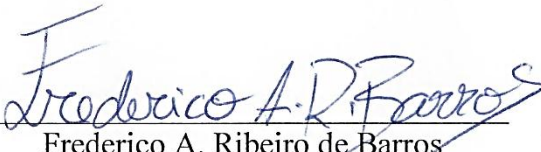
**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE
ANTOCIANINAS E FENÓLICOS TOTAIS DE FRUTAS VERMELHAS
PRODUZIDAS NO BRASIL**

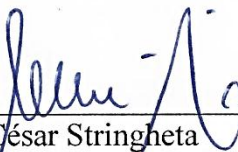
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de abril de 2018.


Juliana de Cássia Gomes Rocha


José Benício Paes Chaves


Frederico A. Ribeiro de Barros
(Coorientador)


Paulo César Stringheta
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e por toda orientação e direcionamento, pois nunca tive sorte, mas sempre tive Deus.

Agradeço a minha mãe Rosa, por ter me trazido a este mundo, e ser meu exemplo de mulher forte, de garra e que sabe lutar pelos seus objetivos, agradeço de forma ainda mais especial por ter tornado os meus sonhos os seus sonhos, e por ter me apoiado em todas as escolhas que fiz. Agradeço aos meus irmãos Rodrigo e Fernanda, por todo apoio e força, aos meus cunhados, Livia e Lourenço, além das minhas sobrinhas-cachorrinhas Suki e Nina. Agradeço aos meus avós Edma e Maurício, e meus tantos tios e tias, primos e primas, que fazem parte da Família Avancini, que são as minhas raízes, minha base forte para enfrentar as batalhas da vida.

Agradeço ao meu orientador professor Paulo César Stringheta, por ser uma fonte inesgotável de inspiração. Agradeço toda orientação, grandes ideias, motivação e brincadeiras.

Agradeço ao meu co-orientador professor Frederico Barros, por toda paciência em me auxiliar na execução e montagem do meu trabalho.

Agradeço ao professor José Benício Paes Chaves, pelo dom de ensinar com carinho, e por ter tornado toda a estatística e modelagem de experimentos um assunto fascinante para mim.

Agradeço a Juliana de Cássia Gomes Rocha, que me ajudou nos primeiros passos desta presente pesquisa, e me auxiliou ao longo dela, com toda a atenção.

Agradeço aos meus amigos do LaCBio (o melhor laboratório/grupo de pesquisa da UFV), que se tornaram a minha família aqui em Viçosa nesses dois anos, de forma especial a Eliana, Mariane, Mariana, Danielle, Jeferson, Elder, Kéllen, Thais Rigolon, Amanda, Rita, Thais Lessa, Luciana, Maria Helena e Victor. Obrigada por me aturarem, pelas segundas a sextas de maldade, e por me ensinarem muito sobre pesquisa e sobre a amizade. Agradeço também aos meus estagiários, Harícia, Rariel e Matheus.

Agradeço a Adeline, por ter me ajudado, disponibilizando um espectro para minhas análises.

Agradeço a República das Divas, por terem me acolhido e ter se tornado meu lar em Viçosa, as antigas e atuais moradoras, Alana, Aline, Alejandra, Gabriela,

Angela, Mônica, Camila e Jéssica, além do nosso morador ilustre, nosso mascote, Hércules.

Agradeço também aos meus professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Cristiane, Sandra e José Lucena, por acreditarem no meu potencial na pesquisa acadêmica, e torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço as amigos-irmãos que fiz ao longo da vida, e que me ajudaram a chegar até aqui, Shayane, Lysa, Juliana, Adriana, Alice, Tiago, Leandro, Aline, Fernando, Marcus, Marcela, Michelle, Teco e Juliana.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino público, gratuito e de qualidade, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, e a Cnpq, pela bolsa de estudos.

Enfim, peço desculpas se esqueci de alguém. Pois jamais teria chegado aqui sozinha. Termino meus agradecimentos com um Sutra Zen Budista que resume os meus sentimentos na conclusão de mais esta etapa “ Ide, ide, ide juntos, mais além do mais além, até a realização última”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Frutas vermelhas	4
3.1.1. Amoras-pretas.....	5
3.1.2. Mirtilo	6
3.1.3. Morango.....	7
3.2. Compostos fenólicos.....	8
3.3. Antocianinas	9
3.4. Métodos de extração	11
3.5. Extração assistida por ultrassom.....	12
3.6. Metodologia estatística	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Matéria-prima	17
4.2. Otimização da extração assistida por ultrassom	17
4.2.1. Preparo das amostras	17
4.2.2. Extração assistida por ultrassom (EAU).....	17
4.2.3. Delineamento experimental	18
4.3. Caracterização química dos extratos fenólicos.....	21
4.3.1. Antocianinas totais - pH único	21
4.3.2. Fenólicos totais	21
4.4. Estudo comparativo da eficiência da extração.....	22
4.4.1. Extração assistida por ultrassom otimizada.....	22
4.4.2. Extração convencional.....	22
4.5. Análises estatísticas	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Otimização da extração assistida por ultrassom	24
5.2. Estudo comparativo das extrações.....	37
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO A	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antocianidinas naturais e grupos substituintes nas antocianinas	9
Tabela 2. Condições otimizadas de EAU em função do conteúdo de antocianinas totais e/ou fenólicos totais.....	15
Tabela 3. Modelo experimental dos níveis das variáveis selecionadas.....	18
Tabela 4. Matriz do modelo do DBB com três variáveis independentes expressas em unidades codificadas e natural.	19
Tabela 5. Análise de regressão do DBB para antocianinas totais (mg/100 g de fruto).....	24
Tabela 6. Análise de regressão do DBB para fenólico totais (mg EAG/100 g de fruto). .	25
Tabela A 1. Respostas de AT (mg/100 g de fruto) e FT (mg EAG/100 g de fruto) dos extratos das três frutas estudadas.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amoras-pretas (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).	5
Figura 2. Mirtilos (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).	6
Figura 3. Morangos (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).	7
Figura 4. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).	8
Figura 5. Estrutura básica de uma antocianina (cátion <i>flavylium</i>)	9
Figura 6. Transformações estruturais das antocianinas existentes em uma solução em equilíbrio (FRANCIS, 1982).	10
Figura 7. Esquema básico de um sistema ultrassônico.	12
Figura 8. A bolha de cavitação é gerada perto da superfície do material (a), durante o ciclo de compressão, esta bolha colapsa (b), originando um micro jato direcionado para superfície da matriz (b e c). A alta pressão e temperatura envolvida no processo destrói as paredes celulares da matriz vegetal e seu conteúdo será liberado no meio (d) (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).	13
Figura 9. Observação microscópica de uma glândula de óleo essencial de manjeriço. 1) controle/intacta, 2) após maceração e 3) após EAU (US reator 25 kHz) (CHEMAT et al., 2017; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).	13
Figura 10. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de antocianinas totais (mg/100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X0 – frequência (kHz) e X1 – tempo (min)..	26
Figura 11. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de fenólicos totais (mg EAG /100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X0 – frequência (kHz) e X1 – tempo (min).	27
Figura 12. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de fenólicos totais (mg EAG /100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X2 – temperatura (°C) e X1 – tempo (min).	28
Figura 13. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de antocianinas totais (mg/100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (%W), X0 – frequência (kHz).	29
Figura 14. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de fenólicos totais (mg EAG /100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (%W), X0 – frequência (kHz).	30
Figura 15. Mecanismo de degradação térmica da delfinidina, cianidina e pelargonidina, adaptado de Sinela et al. (2017)	31
Figura 16. Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais de amoras-pretas (AT (mg/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).	34
Figura 17. Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais de mirtilos (AT (mg/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).	34
Figura 18. Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais de morangos (AT (mg/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).	35

Figura 19. Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais de amoras-pretas (FT (mg EAG/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).	36
Figura 20. Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais de mirtilos (FT (mg EAG/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).	36
Figura 21. Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais de morangos (FT (mg EAG/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).	37
Figura 22. Comparação da EAU e extração convencional sobre os conteúdos de antocianinas totais (mg/100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango. Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Duncan.....	38
Figura 23. Comparação da EAU e extração convencional sobre os conteúdos de fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango. Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Duncan.	38
Figura 24. Aumento do rendimento da extração assistida por ultrassom, quando comparada a extração convencional. A) Nos conteúdos de antocianinas totais (mg /100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango. B) Nos conteúdos de fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango.	39

RESUMO

TEIXEIRA, Bárbara Avancini, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas e fenólicos totais de frutas vermelhas produzidas no Brasil.** Orientador: Paulo César Stringheta. Co-orientador: Frederico A. Ribeiro de Barros.

A extração assistida por ultrassom (EAU) de antocianinas e compostos fenólicos de amoras-pretas, mirtilo e morango foi otimizada neste estudo. Duas frequências (25 e 45 kHz) foram aplicadas em um delineamento em Box-Behnken para investigar o efeito de três variáveis no processo de extração, nomeadas, tempo (5 a 75 min), temperatura (30 a 70 °C) e amplitude do poder ultrassônico (10 a 90 % W), totalizando 34 unidades experimentais para cada fruto em estudo. Os resultados mostraram que para a variável dependente antocianinas totais, a condição ótima para o amoras-pretas pode ser alcançado na frequência de 45 kHz, no tempo de 5 min, na temperatura de 60°C e na amplitude de 10 %W, no extrato de mirtilo o ponto ótimo é alcançado em 45 kHz, 75 min, 30 °C e 90 %W, para o extrato de morango o ponto ótimo é alcançado em 45 kHz, 75 min, 70 °C e 10 %W. Essas condições predizem um conteúdo de 49,133 mg, 260,49 mg e 4,5805 mg de antocianinas totais por 100 g de fruto, para amora-preta, mirtilo e morango, respectivamente. Os resultados experimentais mostraram um conteúdo de 48,320 mg, 263,19 mg e 4,055 mg de antocianinas totais por 100 g de fruto, para amora-preta, mirtilo e morango, respectivamente. Para fenólicos totais, a combinação simultânea ótima das variáveis estudadas foram a frequência de 25 kHz, no tempo de 75 min, na temperatura de 70°C e na amplitude de 90 %W, para ambas as frutas, predizendo um conteúdo de 409,99 mg, 962,09 mg e 284,18 mg de EAG /100 g de fruto, para o extrato de amora-preta, mirtilo e morango, respectivamente. Foram observados os valores experimentais de 464,74 mg, 979,15 mg e de 291,04 mg EAG /100 g do fruto, para os conteúdos de fenólicos totais de amora-preta, mirtilo e morango, respectivamente. Ao comparar a EAU e a extração convencional, observou-se que a EAU aumentou o rendimento da extração de antocianinas totais de forma significativa ($p < 0,05$) de amoras-pretas, mirtilos e morangos, com valores de 48,320 mg, 263,19 mg e 4,055 mg / 100 g de fruto respectivamente, quando comparados com 30,78 mg, 228,28 mg e 2,099 mg / 100 g de fruto respectivamente, obtidos pela extração convencional. De forma similar a EAU aumentou o rendimento da extração de fenólicos totais de forma significativa ($p < 0,05$) de amoras-pretas, mirtilos e morangos, com valores de 464,74 mg, 979,15 mg e de 291,04 mg EAG/ 100 g de fruto

respectivamente, quando comparados com 198,93 mg, 418,37 mg e 192,03 mg EAG/100 g de fruto respectivamente, obtidos pela extração convencional. O estudo indica que a EAU é uma metodologia eficiente para a recuperação de compostos fenólicos a partir das frutas vermelhas.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Bárbara Avancini, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2018. **Optimization of ultrasonic assisted extraction of total anthocyanins and phenolics of berries produced in Brazil.** Adviser: Paulo César Stringheta. Co-adviser: Frederico A. Ribeiro de Barros.

Ultrasound assisted extraction (UAE) of anthocyanins and phenolic compounds of blackberry, blueberry and strawberry was optimized in this study. Two frequencies (25 and 45 kHz) were applied in a Box-Behnken design to investigate the effect of three independent variables in the extraction process, namely time (5 to 75 min), temperature (30 to 70 ° C) and amplitude of the ultrasonic power (10 to 90% W), totaling 34 experimental units for each fruit under study. The results showed that for the total anthocyanin, the optimal condition for blackberries can be reached at 45 kHz, at 5 min, at 60 ° C and at 10% amplitude in blueberry extract the optimum point is reached at 45 kHz, 75 min, 30 ° C and 90% amplitude, and for the strawberry extract the optimum point is reached at 45 kHz, at 75 min at the temperature of 70 ° C and in the amplitude of 10%. These conditions predict a content of 49,133 mg, 260,49 mg and 4,5805 mg of total anthocyanins per 100 g of fruit, for blackberry, blueberry and strawberry, respectively. Experimental results obtained a content of 48.320 mg, 263.19 mg and 4.055 mg of total anthocyanins per 100 g of fruit, for blackberry, blueberry and strawberry, respectively. In the analysis of total phenolics, the optimum simultaneous combination of the studied variables was the frequency of 25 kHz, in the time of 75 min, at the temperature of 70 ° C and in the amplitude of 90%. Predicting a content of 409.99 mg AGE / 100 g of the fruit for the blackberry extract, 962.09 mg AGE / 100 g of the fruit for the blueberry extract, and 284.18 mg of AGE / 100 g of fruit, for the strawberry extract. Experimental values of 464,74 mg, 979,15 mg and 291.04 mg AGE / 100 g of the fruit were observed for the total phenolic contents of blackberry, blueberry and strawberry, respectively. When comparing UAE and conventional extraction, it was observed that UAE increased significantly the extraction yield of total anthocyanins ($p < 0.05$) of blackberries, blueberries and strawberries, with values of 48.320 mg, 263.19 mg and 4.055 mg / 100 g of fruit, respectively, when compared with 30.78 mg, 228.28 mg and 2.099 mg / 100 g of fruit respectively, obtained by conventional extraction. Similarly, UAE increased the yield of significant phenolic extractions ($p < 0.05$) of blackberries, blueberries and strawberries, with values of 464,74 mg, 979,15 mg and 291,04 mg AGE / 100 g of fruit respectively, when

compared with 198,93 mg 418,37 mg and 192.03 mg AGE / 100 g of fruit respectively, obtained by conventional extraction. The study indicates that UAE is an efficient methodology for the recovery of phenolics compounds from berries.

1. INTRODUÇÃO

As frutas vermelhas têm sido consumidas sem aparentes efeitos adversos a saúde humana por centenas de anos, e nas últimas décadas tem atraído a atenção da indústria alimentícia pelo seu potencial de extração de corantes naturais, visto que a utilização de corantes sintéticos, principalmente os de coloração vermelha, vem sendo questionada devido a possíveis efeitos adversos a saúde humana que eles podem causar. Estes corantes vem sendo banidos progressivamente da composição dos produtos na indústria alimentícia, e os extratos de antocianinas derivados de fontes naturais tem emergido como uma potencial alternativa para substituir os corantes sintéticos (FIORINI, 1995; SHARMA et al., 2016).

Dentre os corantes naturais utilizados na indústria alimentícia, as antocianinas, que pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, ganharam bastante atenção, pois além da ampla gama de cores que elas podem promover, também possuem capacidade antioxidante, tendo efeitos benéficos à saúde, sendo seu consumo recomendado na prevenção de doenças crônicas (HAJAZIMI; LANDBERG; ZAMARATSKAIA, 2016; WEBER; BOCH; SCHIEBER, 2017). Das diferentes estruturas de antocianinas presentes nas frutas vermelhas, destaca-se os conteúdos de cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo em amoras-pretas, e pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-rutinosídeo em morangos. O mirtilo apresenta um complexo conteúdo de antocianinas, dentre elas a delphinidina-3-galactosídeo, malvidina-3-galactosídeo, petunidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo (FANG, 2015).

As antocianinas ocorrem de forma ligada a diferentes moléculas de açúcares, ácidos livres e a parede celular dos vegetais. Desta forma, procedimentos de extração e hidrólise desempenham um papel importante na liberação e separação desses compostos da matriz. Variáveis como a temperatura, tempo de extração, pH e a utilização de solventes apropriados estão entre os fatores mais importantes que determinam a efetividade do rendimento da extração (HAJAZIMI; LANDBERG; ZAMARATSKAIA, 2016). Nos últimos anos, métodos para extração de compostos fenólicos vem sendo aperfeiçoados, como a utilização de enzimas, micro-ondas (GRIGORAS et al., 2012), fluido supercrítico (XU et al., 2010) e extração assistida por ultrassom (EAU). Ao ser comparado com métodos de extrações convencionais por solvente, o uso do ultrassom na extração de compostos fenólicos tem adquirido destaque como uma técnica mais rápida, mais eficiente, com menor consumo de solventes, além de permitir

extrações eficientes utilizando apenas água como solvente extrator (HE et al., 2016; ROCHA et al., 2017).

Estudos mostram que diferentes matrizes celulares, requerem combinações diferentes de variáveis para um melhor rendimento nas taxas de extração. As variáveis utilizadas na EAU, como frequência, amplitude do poder ultrassônico, solvente extrator, temperatura, tempo, dentre outras, tem influência significativa no processo de extração, sendo que a determinação das condições ótimas destas variáveis de forma simultânea é importante para obter o rendimento máximo na extração de compostos fenólicos de fontes naturais. Metodologias de superfície de resposta, com destaque para o delineamento em Box Behnken, combinando variáveis que otimizam o processo de EAU vem sendo estudadas com o objetivo de aumentar a taxa de recuperação de compostos de interesse (BARAN; GOUD; DAS, 2017; DING et al., 2016; DRANCA; OROIAN, 2016; ESPADA-BELLIDO et al., 2017; HE et al., 2016; SANG et al., 2017). Sendo que informações sobre a combinação da frequência ultrassônica, tempo, temperatura e amplitude ultrassônica aplicados na extração de antocianinas e fenólicos totais de amora-preta, mirtilo e morango de forma simultânea são escassas na literatura

O objetivo do presente estudo foi determinar as condições que maximizarão o rendimento da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais e compostos fenólicos totais, das frutas amora-preta, mirtilo e morango pela otimização da combinação simultânea das variáveis: frequência, tempo, temperatura e amplitude do poder ultrassônico, utilizando metodologia de superfície de resposta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar as condições (ou variáveis) de extração assistida por ultrassom (EAU) de antocianinas e compostos fenólicos totais de amora-preta, mirtilo e morango.

2.2. Objetivos específicos

- Obter o extrato fenólico bruto dos frutos em estudo utilizando o ultrassom de acordo com as combinações geradas pelo delineamento experimental em Box-Behnken;
- Analisar os conteúdos de antocianinas totais e fenólicos totais dos extratos obtidos;
- Ajustar a função de segundo grau que melhor explica o comportamento da EAU de acordo com a combinação dos efeitos estudados (frequência, tempo, temperatura e amplitude do poder ultrassônico) na resposta de antocianinas totais e fenólicos totais das três frutas estudadas;
- A partir da melhor combinação das variáveis estudadas de forma simultânea (função desejabilidade), obter os extratos fenólicos otimizados de amora-preta, mirtilo e morango;
- Comparar os resultados das análises das condições otimizadas com os resultados das análises para o extrato fenólico obtido de forma convencional;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Frutas vermelhas

As frutas vermelhas, tendo como exemplo, amoras-pretas, mirtilos e morangos, são geralmente bagas pequenas e delicadas, oriundas das regiões mais frias, como Norte da Europa ou América do Norte (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012) Essas frutas tem como característica comum a alta concentração de compostos bioativos, como flavonoides e em especial as antocianinas (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012; CANUTO et al., 2016).

Com ampla distribuição no mercado nacional, as frutas vermelhas participam da economia brasileira por meio de exportações, mercado interno, geração de emprego e renda, e desenvolvimento do agronegócio nacional. E apesar da baixa produção, verificam-se avanços. Das frutas vermelhas, o morango é a mais conhecida e apreciada pelos brasileiros, e se destaca como a mais expressiva em termos de produção, já outras frutas como amoras-pretas e mirtilos, são apontadas como alternativa de cultivo para as regiões mais frias, principalmente para a agricultura familiar. Desta forma, ainda são necessárias pesquisas que visam explorar os mercados potenciais para essas frutas (FERREIRA et al., 2012).

Em uma dieta saudável, o consumo frequente de frutas vermelhas pode prevenir doenças crônicas, devido ao seu conteúdo de fibras dietéticas, vitaminas C e K, folatos, compostos fenólicos, carotenoides, fitoesteróis entre outros compostos bioativos. Sendo que os flavonoides é a classe mais abundante de compostos fenólicos presentes em frutas vermelhas (HAJAZIMI; LANDBERG; ZAMARATSKAIA, 2016). Existem vários fatores que podem afetar o conteúdo de compostos fenólicos em frutas vermelhas como o grau de maturação das frutas na colheita, diferenças genéticas (cultivares), condições ambientais e o processamento (ANTUNES et al., 2012).

A fim de avaliar o impacto das frutas vermelhas e seus associados compostos bioativos na saúde humana, a determinação do seu conteúdo químico é uma tarefa essencial. Por conta disso, métodos simples e confiáveis de extração e separação, para posterior identificação e quantificação de compostos fenólicos de diferentes frutas vermelhas são necessários (HAJAZIMI; LANDBERG; ZAMARATSKAIA, 2016).

3.1.1. Amoras-pretas

A produção de amoras-pretas (*Rubus* sp.) (Figura 1), teve início na Europa, no século XVII e, a partir daí, espalhou-se para os demais continentes (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012; VIZZOTTO; PEREIRA, 2011). No Brasil, as primeiras amoreiras foram introduzidas na década de 70, pela Embrapa Clima Temperado, na cidade de Pelotas localizada no estado do Rio Grande do Sul (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011). Desde então, seu cultivo vem crescendo nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com a introdução e adaptação de novos cultivares (HIRSCH et al., 2012). A amora-preta representa uma ótima opção para a diversificação de pequenas propriedades, por ser rústica e de alta produção, possuir sabor exótico e ser rica em compostos bioativos (RASEIRA; FRANZON, 2012).



Figura 1. Amoras-pretas (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).

As amoras-pretas são principalmente consumidas frescas, mas, como possuem altas taxas respiratórias e conseqüentemente pequena vida de prateleira, podem ser vendidas congeladas, a granel, em polpas e em sucos concentrados (FERRARI; GERMER; AGUIRRE, 2012; JACQUES et al., 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Na indústria, são utilizadas para produção de suplementos nutricionais, sorvetes, geleias, doces de fruta, vinhos, entre outros (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012).

A amora-preta contém em torno de 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de minerais, vitaminas do complexo B e A, além de ser fonte de compostos bioativos (HIRSCH et al., 2012). Apresentam outros fitoquímicos como vitaminas C e E, ácidos elágico e fólico (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010), além destas frutas serem ricas em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas (SARIBURUN et al.,

2010). Sendo que as antocianinas são encontradas em maior quantidade em amoras-pretas na forma de cianidina-3-glicosídeo, seguida da cianidina-3-rutinosídeo. Mas também foram identificadas, em menor quantidade, cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-xilosídeo e cianidina-3-arabinosídeo (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012).

3.1.2. *Mirtilo*

Os mirtilos (Figura 2) são frutas da família das Ericáceas, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium*. Ele é nativo da América do Norte e de algumas regiões da Europa, e é muito apreciado por seu sabor exótico, alto valor nutricional e de compostos bioativos, com abundante conteúdo de antocianinas, além de destacar-se por sua demanda na indústria de processamento (KLIMAVICIUTE et al., 2015; PELEGRINE et al., 2012; RASEIRA; FRANZON, 2012; STÜLP; GNAS; CLEMENTE, 2014).



Figura 2. Mirtilos (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).

Os efeitos benéficos a saúde, associados ao consumo de mirtilos, incluem sua capacidade antioxidante associadas ao seu alto conteúdo de antocianinas. As antocianinas do mirtilo são potentes moléculas usadas no tratamento de rinopatia diabética ou fatores de riscos cardiovasculares (CHORFA; SAVARD; BELKACEMI, 2016).

Os mirtilos são reconhecidos por serem ricos em flavonoides (antocianinas, flavonóis e pro-antocianidinas) dentre outros compostos fenólicos. Das seis antocianinas mais encontradas em frutas e vegetais (pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina), apenas pelargonidina não foi detectada nesses frutos (CHORFA; SAVARD; BELKACEMI, 2016). O mirtilo é caracterizado pela presença de aproximadamente 15 estruturas de

antocianinas, sendo 3-o-arabinosídeos, 3-o-glicosídeos e 3-o-galactosídeos de cinco antocianidinas, nomeadas, cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina e peonidina. Sendo que o conteúdo total, bem como o conteúdo individual de antocianinas depende da região onde essas frutas vermelhas são produzidas (KLIMAVICIUTE et al., 2015; LI; MENG; LI, 2016).

3.1.3. *Morango*

Os morangos (Figura 3) pertencem ao gênero *Fragaria*, família *Rosaceae* é uma das mais populares e apreciadas frutas vermelhas. Sua produção mundial vem crescendo em números absolutos nos últimos anos, chegando a 8.114.373 toneladas, para uma área total plantada de 373.435 hectares. Estima-se que a produtividade média no Brasil é de cerca de 30 ton/ha, o que colocaria o Brasil, em 11º posição no *ranking* mundial de produtores de morangos (ANTUNES; FAGHERAZZI; VIGNOLO, 2017).

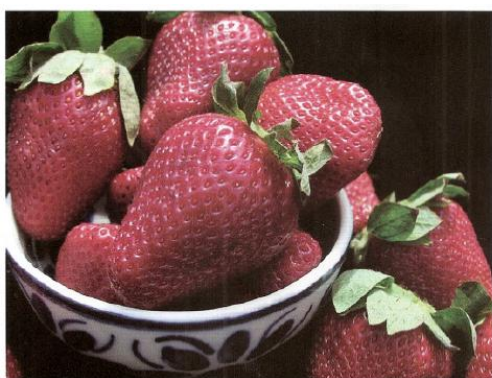


Figura 3. Morangos (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).

Os morangos são ricos em compostos fenólicos, tendo destaque para o ácido elágico, elagitaninos, galotaninos, antocianinas, flavonóis e derivados do ácido cinâmico, além do ácido ascórbico, outras vitaminas e carotenoides. Os morangos são comumente consumidos na forma *in natura* ou processados nas formas de geleias, iogurtes, sucos, etc (CANUTO et al., 2016; VIZZOTTO, 2012).

Quanto ao conteúdo de antocianinas presente em morangos, há destaque para quatro: cianidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, e pelargonidina-3-glicosídeo e quatro antocianidinas (cianidina, malvidina, pelargonidina e delphinidina) (CANUTO et al., 2016).

3.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, são metabolitos secundários oriundos de plantas, que participam de importantes atividades fisiológicas, e sua concentração está sujeita a grande variação na natureza. Nas frutas e vegetais, bem como em seus derivados, os compostos fenólicos estão diretamente associados a suas propriedades nutricionais e sensoriais, conferindo atributos como cor e sabor (REBELLO et al., 2013).

Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxil em sua estrutura, podendo variar de uma molécula fenólica simples até um complexo polímero de alta massa molecular (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011). De forma geral, os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grupos principais: não flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos e seus derivados, estilbenos e álcoois fenólicos) e flavonoides (antocianinas, flavonóis, flavonas, flavonóis (catequinas), flavanonas e isoflavonoides) (Figura 4) (REBELLO et al., 2013).

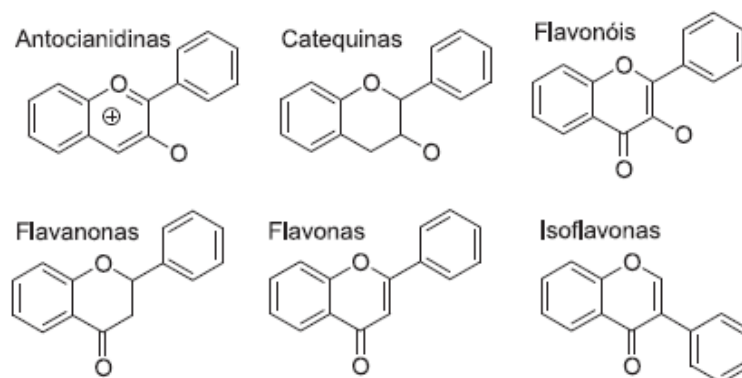


Figura 4. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Nos últimos anos, a importância dos compostos fenólicos vem aumentando por conta de vários estudos exaltarem as suas altas bioatividades, atuando como antioxidantes, agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e anticâncer (LUO et al., 2016; REBELLO et al., 2013), e por conta disso tem chamado a atenção dos consumidores interessados em alimentos ricos nestes compostos, que vem sendo aplicados nas mais diversas áreas industriais, como a de cosméticos, farmacêuticas e de suplementos nutricionais (LI; MENG; LI, 2016; VALLS et al., 2009).

3.3. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos que ocorrem de forma natural em plantas, e é classificada como um subgrupo dos flavonoides. Estruturalmente, as antocianinas compreendem em polihidroxi glicosilados e polimetoxis derivados de 2-fenilbenzopirona, ou seja, do cátion *flavylium* (aglicona), que contém duplas ligações conjugadas, que provocam a absorção da luz em torno de 500 nm, sendo responsável pelas cores que variam do rosa claro, vermelho, violeta e azul (CHORFA; SAVARD; BELKACEMI, 2016; KLIMAVICIUTE et al., 2015).

As antocianinas derivam das suas antocianidinas (agliconas) correspondentes via adição de moléculas de açúcares. Sendo que o cátion *flavylium*, pode ser descrito como um esqueleto C6-C3-C6, possuindo um anel fenólico, fundido a um anel pirano com um anel fenólico adicional ligado na posição 2 do anel pirano (Figura 5). Esta estrutura pode ser glicosilada, na posição R4, e estes glicosídeos podem ser acilados. Enquanto que o grau de hidroxilação ou metoxilação nas posições R1 e R3 darão origem a diferentes antocianinas (Tabela 1) (BARNES et al., 2009; LI; MENG; LI, 2016).

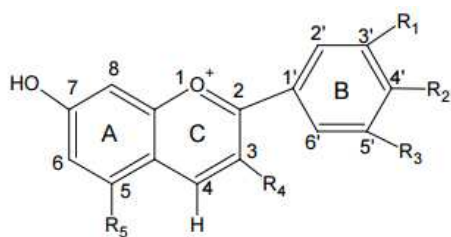


Figura 5. Estrutura básica de uma antocianina (cátion *flavylium*)

Tabela 1. Antocianidinas naturais e grupos substituintes nas antocianinas

Antocianidinas	R1	R2	R3	R4
Delfinidina	OH		OH	
Cianidina	OH		H	
Petunidina	OMe		OH	Glicosídeos acilados ou não.
Pelargonidina	H	OH	H	
Peonidina	OMe		H	
Malvidina	OMe		OMe	

Fonte: BARNES *et al.*, 2009.

Há um interesse particularmente crescente nestes pigmentos devido aos seus benefícios a saúde associados a certas atividades medicinais, como anticâncer, anti-inflamatório, prevenção de doenças coronarianas, dentre outros. Antocianinas e antocianidinas exercem

importantes efeitos fisiológicos como sequestrador de radicais livres, aliviando o estresse oxidativo e danos celulares, em consequência de sua capacidade antioxidante (CANUTO et al., 2016).

As antocianinas possuem diferentes formas de ressonância dependentes do pH, sendo que a forma mais estável é a do cátion *flavylium* indutor da cor vermelha, que é a forma prevalente em valores de pH abaixo de 2 (GRIGORAS et al., 2012; WEBER; BOCH; SCHIEBER, 2017). A estabilidade das antocianinas é favorecida em meios ácidos, com a glicosilação dos grupos hidroxílicos e acilação dos açúcares.

Em meio aquoso, as antocianinas estão em equilíbrio em quatro estruturas: base quinonoidal, cátion *flavylium*, pseudobase carbinol e chalcona (Figura 6). Os conteúdos dessas estruturas químicas dependem principalmente do valor de pH com a predominância do cátion *flavylium* (AH^+) em meio fortemente ácido (pH < 2). A medida que o valor do pH aumenta, os cátions *flavylium* vermelhos desaparecem por desprotonação dos grupos hidroxil nas posições 5, 7 e 4' produzindo bases quinonoidais (A), com coloração azul. Em pH neutro ou fracamente ácido, a hidratação do cátion *flavylium* ocorre nas posições 2 e 4 rendendo a pseudobases carbinol (B) que são convertidas em chalconas abertas (C) com coloração amarela. O grau e a posição da hidroxilação e metoxilação no anel B, o padrão de glicosilação, e a completa conjugação das estruturas das antocianinas induzindo a deslocalização de elétrons, são fatores estruturais que modulam a estabilidade e polaridade destes compostos, bem como a habilidade das antocianinas de agirem como capturadoras de radicais livres (CHORFA; SAVARD; BELKACEMI, 2016; SHARMA et al., 2016).

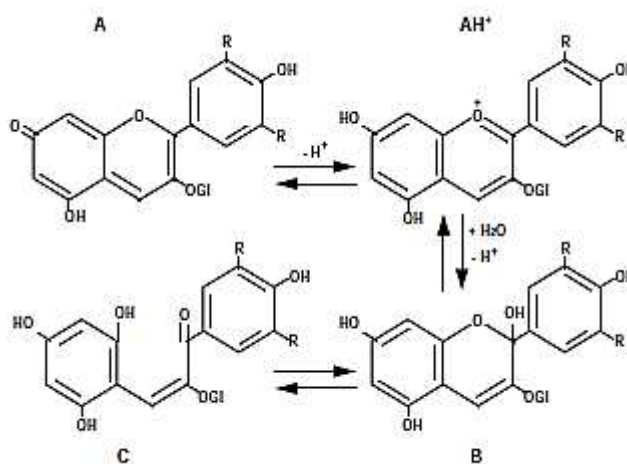


Figura 6. Transformações estruturais das antocianinas existentes em uma solução em equilíbrio (FRANCIS, 1982)

3.4. Métodos de extração

Devido ao grande potencial de aplicações de extratos fenólicos de fontes naturais nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, por conta das suas propriedades de cor e suas atividades biológicas, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para isolar seus conteúdos de frutas e vegetais. As antocianinas e polifenóis são compostos polares, sendo assim, solventes polares são usados para sua extração, sendo geralmente misturas aquosas acidificadas de etanol, metanol ou acetona, numa extração líquido-sólida (GRIGORAS et al., 2012). Dentre os solventes utilizados, o etanol tem se mostrado o mais apropriado na extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais, além de ser geralmente reconhecido como seguro (GRAS) na aplicação em alimentos (HE et al., 2016).

Estudos mostram que valores ácidos de pH previne a degradação de pigmentos de antocianinas não aciladas. Portanto, ácidos hidrocloreto, fórmico ou acético podem ser adicionados ao solvente extrator. Com a adição de ácido, o pH do extrato fica em torno de 2, favorecendo a predominância do íon *flavylium* das antocianinas, contribuindo para a estabilidade do extrato (GRIGORAS et al., 2012).

As técnicas convencionais de extração para compostos vegetais são a destilação, extração por solvente (maceração, digestão, infusão, decocção, percolação e extração contínua a quente), extração contracorrente, compressão a frio, etc. Estas técnicas, frequentemente utiliza altas quantidades de solventes, envolve processos com alto consumo de energia, além de longos períodos de extração que podem resultar na degradação dos compostos fenólicos devido à oxidação, ionização e hidrólise. Por conta das diversas desvantagens apresentadas pelos métodos convencionais, métodos de extração ditos não convencionais ou sob condições extremas vem sendo uma área dinamicamente desenvolvida nos campos de pesquisa aplicada e indústria, ao longo dos últimos anos. Alguns métodos não convencionais são a extração por enzimas, fluído supercrítico, micro-ondas, sob queda de pressão, destilação rápida (flash), com água subcrítica e a extração assistida por ultrassom (EAU), sendo que dentre estas, a EAU tem recebido destaque por sua boa capacidade de aplicação a nível industrial (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; DRANCA; OROIAN, 2016; ESPADA-BELLIDO et al., 2017; SANG et al., 2017).

3.5. Extração assistida por ultrassom

Ultrassons são ondas mecânicas que necessitam de um meio para se propagarem. A diferença entre o som e o ultrassom é a frequência da onda, sendo que a frequência captada pelos ouvidos humanos varia de 16 Hz até 16-20 kHz, enquanto as do ultrassom variam na faixa entre 20-100 kHz. Um sistema de produção de ondas ultrassônicas contém basicamente um gerador, um transdutor e um sistema operacional (Figura 7). O gerador produz energia mecânica ou elétrica e o transdutor converte esta energia em energia sonora na frequência ultrassônica. A onda sonora se propaga por um meio, induzindo um deslocamento longitudinal de partículas, resultando em sucessivos ciclos de expansão e compressão, funcionando de modo análogo a um pistão. Cada meio possui uma distância molecular crítica de suas partículas, abaixo deste valor crítico, as partículas se mantêm intactas, mas acima desta distância, o líquido rompe e pequenos vácuos são gerados dentro do líquido. Os vácuos gerados no meio são conhecidos como bolhas de cavitação que são as responsáveis pelo efeito ultrassônico (CHEMAT; ZILLE-HUMA; KHAN, 2011; ERCAN; SOYSAL, 2013; O'DONNELL et al., 2010).

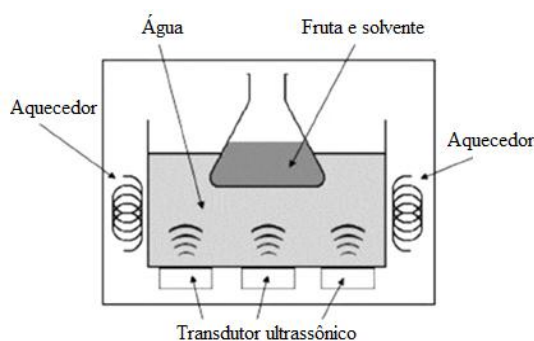


Figura 7. Esquema básico de um sistema ultrassônico.

Quando o tamanho destas bolhas alcança um valor crítico, elas colapsam em um ciclo de compressão, liberando grandes quantidades de energia. A temperatura e a pressão no momento do colapso são estimadas em aproximadamente 5000 K e 2000 atmosferas em um banho ultrassônico na temperatura ambiente. Estes pontos de colapso são capazes de acelerar drasticamente as reações químicas do meio. Quando estas bolhas colapsam na superfície de um material sólido, as altas temperaturas e pressões alcançadas originam micro jatos direcionados à superfície da matriz. Conseqüentemente, uma das aplicações do ultrassom é a extração de compostos vegetais, pois estes micro jatos são responsáveis pela destruição das paredes

celulares que permitem a locomoção do composto de interesse para o meio solvente (Figuras 8 e 9) (CHEMAT et al., 2017; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

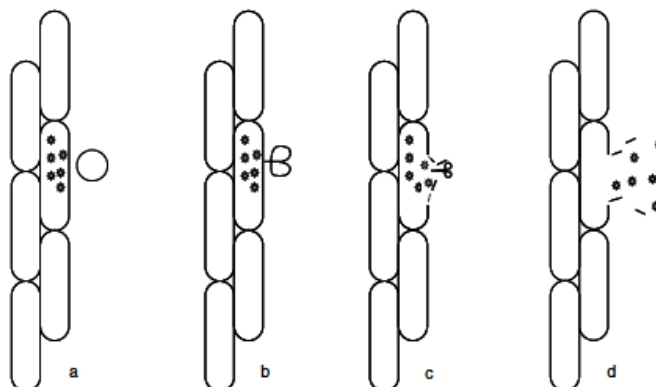


Figura 8. A bolha de cavitação é gerada perto da superfície do material (a), durante o ciclo de compressão, esta bolha colapsa (b), originando um micro jato direcionado para superfície da matriz (b e c). A alta pressão e temperatura envolvida no processo destrói as paredes celulares da matriz vegetal e seu conteúdo será liberado no meio (d) (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

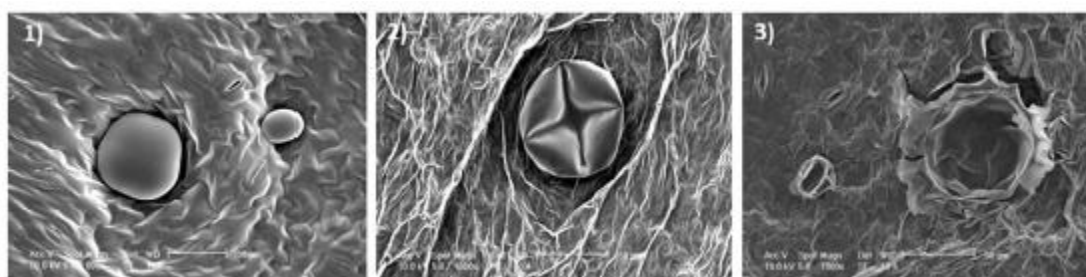


Figura 9. Observação microscópica de uma glândula de óleo essencial de manjeriço. 1) controle/intacta, 2) após maceração e 3) após EAU (US reator 25 kHz) (CHEMAT et al., 2017; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

A EAU tem emergido como um método efetivo na extração de produtos naturais devido a sua rapidez, simplicidade, baixo custo, e baixos volumes de solvente utilizados (ESPADA-BELLIDO et al., 2017). A EAU tem sido empregada na extração dos conteúdos de antocianinas e compostos fenólicos de diferentes matrizes alimentares como, amoras (ESPADA-BELLIDO et al., 2017), casca da berinjela (DRANCA; OROIAN, 2016), bagaço do vinho de mirtilos (HE et al., 2016) e farelo de arroz preto e roxo (BARAN; GOUD; DAS, 2017). Além disso, o uso do ultrassom tem mostrado grande potencial de aplicações em outros processos industriais (CHEMAT et al., 2017; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; O'DONNELL et al., 2010).

Como o ultrassom é uma onda, suas características como frequência, comprimento de onda, amplitude, assim como o poder, pode influenciar a cavitação acústica e por consequência, as taxas de extração (CHEMAT et al., 2017). Além destes fatores, a eficiência da técnica de extração por ultrassom é influenciada por várias variáveis como tipo e concentração do solvente, pH, razão solvente/sólido, tempo de extração, temperatura, dentre outras. Estudos recentes (Tabela 2), otimizaram a influência de algumas variáveis na EAU, para obter a melhor recuperação de antocianinas totais (AT) e fenólicos totais (FT) de diversas fontes naturais.

Tabela 2. Condições otimizadas de EAU em função do conteúdo de antocianinas totais e/ou fenólicos totais.

Referência	Variáveis estudadas	Condições ótimas para AT e FT
Otimização EAU de bagaço de vinho do mirtilo (HE et al., 2016)	70% de etanol, acidificado com HCl (0.01% v/v) e poder ultrassônico 400 w. Temperatura (50-70°C); razão líquido sólido (15-25 mL/g); tempo (15-35 min).	61°C, 22:1 razão líquido/sólido e 24 minutos (4,19 mgC3G/g de AT e 15,81 mg EAG/g de FT)
Otimização EAU de casca de berinjela (DRANCA; OROIAN, 2016)	Metanol e 2-propanol (50-90% v/v), frequência ultrassônica (12,5-37,5 kHz), temperatura (50-70°C) e tempo (15-45 min)	AT: 54,4% metanol, 37 kHz, 5,1 °C e 44,85 min (2410,71 mg). FT: 76,6% metanol, 33,88 kHz, 69,4°C e 57,5 min (29,63 g EAG/100 g)
EAU de farelo de arroz preto e roxo (BARAN; GOUD; DAS, 2017)	Frequência de 35 kHz, 230 W. Temperatura (30–50 °C), pH (2–4); conc. de etanol (20–60% v/v) e tempo (10–60 min)	Farelo de arroz preto: 35,97°C, pH 2,52; 23,78 % de etanol e 22,89 min (30,04 mgC3G/100 g de AT e 1957,44 mg EAG/100 g de FT) Farelo de arroz roxo: 31,7°C, pH 2,39; 31,17 % de etanol e 15,77 min (35,56 mgC3G/100 g de AT e 2124,98 mg EAG/100 g de FT)
Otimização da EAU da farinha da semente de <i>Nitraria tangutorun</i> Bobr (SANG et al., 2017)	Frequência 30 kHz e poder ultrassônico de 300 W. Temperatura (30–70 °C), tempo (15–45 min) e conc. de etanol (30–70 % v/v)	70°C; 32,73 min e 52,15 % de etanol (65,04 mg/100 g de AT e 947,39 mg/100 g de FT)
Otimização EAU de polpa de amora (ESPADA-BELLIDO et al., 2017)	Frequência de 24 kHz, 200 W. Conc. de metanol (50-100 % v/v), temperatura (10-70°C), amplitude ultrassônica (30-70%), ciclo (0,2-0,7 s), pH (3-7) e razão solvente/sólido (10:1,5-20:1,5)	AT: 76% de metanol, pH 3, 48 °C, amplitude de 70%, ciclo de 0,7 s, e 12:1,5 razão solvente/sólidos. FT: 61% de metanol, pH 7, 64 °C, amplitude de 70%, ciclo de 0,7 s, e 11:1,5 razão solvente/sólidos.

3.6. Metodologia estatística

O delineamento em Box-Behnken (DBB) é uma metodologia de superfície de resposta (MSR), que é uma ferramenta matemática e estatística amplamente utilizada, e consiste de pontos centrais e médios nas arestas de um cubo circunscrito em uma esfera, e pode ser utilizado na investigação de possíveis interações entre as variáveis experimentais de diversos processos (HE et al., 2016). O DBB tem sido amplamente utilizada na otimização/melhoria de vários processos, dentre eles as de EAU (DING et al., 2016; ESPADA-BELLIDO et al., 2017; SANG et al., 2017).

As metodologias de superfície de resposta são utilizadas quando o objetivo é maximizar ou minimizar uma resposta. Quando se estudam três fatores, o DBB oferece a vantagem sobre outras metodologias de superfície de resposta, por necessitar de um número menor de experimentos em comparação com outros modelos estatísticos. Neste estudo, esta metodologia será empregada para estudar as condições ótimas da EAU para obter a maior extração de antocianinas e compostos fenólicos dos frutos em estudo (variáveis respostas).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos (LaCBio) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

4.1. Matéria-prima

Foram utilizadas amoras-pretas (*Rubus spp.*), mirtilos (*Vaccinium spp.*) produzidos no município de Barbacena – MG (latitude: 21°13'33" sul, longitude 43°46'25" oeste), e morangos (*Fragaria spp.*), produzidos no município de Canaã – MG (latitude 20°41'09" sul, longitude 42°37'11" oeste). Os frutos foram selecionados, higienizados e armazenados em freezer convencional a -20°C até o momento das análises.

4.2. Otimização da extração assistida por ultrassom

4.2.1. Preparo das amostras

As frutas foram trituradas em *mixer* convencional, e uma mistura fruto:solvente foi realizada na proporção 1:4 (m/v) de fruto triturado:solvente (etanol 70% v/v), e acidificada até pH 2 com HCl concentrado de acordo com a metodologia de Rocha et al., (2017).

4.2.2. Extração assistida por ultrassom (EAU)

Os extratos fenólicos de amora-preta, mirtilo e morango foram obtidos através da extração assistida por ultrassom, utilizando um sonicador de banho (Elmasonic TI-H-10, Elma, Alemanha). A EAU foi realizada baseada nas condições controladas do equipamento, de acordo com a combinação de variáveis geradas pelo delineamento experimental. Os extratos das três frutas foram submetidos as respectivas variáveis: X₀ – frequência, de 25 e 45 kHz, X₁ - tempo de extração, variando de 5 a 75 minutos, X₂ - temperatura, variando de 30 a 70 °C, e X₃ - amplitude do poder ultrassônico, variando de 10 a 90% W. Os extratos fenólicos obtidos a partir da EAU foram filtrados em papel de filtro Whatman no. 1, e armazenados em frascos volumétricos (25 mL), a -20°C até análises posteriores.

4.2.3. Delineamento experimental

O experimento fatorial foi realizado segundo o delineamento de superfície de resposta desenvolvido por Box e Behnken (1960), onde os fatores estudados na EAU (tempo, temperatura e amplitude do poder ultrassônico), foram avaliados em três níveis, codificados como -1, 0 e + 1 para baixas, médias ou altas concentrações (ou valores), respectivamente (Tabela 3). De acordo com a frequência selecionada (25 e 45 kHz), 17 combinações das três variáveis em três níveis, incluindo cinco pontos centrais são descritos na matriz da Tabela 4. As ordens das corridas foram aleatórias.

Tabela 3. Modelo experimental dos níveis das variáveis selecionadas.

Variável, unidade	Fatores		Nível	
	X	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
Frequência, kHz	X ₀	25	-	45
Tempo, minutos	X ₁	5	40	75
Temperatura, °C	X ₂	30	50	70
Amplitude, % W	X ₃	10	50	90

Tabela 4. Matriz do modelo do DBB com três variáveis independentes expressas em unidades codificadas e natural.

Corrida	Tempo (min)		Temperatura (°C)		Amplitude (% W)	
	Código	Natural	Código	Natural	Código	Natural
1	-1	5	-1	30	0	50
2	+1	75	-1	30	0	50
3	-1	5	+1	70	0	50
4	+1	75	+1	70	0	50
5	-1	5	0	50	-1	10
6	+1	75	0	50	-1	10
7	-1	5	0	50	+1	90
8	+1	75	0	50	+1	90
9	0	40	-1	30	-1	50
10	0	40	+1	70	-1	50
11	0	40	-1	30	+1	90
12	0	40	+1	70	+1	90
13	0	40	0	50	0	50
14	0	40	0	50	0	50
15	0	40	0	50	0	50
16	0	40	0	50	0	50
17	0	40	0	50	0	50

Em um sistema que envolvem variáveis independentes significantes (X_0, X_1, X_2 e X_3) a seguinte equação polinomial quadrática (Equação 1), obtida a partir dos dados experimentais para a predição o maior conteúdo de antocianinas totais e fenólicos totais (Y_i) nos termos das variáveis codificadas é apresentada.

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Equação 1})$$

Em que, Y_i e x_i são as variáveis dependente e independente, respectivamente. β_0 o termo constante da regressão, β_i, β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão, x_i e x_j representam os efeitos lineares, x_i^2 e x_{ii} representam os efeitos quadráticos e de interação entre as variáveis

independentes, respectivamente (BARAN; GOUD; DAS, 2017; DING et al., 2016; HE et al., 2016).

A otimização de variáveis de forma simultânea é importante para predição da extração dos conteúdos de antocianinas e fenólicos totais. A função de desejabilidade é utilizada quando se deseja otimizar múltiplas características ao mesmo tempo. Na abordagem da função de desejabilidade, primeiramente, y_i , é convertido em uma função de desejabilidade individual, d_i , que varia no intervalo

$$0 \leq d_i \leq 1 \quad (\text{Equação 2})$$

Se a característica y_i atinge seu alvo, então $d_i = 1$. Se a característica se encontra fora da região aceitável, então $d_i = 0$. Finalmente, se as varáveis em estudo podem ser selecionadas para maximizar a desejabilidade global

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Equação 3})$$

em que n é o número de características.

Quando o alvo (T) para a característica é um valor máximo e o limite inferior é denotado por L ,

$$d_i = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^r & L \leq y \leq T \\ 1 & y > T \end{cases} \quad (\text{Equação 4})$$

Quando o alvo (T) para a característica é um valor mínimo e o limite superior denotado por U ,

$$d_i = \begin{cases} 0 & y < T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^r & T \leq y \leq U \\ 1 & y > U \end{cases} \quad (\text{Equação 5})$$

Neste estudo, o valor de desejabilidade de n foi calculado pela Equação 5, enquanto os valores de desejabilidade de outras características foram calculados pela Equação 4. O

exponente r referido ao peso e especificado como 1. A desejabilidade global, no qual representa a desejabilidade de todas as características simultaneamente (D), foi calculada pela Equação 3 (DRANCA; OROIAN, 2016).

4.3. Caracterização química dos extratos fenólicos

4.3.1. Antocianinas totais - pH único

O conteúdo de antocianinas totais dos extratos de amora-preta, mirtilo e morango foi determinado pela metodologia descrita por Fuleki e Francis (1968). O cálculo do teor de antocianinas no extrato foi dado pela Equação 6. E o conteúdo de antocianinas totais expresso em mg por 100 g do fruto.

$$C = \frac{Abs \times MM}{\epsilon \times b} \quad (\text{Equação 6})$$

em que, C é a concentração de antocianinas em g/L, Abs é a absorvância lida em 535 nm, MM é a massa molar da antocianina majoritária do fruto em estudo em g/mol, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar da antocianina majoritária do fruto em estudo no solvente específico em L/mol.cm, e b é a espessura da cubeta, 1 cm.

Os valores de massa molar e o coeficiente de absorvidade molar, ϵ , teve como referência o trabalho de Giusti e Wrolstad (2001). Utilizando para amoras pretas, a cianidina-3-glicosídeo como antocianina majoritária, com MM de 449,2 g/mol, e ϵ de 26900 L/mol.cm, para o mirtilo, a MM de 493,2 g/mol referente a malvidina-3-glicosídeo e ϵ de 28000 L/mol.cm, já para o morango utilizou-se a MM de 433,2 g/mol referente a pelargonidina-3-glicosídeo e ϵ de 31620 L/mol.cm.

4.3.2. Fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais dos extratos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Os compostos fenólicos totais foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência. A absorvância foi medida a 760 nm utilizando espectrofotômetro UV-

VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra (mg EAG / 100 g).

4.4. Estudo comparativo da eficiência da extração

Um estudo comparativo entre as condições otimizadas da extração assistida por ultrassom e a extração convencional foi realizado com a finalidade de avaliar a eficiência da influência do ultrassom na recuperação de antocianinas e compostos fenólicos das três frutas estudadas.

4.4.1. Extração assistida por ultrassom otimizada

A partir da melhor combinação simultânea das variáveis independentes estudadas (frequência, tempo, temperatura e amplitude do poder ultrassônico) para fornecer as melhores respostas das variáveis dependentes (antocianinas totais e compostos fenólicos totais), obteve-se as condições ótimas para extração de cada fruto em estudo, que foram aplicadas na EAU para obter os extratos otimizados de amora-preta, mirtilo e morango. Ambos os extratos foram realizados em duplicata.

4.4.2. Extração convencional

O processo de extração convencional dos frutos de amora-preta, mirtilo e morango, foi realizado de acordo com a metodologia de Rocha et al. (2017), em que a proporção de fruto triturado:solvente (etanol 70% (v/v)) é de 1:10 (m/v), para todas as frutas. A mistura foi submetida a refrigeração por 24 horas ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Após este período, os extratos fenólicos foram filtrados à vácuo, com papel de filtro Whatman no. 1, e o extrato filtrado foi armazenado em frascos âmbar em freezer convencional (-20°C) até análises subsequentes. Ambos os extratos foram realizados em duplicata.

4.5. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SAS (versão 9.4, Cary, NC, USA). Análises de regressão foram conduzidas para se ajustar o melhor modelo de equação

polinomial de segunda ordem, para as variáveis dependentes estudadas. Os valores de F ($p > 0,05$) e os respectivos R^2 foram calculados para determinar se os modelos ajustados podem ser utilizados para prever as respostas das variáveis dependentes a partir da melhor combinação das variáveis independentes. O estudo de comparação entre a EAU ótima e a extração convencional foi realizado para detectar qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) no teste de Duncan.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da extração assistida por ultrassom

A obtenção dos extratos fenólicos de amora-preta, mirtilo e morango foi realizada utilizando o tratamento ultrassônico sob o estudo das seguintes variáveis: frequência, X_0 , de 25 e 45 kHz, tempo de extração, X_1 , variando de 5 a 75 minutos, temperatura do banho ultrassônico, X_2 , variando de 30 a 70°C e amplitude do poder ultrassônico, X_3 , variando de 10 a 90% W. O conteúdo de antocianinas totais e fenólicos totais obtidos dos extratos de amora-preta, mirtilo e morango, nas diferentes combinações estudadas são apresentadas no Anexo A. Os coeficientes e valor-p das análises de regressão para as respostas de antocianinas e fenólicos totais para as três frutas, são exibidos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Análise de regressão do DBB para antocianinas totais (mg/100 g de fruto).

Variável	Amora		Mirtilo		Morango	
	Coefficiente	Valor-p	Coefficiente	Valor-p	Coefficiente	Valor-p
Constante	12,88450	0,3345	226,91712	0,0348	2,41142	0,1889
X_0	0,72467	0,0128	1,17884	0,5696	0,03135	0,3951
X_1	0,09978	0,5200	- 0,43689	0,7132	- 0,00705	0,7375
X_2	0,41799	0,2451	- 2,62621	0,3396	- 0,02077	0,6666
X_3	0,03378	0,8061	1,10625	0,3020	0,03229	0,0959
X_1^2	- 0,0002203	0,8214	0,00379	0,6148	-0,00007507	0,5732
X_2^2	- 0,00246	0,4142	0,04159	0,0817	0,00022509	0,5812
X_3^2	0,00076618	0,3113	- 0,00964	0,1046	- 0,00017427	0,0979
X_1X_2	0,00149	0,4004	0,00264	0,8446	0,00039875	0,1057
X_1X_3	0,00025937	0,7673	0,00639	0,3481	- 0,00017875	0,1444
X_2X_3	- 0,00119	0,4420	- 0,01062	0,3725	- 0,00020906	0,3221
X_0X_1	- 0,00584	0,0269	- 0,00454	0,8118	0,00003232	0,9236
X_0X_2	- 0,00413	0,3465	- 0,02250	0,5021	- 0,00005594	0,9244
X_0X_3	- 0,00269	0,2235	0,00918	0,5833	0,00002031	0,9451

Como mostrado na Tabela 5, o efeito da frequência (X_0) assim como a interação entre a frequência e o tempo (X_0X_1), foram significantes ($p < 0,05$) no conteúdo de antocianinas totais do extrato fenólico de amora-preta. O efeito da temperatura quadrática (X_2^2) foi significativo

($p < 0,10$) no conteúdo de antocianinas totais nos extratos fenólicos de mirtilo. Os efeitos da amplitude do poder ultrassônico linear e quadrático (X_3 e X_3^2) foram significativos ($p < 0,10$) para os conteúdos de antocianinas totais dos extratos de morango.

Tabela 6. Análise de regressão do DBB para fenólico totais (mg EAG/100 g de fruto).

Variável	Amora		Mirtilo		Morango	
	Coefficiente	Valor-p	Coefficiente	Valor-p	Coefficiente	Valor-p
Constante	123,97425	0,0298	229,89595	0,2843	153,20565	0,0111
X_0	1,96719	0,0830	0,00828	0,9985	0,05596	0,9604
X_1	1,25295	0,0567	1,53812	0,5362	- 0,14815	0,8194
X_2	2,31461	0,1185	2,79664	0,6228	1,97596	0,1930
X_3	0,38882	0,4893	0,37775	0,8640	0,05656	0,9220
X_1^2	- 0,01518	0,0009	- 0,03210	0,0508	- 0,00511	0,2210
X_2^2	0,00104	0,9319	0,01801	0,7075	- 0,01088	0,3905
X_3^2	0,00367	0,2347	- 0,00409	0,7333	0,00273	0,3884
X_1X_2	0,02789	0,0008	0,06764	0,0242	0,01541	0,0467
X_1X_3	0,00054464	0,8785	0,03781	0,0130	0,00620	0,1033
X_2X_3	- 0,00616	0,3290	- 0,01550	0,5303	- 0,00175	0,7866
X_0X_1	- 0,01888	0,0721	- 0,03112	0,4370	- 0,00000536	0,9996
X_0X_2	- 0,03190	0,0817	0,02626	0,7062	- 0,01983	0,2835
X_0X_3	- 0,01053	0,2403	0,00535	0,8776	- 0,00883	0,3382

Na análise de regressão de fenólicos totais como variável resposta (Tabela 6), observou-se que a interação entre o tempo e a temperatura (X_1X_2) teve efeito significativo para as três frutas estudadas ($p < 0,05$). Sendo que para o extrato de amora, mostrou-se altamente significativo ($p < 0,01$). Além disso, o efeito da frequência (X_0) e do tempo (X_1), as interações entre a frequência e o tempo (X_0X_1) e a frequência e a temperatura (X_0X_2) se mostraram significativos ($p < 0,10$), bem como o efeito do tempo quadrático (X_1^2) se mostrou altamente significativo ($p < 0,01$) para o conteúdo de fenólicos totais do extrato de amora-preta. O efeito do tempo quadrático (X_1^2), e da interação tempo e amplitude do poder ultrassônico se mostraram significativos para o conteúdo de fenólicos totais do extrato de mirtilo ($p < 0,10$ e $p < 0,05$, respectivamente).

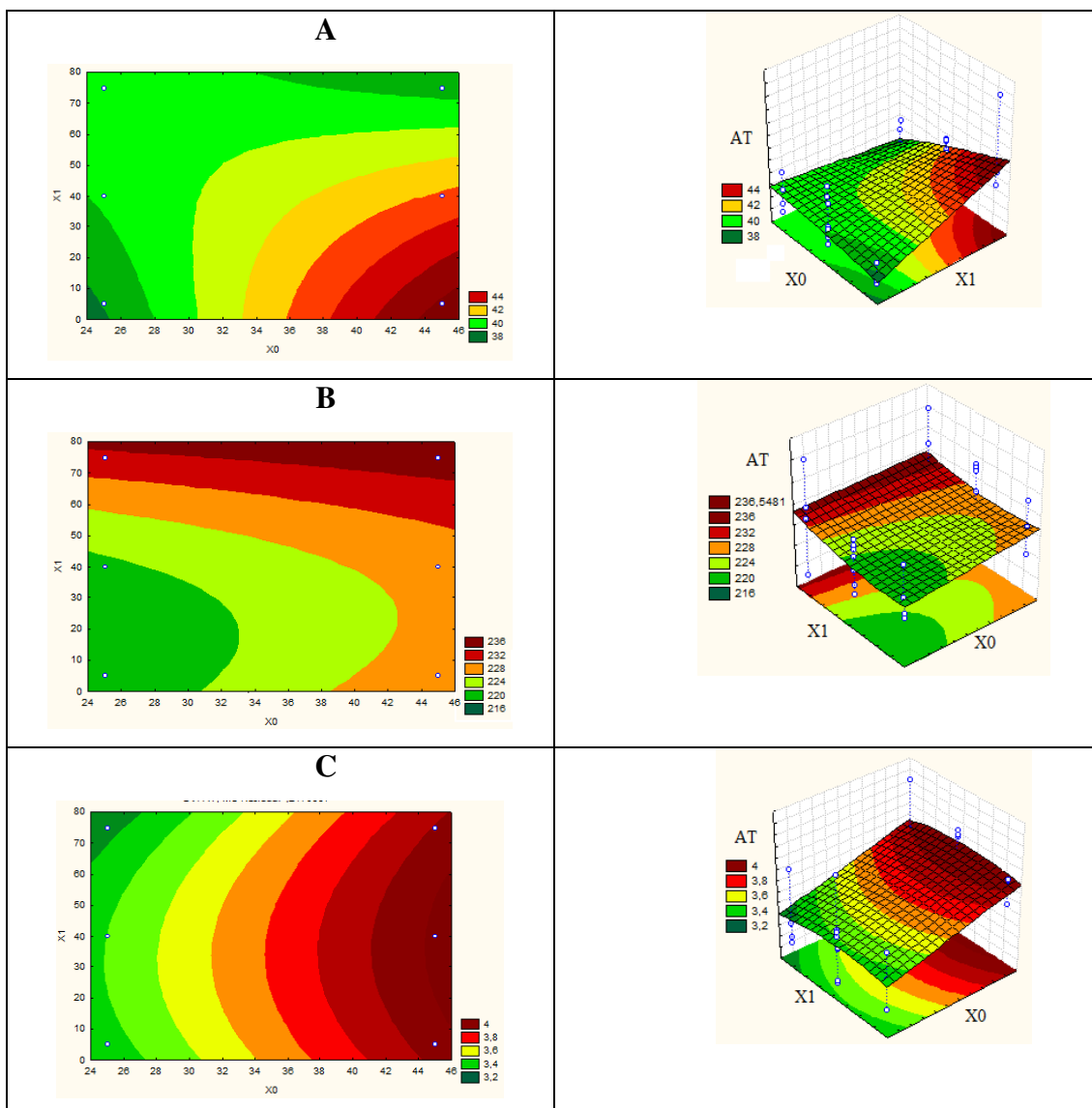


Figura 10. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de antocianinas totais (mg/100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X0 – frequência (kHz) e X1 – tempo (min).

Ao observar os gráficos de contorno e superfícies de respostas obtidos para os três frutos estudados nas Figuras 10, 11, 13 e 14, nota-se que a frequência mais alta (45kHz) teve um efeito positivo nos rendimentos de extração de antocianinas totais dos três frutos estudados, enquanto que para a extração de fenólicos totais, a frequência mais baixa (25 kHz) mostrou-se mais vantajosa. Os efeitos mecânicos, gerados pelas frequências ultrassônicas, causam a ruptura das células vegetais quando as bolhas de cavitação colapsam na superfície da matriz sólida. Além disso há um aumento na transferência de massa e na superfície de contato entre o solvente e o material vegetal. Ademais, o aumento pontual da temperatura eleva a solubilidade dos analitos no solvente e facilita a sua difusão da matriz celular para outras regiões. Dranca e Oroian

(2016), observaram um efeito positivo da frequência ultrassônica na extração de antocianinas e compostos fenólicos de berinjelas.

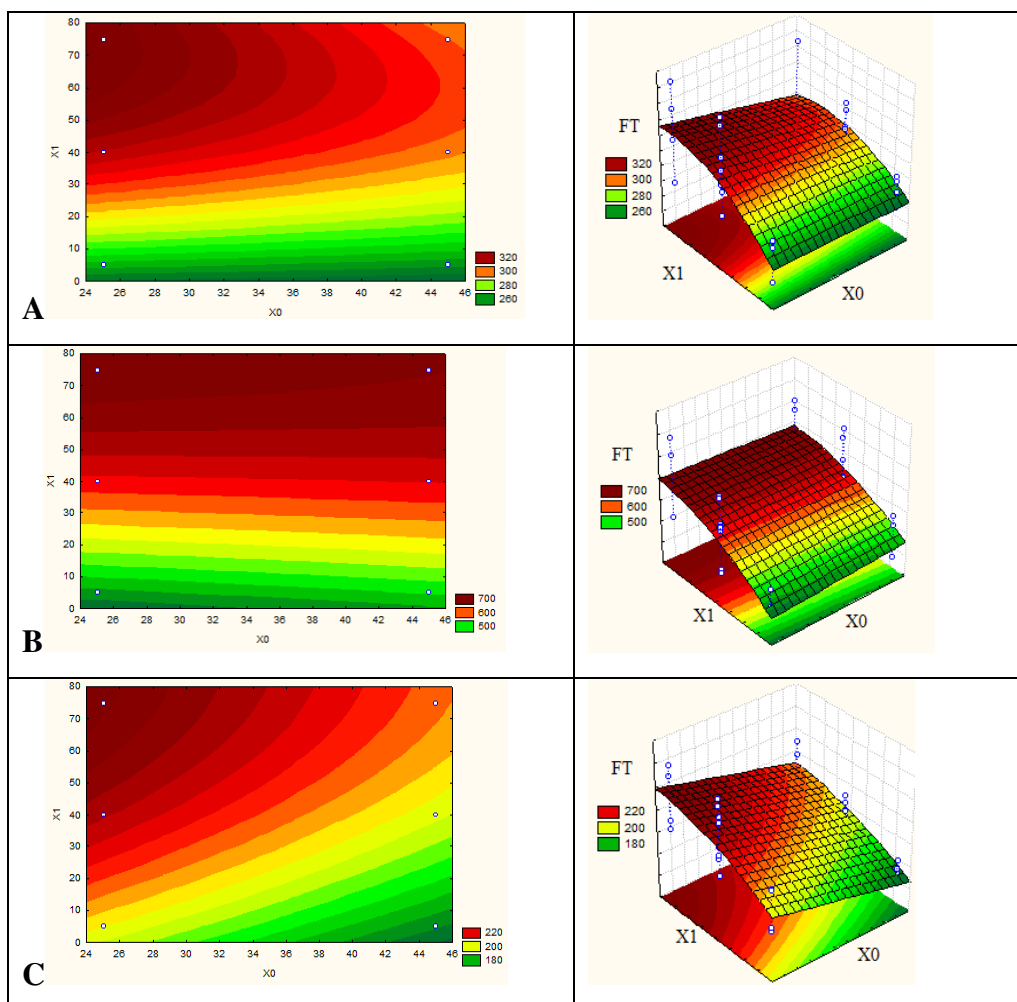


Figura 11. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X0 – frequência (kHz) e X1 – tempo (min).

A eficiência da extração assistida por ultrassom vem sendo extensivamente reportada por aumentar as taxas de extração dos compostos de interesse e diminuir o tempo de extração. Na presente pesquisa, o processo de extração foi conduzido variando o tempo entre 5 a 75 minutos para as três frutas em estudo. A partir dos gráficos de contorno e superfícies de resposta das Figuras 10, 11 e 12, observa-se que o efeito do tempo se mostrou positivo para a recuperação de fenólicos totais dos três frutos estudados, apresentando maiores taxas de extração a partir de 30 - 40 minutos, tendo melhores extrações em 75 minutos. A mesma tendência foi observada, para a extração de antocianinas totais de mirtilo e morango. Porém, o efeito do tempo mostrou-se prejudicial a extração de antocianinas totais de amora, que exibiu melhores recuperações em

tempos inferiores a 10 minutos. O efeito negativo do tempo de exposição do extrato ao tratamento ultrassônico pode ser devido a degradação e hidrólise dos compostos de interesse (BARAN; GOUD; DAS, 2017).

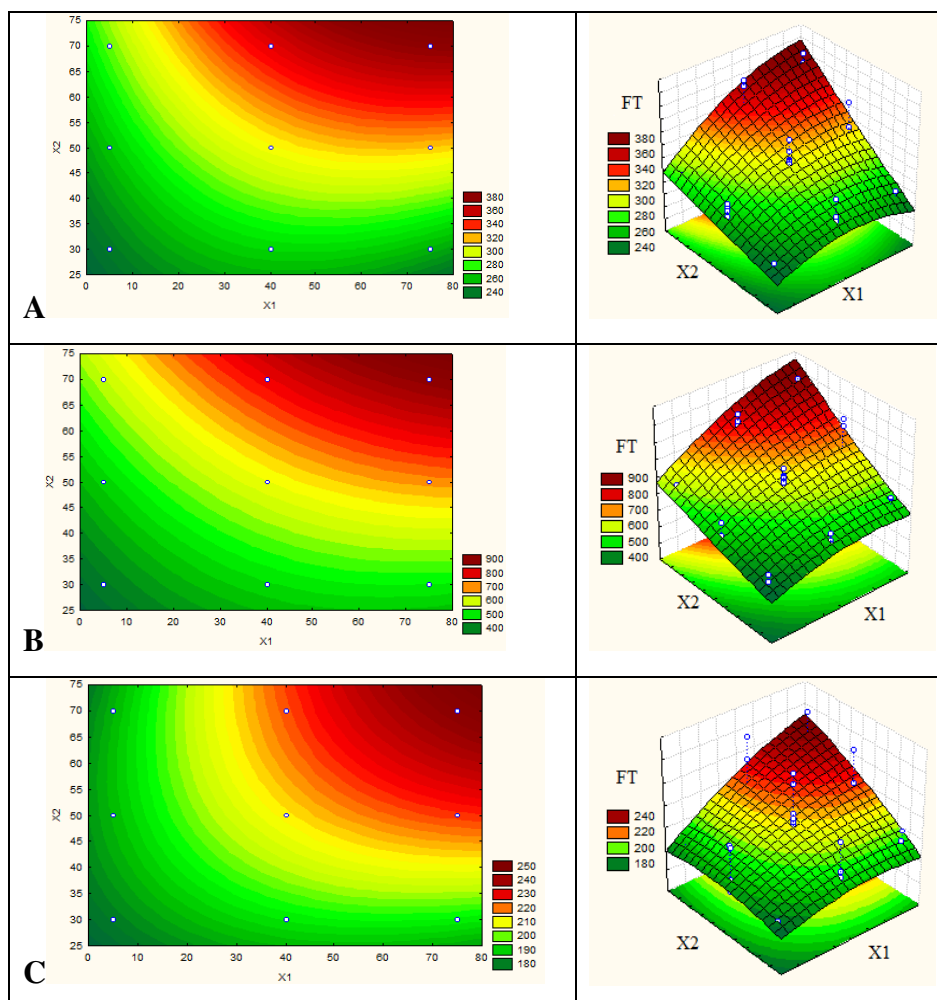


Figura 12. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de fenólicos totais (mg EAG /100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X2 – temperatura (°C) e X1 – tempo (min).

Geralmente, em uma extração sólido-líquido, o aumento da temperatura acarreta em maiores recuperações de compostos bioativos (DRANCA; OROIAN, 2016). Este efeito pode ser atribuído ao fato de que ao elevar a temperatura, aumenta-se os coeficientes de solubilidade e difusão dos compostos que serão extraídos bem como diminuirá a viscosidade do solvente, facilitando a transferência de massa do sistema (GOULA et al., 2017). Observou-se para os três frutos estudados (Figura 12), um aumento da recuperação de fenólicos totais, bem como um aumento na recuperação de antocianinas totais de amoras-pretas e morangos ao se elevar a temperatura, nas faixas de 60 - 70 °C, enquanto que o efeito da temperatura se mostrou

prejudicial para a extração de antocianinas totais do mirtilo (melhor extração na faixa de 30°C). Pois por outra via, temperaturas elevadas podem causar uma maior taxa de degradação dos compostos de interesse (DRANCA; OROIAN, 2016; HE et al., 2016).

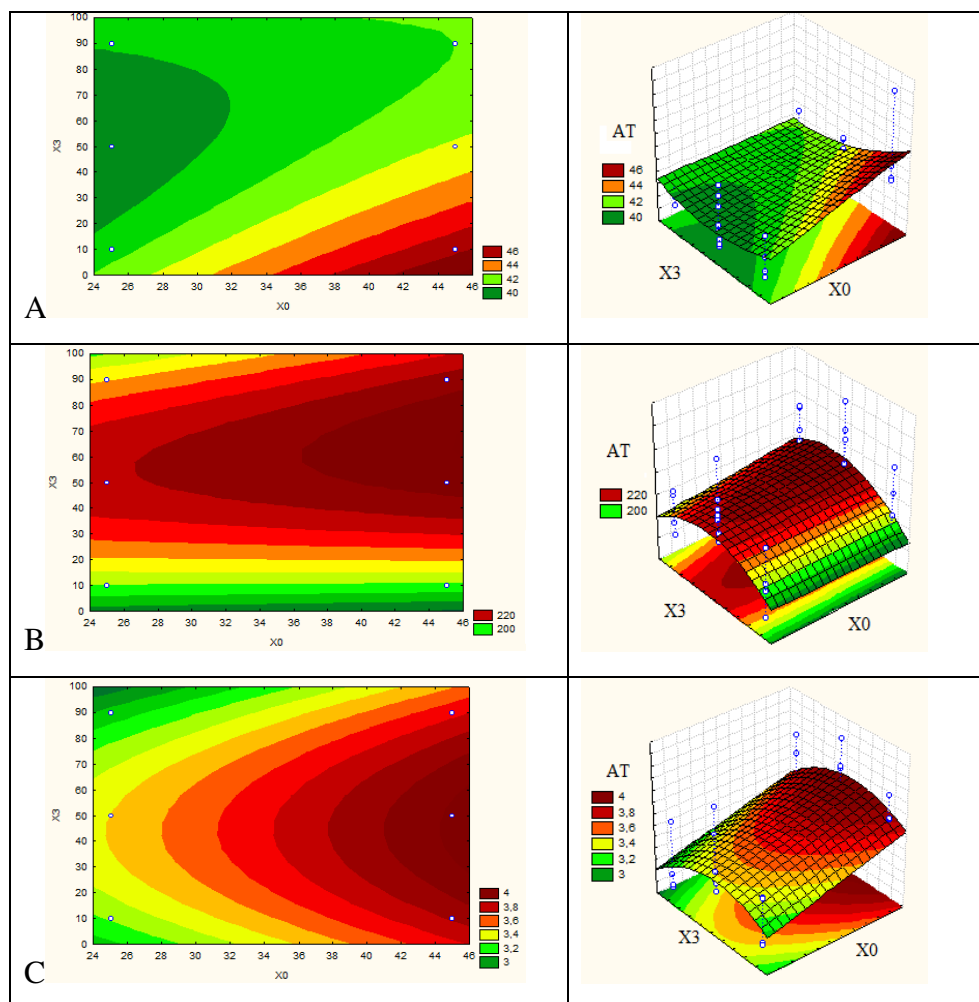


Figura 13. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de antocianinas totais (mg/100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (%W), X0 – frequência (kHz).

Nos frutos estudados observou-se que uma maior amplitude do poder ultrassônico, no intervalo de 60 - 90%, mostrou-se positiva para a recuperação de fenólicos totais de amora-preta, mirtilo e morango e para recuperação de antocianinas de mirtilo (Figuras 13 e 14). Porém, mostrou-se menos eficiente para a extração de antocianinas totais de amora-preta e morango (melhores extrações nas faixas de 10 - 30 %). De forma similar, Espada-Bellido et al. (2017) obtiveram uma maior recuperação de fenólicos totais do extrato de amora, em maiores amplitudes ultrassônicas. Ao elevar a amplitude, ocorre o aumento da cavitação e efeitos

mecânicos do ultrassom, que pode expandir a área de superfície de contato entre as superfícies sólidas e líquidas causando maiores penetrações do solvente na matriz celular. Porém, em maiores níveis de amplitude, os colapsos das bolhas de cavitação são mais violentos, rompendo fortemente as células das matrizes celulares, podendo degradar o material vegetal, tendo como consequência uma diminuição dos rendimentos de extração de alguns compostos (GOULA et al., 2017).

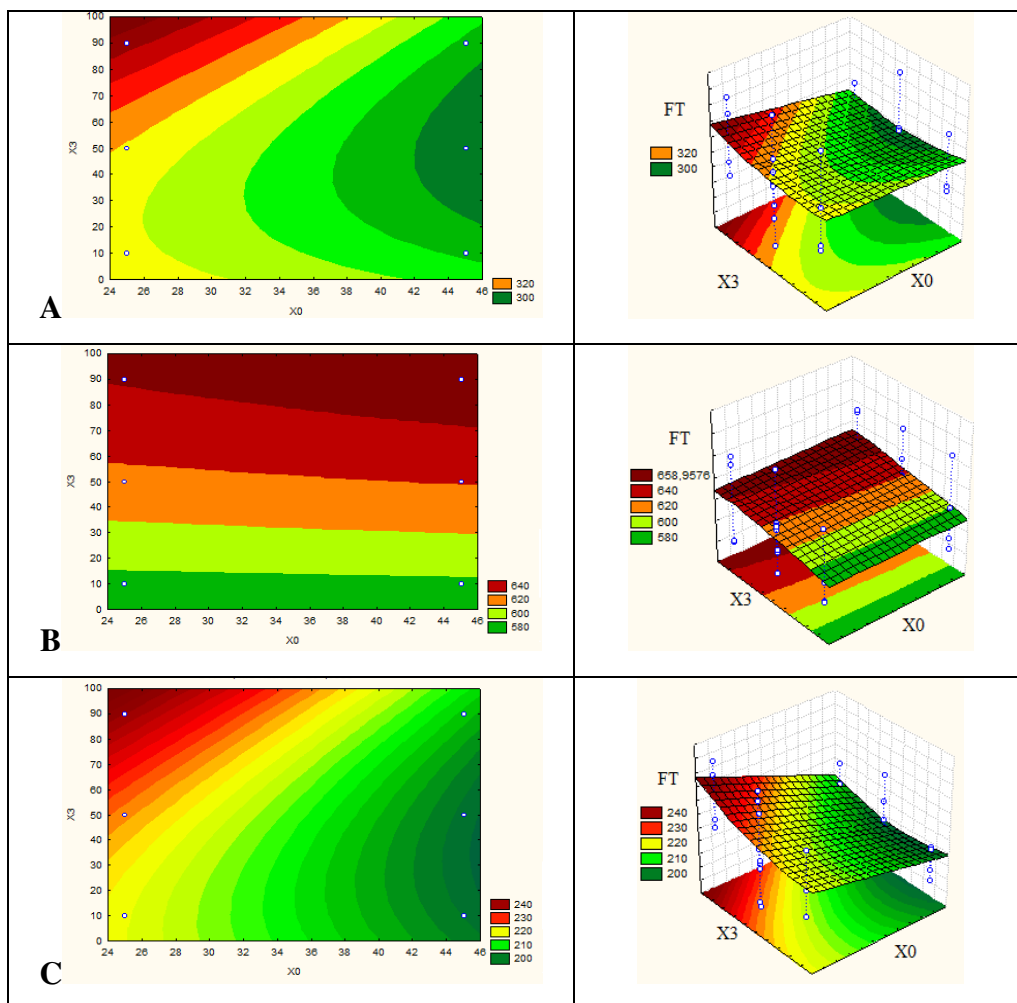


Figura 14. Gráficos de contorno (coluna esquerda) e superfícies de resposta (coluna direita) para o conteúdo de fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto) de amoras-pretas (linha A), mirtilo (linha B) e morango (linha C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (%W), X0 – frequência (kHz).

A ação da temperatura e da amplitude ultrassônica ao longo do tempo, são fatores que afetam diretamente a estabilidade das estruturas das antocianinas presentes nos extratos. De forma geral, o aumento do grau de hidroxilação no anel B (Figura 15) diminuem a estabilidade, enquanto que o maior grau de metilação no anel B, tendem a aumentar a estabilidade da

estrutura das antocianinas. A pelargonidina possui um substituinte hidroxil no anel B, enquanto a cianidina possui dois substituintes e a delphinidina possui três (CANUTO et al., 2016; DRANCA; OROIAN, 2016; KLIMAVICIUTE et al., 2015; SHARMA et al., 2016; SINELA et al., 2017). Assim sendo, a ordem crescente de estabilidade destas estruturas é delphinidina < cianidina < pelargonidina. Das antocianinas presentes no morango a pelargonidina-3-glicosídeo é a mais abundante, que dentre as três antocianinas não metiladas, é a mais estável, por conta disso, dos três extratos estudados o morango teve a combinação ótima de tempo e temperaturas mais altas, 75 minutos em 70°C e 10% de amplitude. Já nas amoras-pretas, a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo são geralmente as antocianinas majoritárias, que são menos estáveis e apresentou a melhor recuperação de antocianinas totais no tempo curto de 5 minutos mas em temperatura mais elevada de 60°C, e 10% de amplitude. O mirtilo possui um conteúdo complexo de diferentes estruturas de antocianinas, das metiladas destaca-se a malvidina-3-galactosídeo, petunidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glicosídeo, e das não metiladas destaca-se pelo conteúdo de delphinidina-3-galactosídeo, reconhecidamente menos estável o que contribuiu para a melhor recuperação de antocianinas totais ocorrer em 75 minutos sob temperatura mais baixa de 30°C e 90% de amplitude.

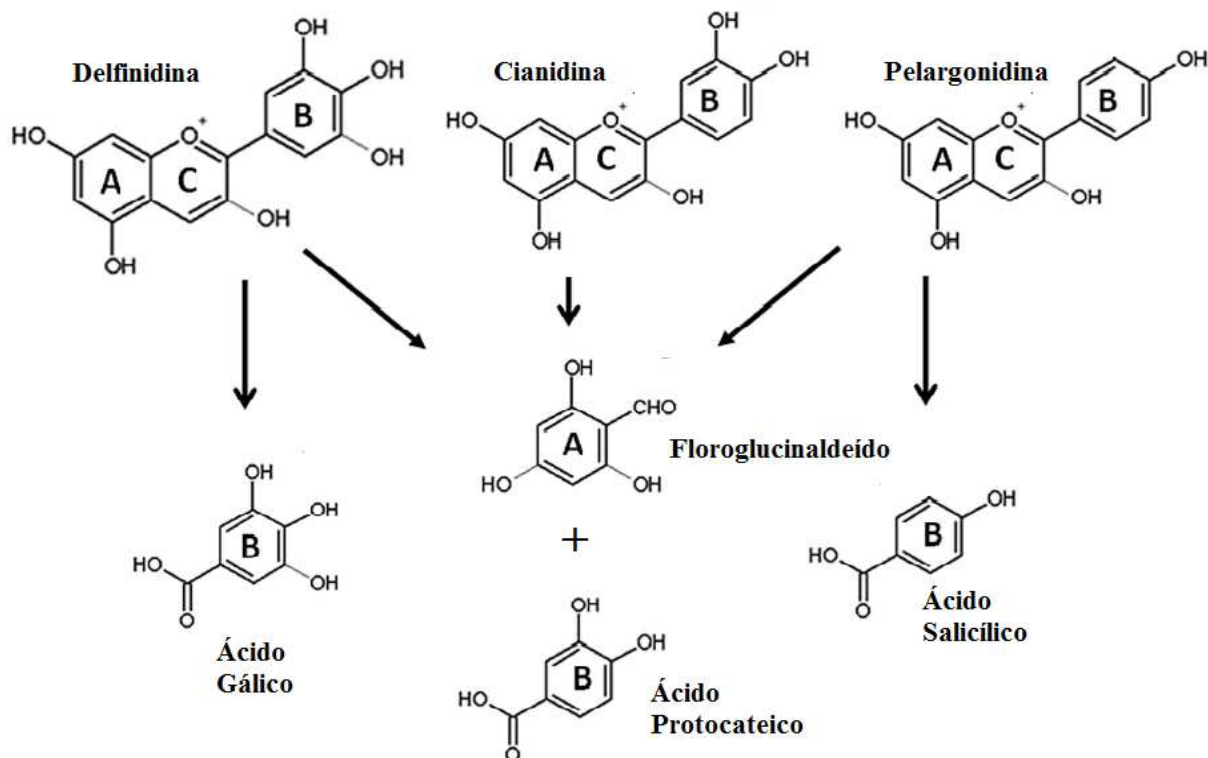


Figura 15. Mecanismo de degradação térmica da delphinidina, cianidina e pelargonidina, adaptado de Sinela et al. (2017)

Apesar da temperatura e a amplitude ultrassônica ao longo do tempo serem fatores que podem afetar a estabilidade das estruturas das antocianinas presentes do extrato, provocando a sua degradação, observou-se que para recuperação de fenólicos totais, a aplicação da temperatura de 70°C ao longo de 75 minutos, na amplitude do poder ultrassônico de 90%, mostrou-se a mais vantajosa para todas as frutas estudadas. Uma explicação para este fenômeno pode ser que ao degradar as antocianinas presentes no extrato, originam-se compostos fenólicos mais simples. A degradação da delphinidina, cianidina e pelargonidina, originam floroglucinaldeído mais ácido gálico, ácido protocateico e ácido salicílico, respectivamente (Figura 15) (SINELA et al., 2017).

Os fatores estudados foram ajustados no modelo de regressão linear da Equação 1, para a variável resposta antocianinas totais, apresentando valores do teste F significativo, falta de ajuste não significativo, e valores de R^2 , de 0,4785, 0,3244 e 0,5562 para amora-preta, mirtilo e morango, respectivamente. O baixo valor de R^2 mostra que as equações de regressão ajustadas para amora-preta (Equação 6), mirtilo (Equação 7) e morango (Equação 8) não se adequam ao modelo proposto (Equação 1).

$$y_1 = 28,03 + 0,5990X_0 + 0,0006715X_3^2 + 0,002580X_1X_2 - 0,00478X_1X_0 - 0,00231X_2X_0 - 0,00284X_3X_0 \quad \text{Equação 6}$$

$$y_2 = 254,3 - 3,369X_2 + 1,510X_3 + 0,04220X_2^2 - 0,00949X_3^2 + 0,00396X_1X_3 - 0,01062X_2X_3 \quad \text{Equação 7}$$

$$y_3 = 1,827 + 0,03086X_0 + 0,03205X_3 - 0,0001061X_1^2 - 0,0001698X_3^2 + 0,0003534X_1X_2 - 0,0001964X_1X_3 - 0,0001849X_2X_3 \quad \text{Equação 8}$$

Para a variável resposta fenólicos totais, os fatores estudados também foram ajustados no modelo de regressão linear da Equação 1, apresentando valores do teste F significativo, falta de ajuste não significativo, e valores de R^2 , de 0,9270, 0,9070 e 0,8199 para amora-preta, mirtilo e morango, respectivamente. Os altos valores de R^2 mostram que as equações de regressão ajustadas para amora-preta (Equação 9), mirtilo (Equação 10) e morango (Equação 11) se adequaram ao modelo proposto (Equação 1).

$$y_4 = 139,4 + 1,896X_0 + 1,282X_1 + 2,111X_2 - 0,01519X_1^2 + 0,004170X_3^2 + 0,2789X_1X_2 - 0,01888X_1X_0 - 0,03190X_2X_0 - 0,00912X_3X_0 \quad \text{Equação 9}$$

$$y_5 = 214,2 + 5,267 X_2 - 0,03010 X_2^2 + 0,07163 X_1 X_2 + 0,03928 X_1 X_3 - 0,01369 X_2 X_3 \quad \text{Equação 10}$$

$$y_6 = 180,1 + 0,8156 X_2 - 0,005910 X_1^2 + 0,002550 X_3^2 + 0,01417 X_1 X_2 + 0,00586 X_1 X_3 - 0,01884 X_2 X_0 - 0,008770 X_3 X_0 \quad \text{Equação 11}$$

Apesar dos modelos empíricos das Equações 6 – 11, não poderem descrever o fenômeno que governa os processos de ultrassom, elas podem ser utilizadas para determinar os efeitos da frequência, tempo, temperatura e amplitude do poder ultrassônico na capacidade de extração de antocianinas e fenólicos totais durante o processo de extração. Segundo Goula et al., (2017), modelos mecanicistas fornecem mais que um entendimento básico de um determinado sistema, mas servem de base para a extrapolação para que sejam aplicados em outros processos, como na indústria alimentícia.

A partir do perfil de desejabilidade (numa escala de 0-1) (Figuras 16-18), o rendimento ótimo do conteúdo de antocianinas totais pode ser alcançado na frequência de 45 kHz, no tempo de 5 min, na temperatura de 60°C e na amplitude de 10%, para o extrato de amora-preta, predizendo um conteúdo de 49,133 mg de antocianinas /100 g de fruto (d=0,66304), obtendo-se um valor experimental de 48,320 mg de antocianinas /100 g de fruto. Para o extrato de mirtilo o ponto ótimo é alcançado na frequência de 45 kHz, no tempo de 75 min, na temperatura de 30°C e na amplitude de 90%, predizendo um conteúdo de 260,49 mg de antocianinas /100 g de fruto (d=0,79072) obtendo-se um valor experimental de 263,19 mg de antocianinas /100 g de fruto. E para o extrato de morango o ponto ótimo é alcançado na frequência de 45 kHz, no tempo de 75 min, na temperatura de 70°C e na amplitude de 10%, predizendo um conteúdo de 4,5805 mg de antocianinas /100 g de fruto (d=0,79072), e foi observado um valor experimental de 4,055 de antocianinas /100 g de fruto.

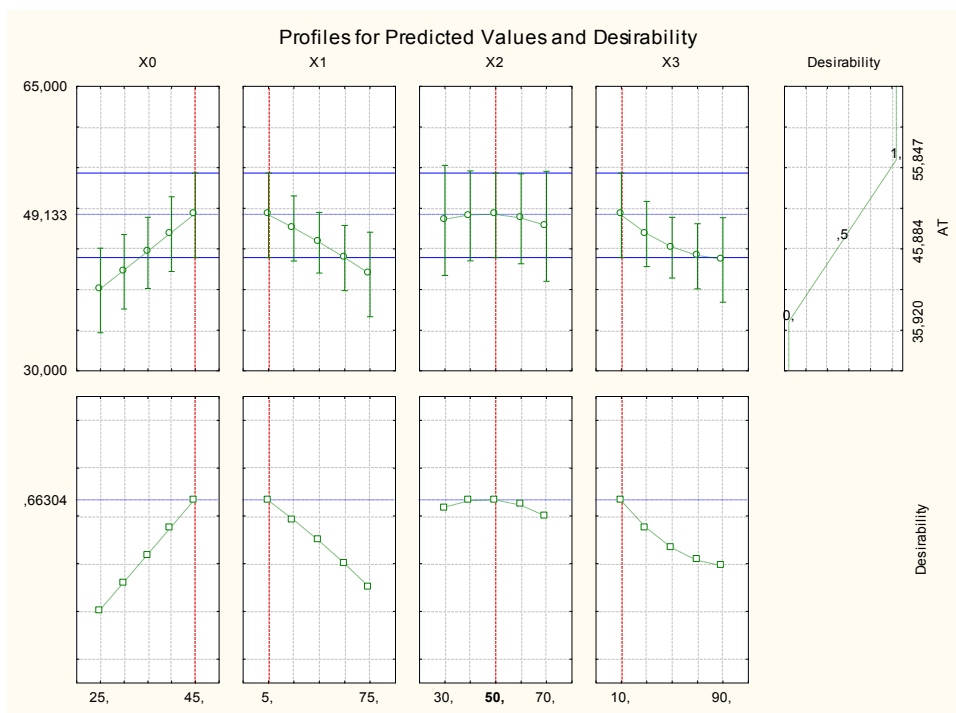


Figura 16. Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais de amoras-pretas (AT (mg/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).

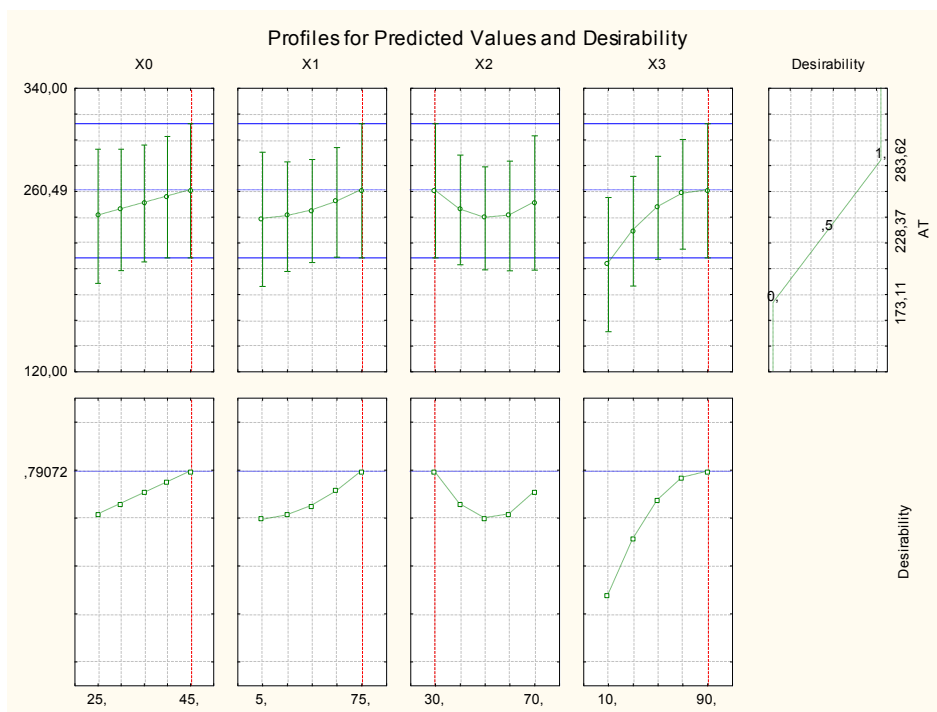


Figura 17. Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais de mirtilos (AT (mg/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).

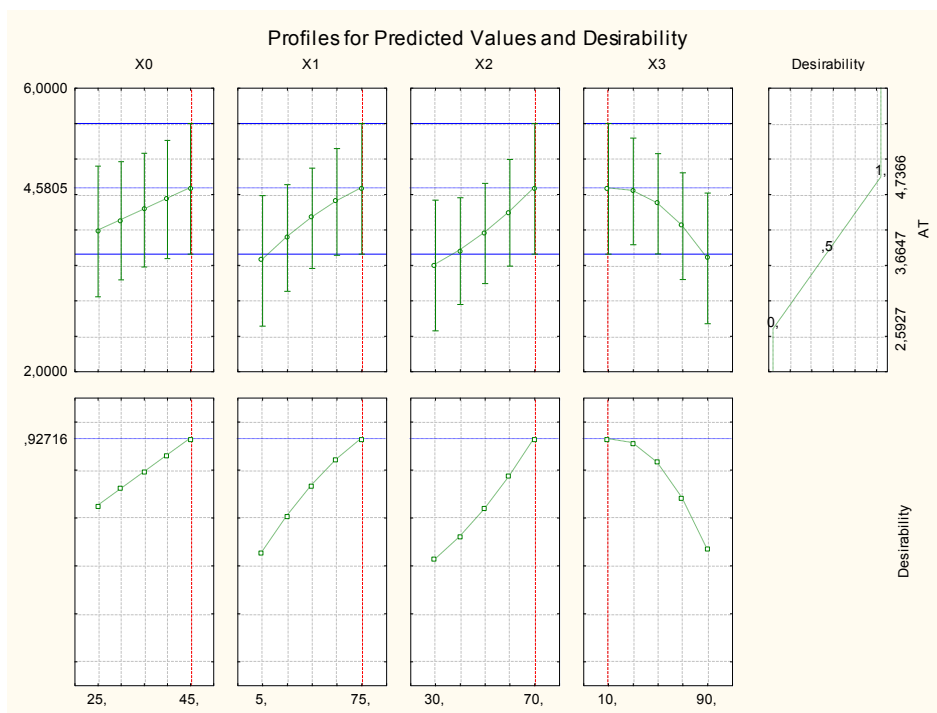


Figura 18. Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais de morangos (AT (mg/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).

No perfil de desejabilidade para o rendimento ótimo de compostos fenólicos totais ($d=1,00$ numa escala de 0-1), para as três frutas estudadas pode ser alcançado na frequência de 25 kHz, no tempo de 75 min, na temperatura de 70°C e na amplitude de 90%. Predizendo um conteúdo de 409,99 mg EAG /100 g do fruto, para o extrato de amora, 962,09 mg EAG /100 g do fruto para o extrato de mirtilo, e 284,18 mg de EAG /100 g de fruto, para o extrato de morango (Figuras 19-21). Foram observados os valores experimentais de 464,74 mg, 979, 15 mg, e de 291,04 mg EAG /100 g do fruto, para os conteúdos de fenólicos totais de amora, mirtilo e morango, respectivamente.

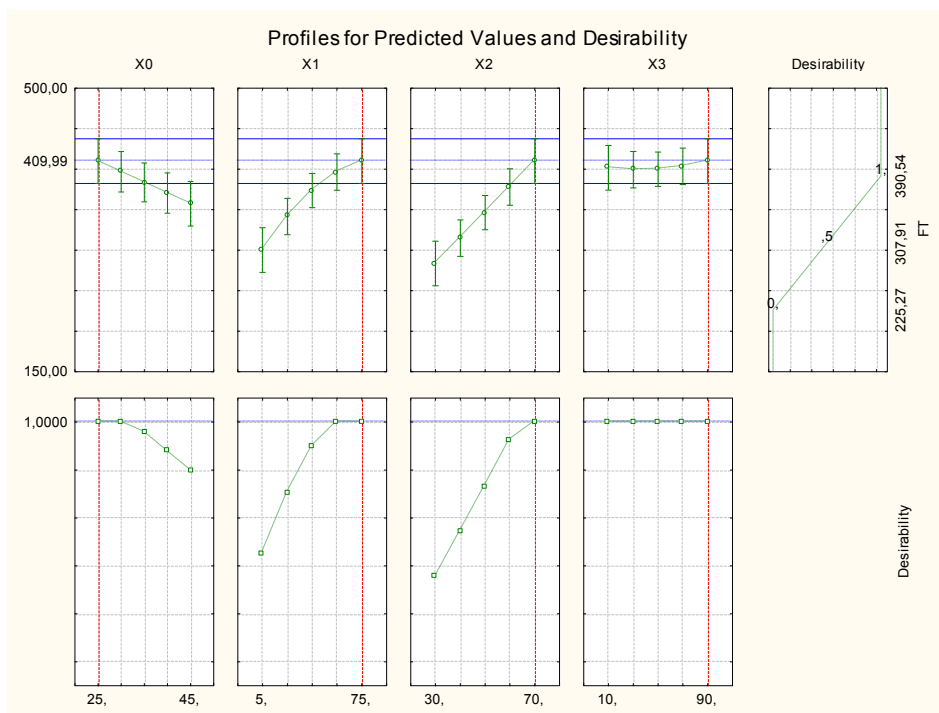


Figura 19. Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais de amoras-pretas (FT (mg EAG/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).

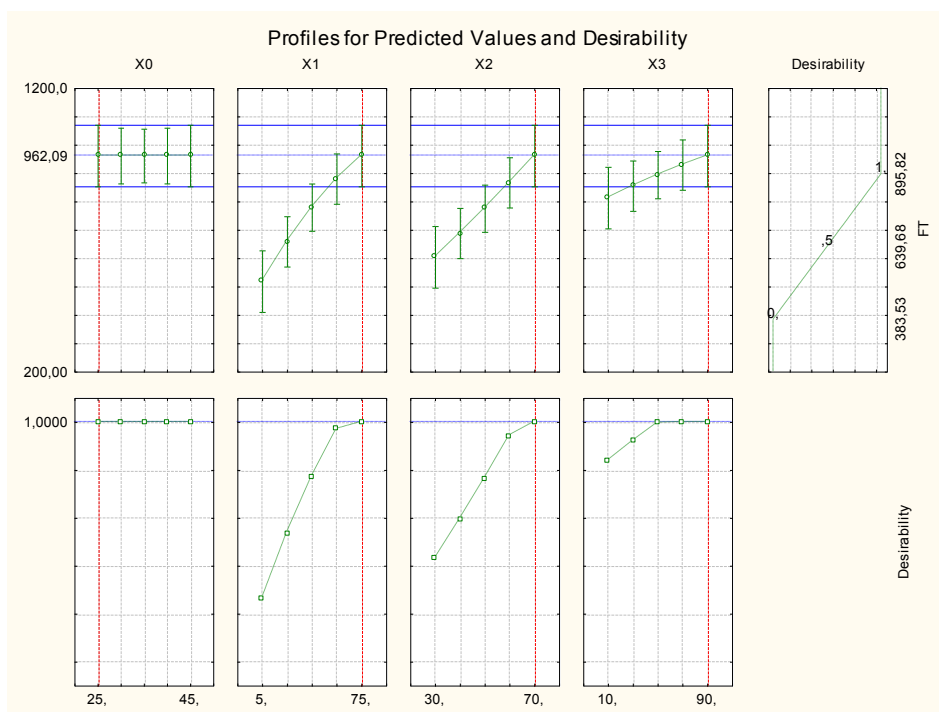


Figura 20. Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais de mirtilos (FT (mg EAG/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).

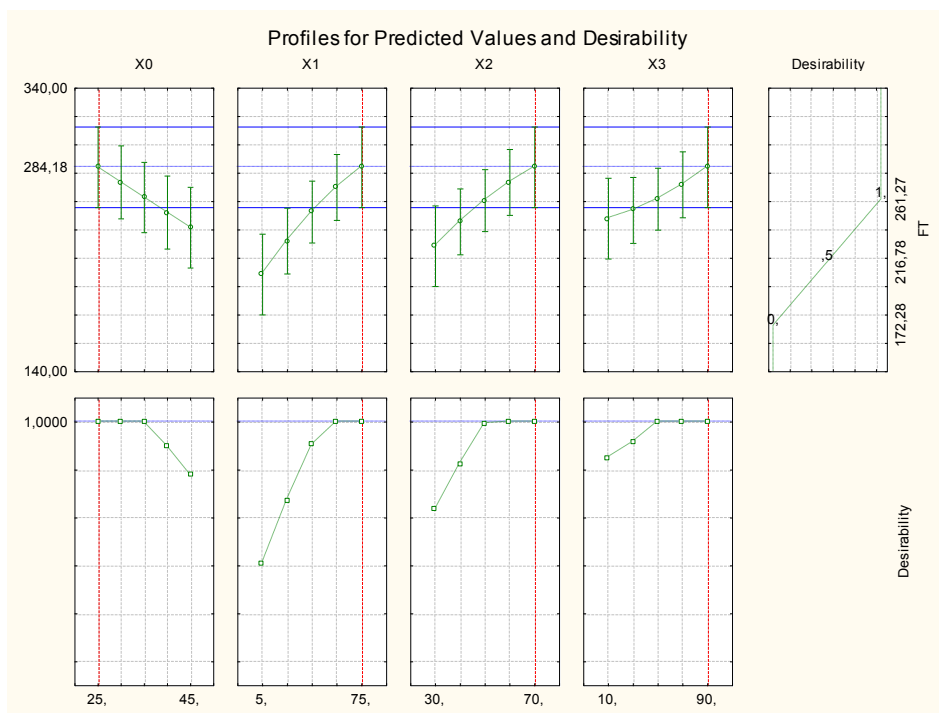


Figura 21. Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais de morangos (FT (mg EAG/100 g do fruto), X0 – frequência (kHz), X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C), X3 – amplitude do poder ultrassônico (% W)).

5.2. Estudo comparativo das extrações

A análise comparativa entre a EAU otimizada e o processo de extração convencional é mostrado nas Figuras 22 e 23. A condição ótima para a maior recuperação do conteúdo de antocianinas totais de amoras-pretas pode ser alcançado na frequência de 45 kHz, no tempo de 5 min, na temperatura de 60°C e na amplitude de 10 %W, no extrato de mirtilo o ponto ótimo é alcançado em 45 kHz, 75 min, 30°C e 90 %W, para o extrato de morango o ponto ótimo é alcançado em 45 kHz, 75 min, 70°C e 10 %W. Da Figura 22, observa que a EAU aumentou o rendimento da extração de antocianinas totais de forma significativa ($p < 0,05$) de amoras-pretas, mirtilos e morangos, com valores de $48,320 \pm 3,33$ mg, $263,19 \pm 12,5$ mg e $4,055 \pm 0,25$ mg / 100 g de fruto respectivamente, quando comparados com $30,78 \pm 1,22$ mg, $228,28 \pm 9,5$ mg e $2,099 \pm 0,01$ mg / 100 g de fruto respectivamente, obtidos pela extração convencional.

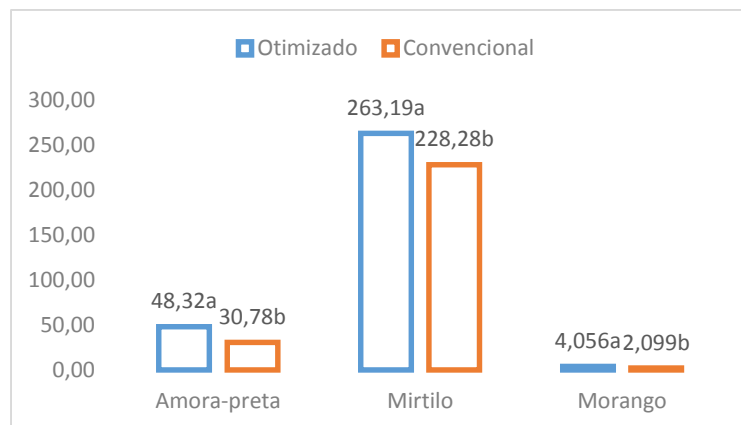


Figura 22. Comparação da EAU e extração convencional sobre os conteúdos de antocianinas totais (mg/100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango. Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Duncan.

Na otimização da EAU para a variável resposta fenólicos totais, a combinação simultânea ótima das variáveis estudadas foram a frequência de 25 kHz, no tempo de 75 min, na temperatura de 70°C e na amplitude de 90 %W, para todas as frutas. A partir da Figura 23, observa-se que a EAU aumentou o rendimento da extração de fenólicos totais de forma significativa ($p < 0,05$) de amoras-pretas, mirtilos e morangos, com valores de $409,99 \pm 7,47$ mg, $962,09 \pm 6,56$ mg e $291,18 \pm 1,72$ mg EAG/ 100 g de fruto respectivamente, quando comparados com $198,93 \pm 6,09$ mg, $418,37 \pm 3,18$ mg e $192,03 \pm 11,7$ mg EAG/ 100 g de fruto respectivamente, obtidos pela extração convencional.

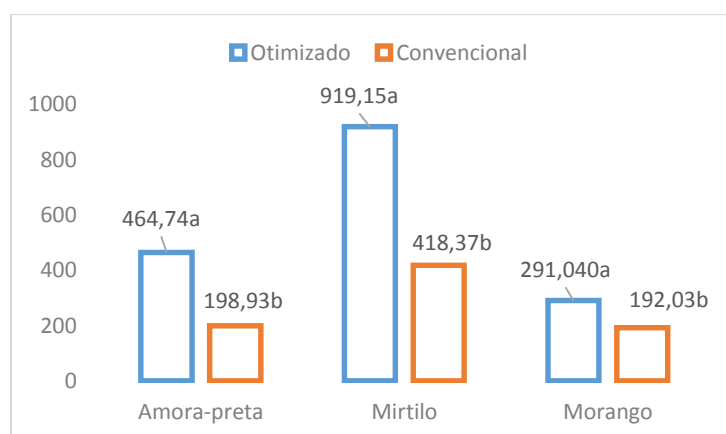


Figura 23. Comparação da EAU e extração convencional sobre os conteúdos de fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango. Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Duncan.

Torna-se evidente que os efeitos estudados (frequência, temperatura e poder ultrassônico ao longo do tempo) contribuíram de forma positiva para o aumento da taxa de

extração dos compostos de interesse. Na Figura 24 é perceptível a eficiência da extração assistida por ultrassom, pois a mesma aumentou o rendimento da recuperação de antocianinas totais em 57, 15 e 93% quando comparada com a extração convencional de amoras-pretas, mirtilos e morangos, respectivamente. Enquanto na recuperação de fenólicos totais, a EAU, proporcionou um aumento de 43, 46 e 66% quando comparada a extração convencional de amoras-pretas, mirtilos e morango, respectivamente.

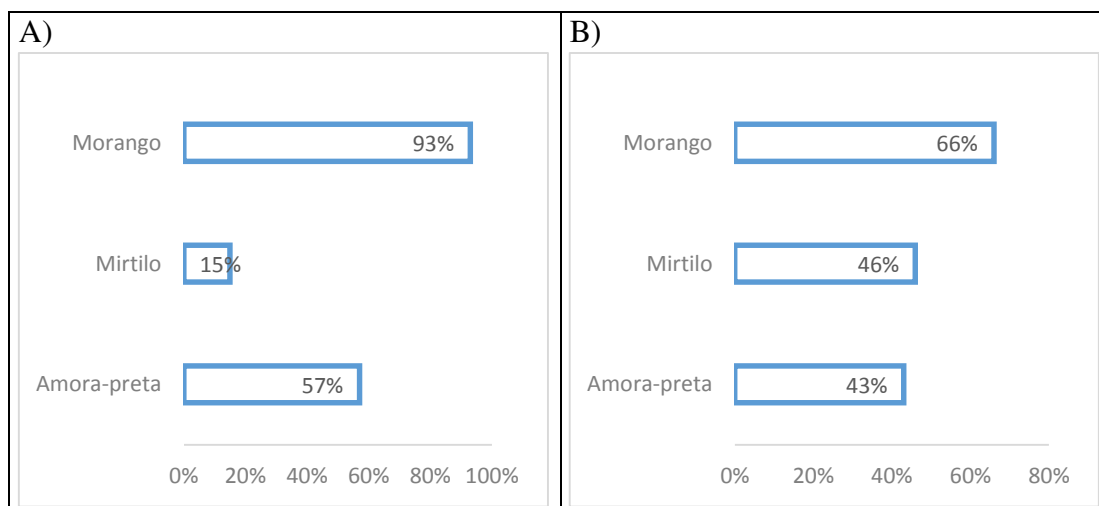


Figura 24. Aumento do rendimento da extração assistida por ultrassom, quando comparada a extração convencional. A) Nos conteúdos de antocianinas totais (mg /100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango. B) Nos conteúdos de fenólicos totais (mg EAG/100 g de fruto), de amora-preta, mirtilo e morango.

6. CONCLUSÃO

Na presente pesquisa, a metodologia de superfície de resposta e o delineamento em Box-Behnken foram empregados com êxito na otimização das variáveis estudadas para a extração de compostos fenólicos, a partir da amora-preta, mirtilo e morango. Os valores ótimos da frequência, tempo, temperatura e amplitude ultrassônica foram combinados simultaneamente para predizer o maior rendimento da extração de antocianinas e fenólicos totais dos três frutos estudados.

A EAU para amoras-pretas teve combinação ótima para a variável antocianinas totais na frequência de 45 kHz, no tempo de 5 min, na temperatura de 60°C e na amplitude de 10 %W, aumentando em 57% a recuperação de antocianinas, quando comparada a extração convencional. Já a combinação ótima para a variável fenólicos totais ocorreu em 25 kHz, 75 min, 70°C e 90 %W, promovendo um aumento de 43% na recuperação destes compostos, quando comparada a extração convencional.

A EAU para mirtilos teve combinação ótima para a variável antocianinas totais em 45 kHz, 75 min, 30°C e 90 %W, proporcionando o aumento de 15% na recuperação de antocianinas, quando comparada a extração convencional. Já a combinação ótima para a variável fenólicos totais ocorreu em 25 kHz, 75 min, 70°C e 90 %W, promovendo um aumento de 46% na recuperação destes compostos, quando comparada a extração convencional.

A EAU para morangos teve combinação ótima para a variável antocianinas totais em 45 kHz, 75 min, 70°C e 10 %W, proporcionando o aumento na recuperação de antocianinas de 93%, quando comparada a extração convencional. Já a combinação ótima para fenólicos totais ocorreu em 25 kHz, 75 min, 70°C e 90 %W, promovendo um aumento de 66% na recuperação destes compostos, quando comparada a extração convencional.

Desta forma, o estudo indica que a utilização da extração assistida por ultrassom para compostos fenólicos a partir das frutas vermelhas é uma metodologia eficiente.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L. E. . et al. Aspéctos técnicos da cultura do mirtilheiro. **Informe Agropecuário**, v. 33, p. 38–45, 2012.
- ANTUNES, L. E. .; FAGHERAZZI, A. .; VIGNOLO, G. . Morangos tem produção crescente. **Campo & Lavoura**, v. 1, p. 96–102, 2017.
- BARAN, A.; GOUD, V. V; DAS, C. Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa L.*) using ultrasound : A comparative analysis and phytochemical profiling. **Industrial Crops & Products**, v. 95, p. 332–341, 2017.
- BARBIERI, R. L.; VIZZOTTO, M. Pequenas frutas ou frutas vermelhas. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 7–10, 2012.
- BARNES, J. S. et al. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 23, p. 4728–4735, 2009.
- BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 554–560, 2010.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455–475, 1960.
- CANUTO, G. A. B. et al. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria spp.*) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. **Food Chemistry**, v. 192, p. 566–574, 2016.
- CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560, 2017.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.
- CHORFA, N.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. An efficient method for high-purity anthocyanin isomers isolation from wild blueberries and their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1226–1234, 2016.
- DING, Y. et al. Box-Behnken design for the optimization of nanoscale retrograded starch formation by high-power ultrasonication. **LWT - Food Science and Technology**, v. 67, p. 206–213, 2016.
- DRANCA, F.; OROIAN, M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena L.*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 637–646, 2016.
- ERCAN, S. Ş.; SOYSAL, Ç. Use of ultrasound in food preservation. **Natural Science**, v. 5, n. 8, p. 5–13, 2013.
- ESPADA-BELLIDO, E. et al. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23–32, 2017.

- FANG, J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. **Nutrition**, v. 31, n. 11–12, p. 1301–1306, 2015.
- FERRARI, C. C.; GERMER, S. P. M.; AGUIRRE, J. M. Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. **Drying Technology: An International Journal**, v. 30, p. 154–163, 2012.
- FERREIRA, J. L. et al. Biotecnologia aplicada às frutas vermelhas. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. May, p. 27–37, 2012.
- FIORINI, M. Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. v. 692, p. 213–219, 1995.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, n. August 2001, p. 0–13, 2001.
- GOULA, A. M. et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 821–830, 2017.
- GRIGORAS, C. G. et al. Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method. **Separation and Purification Technology**, v. 100, p. 51–58, 2012.
- HAJAZIMI, E.; LANDBERG, R.; ZAMARATSKAIA, G. Simultaneous determination of flavonols and phenolic acids by HPLC-CoulArray in berries common in the Nordic diet. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 128–134, 2016.
- HE, B. et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. **Food Chemistry**, v. 204, p. 70–76, 2016.
- HIRSCH, G. E. et al. Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 942–947, 2012.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.
- 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.
- KAUME, L.; HOWARD, L. K.; DEVAREDDY, L. The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. **Journal of Food Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5716–5727, 2012.
- KLIMAVICIUTE, R. et al. Complexes of dextran sulfate and anthocyanins from *Vaccinium myrtillus*: Formation and stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 70–78, 2015.
- LI, D.; MENG, X.; LI, B. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 1–7, 2016.
- LUO, L. et al. Preparative separation of grape skin polyphenols by high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 212, p. 712–721, 2016.

- O'DONNELL, C. P. et al. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 358–367, 2010.
- PELEGRINE, D. H. G. et al. Geleia de Mirtilo elaborada com frutas da variedade climax: desenvolvimento e análise dos parâmetros sensoriais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 3, p. 225–231, 2012.
- RASEIRA, M. DO C. B.; FRANZON, R. C. Melhoramento genético e cultivares de amora-preta e mirtilo. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 11–20, 2012.
- REBELLO, L. P. G. et al. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea×IAC 1398-21) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 354–366, 2013.
- ROCHA, J. C. G. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis M.*) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. **Food Science and Technology**, p. 1–9, 2017.
- SANG, J. et al. Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 218, p. 386–395, 2017.
- SARIBURUN, E. et al. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 4, 2010.
- SHARMA, R. J. et al. Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). **Food Chemistry**, v. 190, p. 808–817, 2016.
- SINELA, A. et al. Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry**, v. 214, p. 234–241, 2017.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.
- STÜLP, M.; GNAS, B. B. B.; CLEMENTE, E. Conservation and nutritional quality of blueberry treated with edible covering. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 4, p. 361–366, 2014.
- VALLS, J. et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143–7172, 2009.
- VIZZOTTO, M. Propriedades funcionais das pequenas frutas. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 84–88, 2012.
- VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus sp.*): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209–1214, 2011.
- WEBER, F.; BOCH, K.; SCHIEBER, A. Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 72–77, 2017.
- XU, Z. et al. Bioresource Technology Extraction of anthocyanins from red cabbage using high pressure CO₂. **BIORESOURTE TECHNOLOGY**, 2010.

ANEXO A

Tabela A 1. Respostas de AT (mg/100 g de fruto) e FT (mg EAG/100 g de fruto) dos extratos das três frutas estudadas.

CORRIDA	FREQUÊNCIA (KHz)	TEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	PODER (%W)	AMORA		MIRTILO		MORANGO	
					AT	FT	AT	FT	AT	FT
7	25	5	50	90	39,29	275,98	198,60	420,70	3,75	214,34
9	25	40	30	10	37,45	262,93	196,53	443,71	3,54	193,79
13	25	40	50	50	38,35	307,39	209,97	582,21	3,41	219,17
1	25	5	30	50	36,98	225,27	247,42	421,76	3,24	177,19
13	25	40	50	50	39,22	305,60	231,65	622,80	3,23	208,58
3	25	5	70	50	35,93	277,96	217,23	518,61	3,28	180,44
2	25	75	30	50	35,92	261,09	238,97	527,08	3,08	205,67
13	25	40	50	50	36,36	301,50	229,27	650,74	3,21	245,47
5	25	5	50	10	36,47	269,07	202,73	440,03	2,76	213,07
8	25	75	50	90	37,33	356,22	228,07	820,26	2,83	251,78
12	25	40	70	90	39,11	376,28	223,21	783,62	2,59	261,27
11	25	40	30	90	38,79	293,15	187,34	427,90	2,63	219,83
4	25	75	70	50	42,31	390,54	283,01	895,82	4,05	261,21
13	25	40	50	50	45,47	320,53	238,31	640,46	3,22	211,45
13	25	40	50	50	43,94	338,04	233,30	638,65	4,51	254,43

6	25	75	50	10	39,65	317,19	173,11	528,02	2,72	212,95
10	25	40	70	10	42,82	386,22	234,07	771,91	3,51	240,96
20	45	5	50	90	43,82	280,95	253,22	532,37	4,02	173,38
22	45	40	30	10	44,15	265,79	207,98	404,24	3,86	176,47
26	45	40	50	50	42,43	304,44	258,00	690,74	3,87	214,33
14	45	5	30	50	41,77	239,68	201,67	383,53	3,92	172,28
26	45	40	50	50	39,44	303,94	202,78	616,34	3,75	182,65
16	45	5	70	50	43,77	274,61	227,85	576,03	3,90	176,60
15	45	75	30	50	37,83	261,12	283,62	531,50	3,45	195,77
26	45	40	50	50	36,52	301,11	203,34	556,96	3,40	200,51
18	45	5	50	10	55,85	260,18	228,67	454,25	3,57	184,33
21	45	75	50	90	38,26	292,30	223,12	784,80	3,19	222,11
25	45	40	70	90	39,08	326,04	233,09	792,56	3,42	207,08
24	45	40	30	90	43,89	257,06	255,07	485,08	4,34	189,16
17	45	75	70	50	40,71	375,46	250,37	830,87	4,74	234,12
26	45	40	50	50	44,06	288,42	204,34	610,00	4,23	178,95
26	45	40	50	50	40,75	292,94	213,92	568,76	4,27	194,75
19	45	75	50	10	42,23	297,55	186,07	594,82	3,86	201,13
23	45	40	70	10	41,89	334,01	252,28	838,44	4,27	199,83

