



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA



# **Extração de compostos fenólicos da torta de girassol assistida por MEF e aplicação do extrato como antifúngico em morangos**

*Autor: Marina Amanda Collet*

*Orientador: Ligia Damasceno Ferreira Marczak*

Porto Alegre, dezembro de 18

## Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Símbolos	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 A cultura e a torta de girassol	3
2.2 Compostos fenólicos	5
2.2.1 Quantificação de compostos fenólicos	7
2.3 Métodos de extração de compostos fenólicos	8
2.3.1 Extração sólido-líquido convencional	8
2.3.2 Extração assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF do inglês Moderate Electric Field)	9
2.4 Morango	11
2.4.1 Fungos comuns em morangos	12
2.5 Agentes antifúngicos	14
3 Materiais e Métodos	16
3.1 Matéria-prima	17
3.1.1 Torta industrial – TortaInd	17
3.1.2 Torta obtida em laboratório – TortaLab	17
3.1.3 Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (SST)	18
3.2 Extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)	18
3.2.1 Extração assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF)	18
3.2.2 Extração exaustiva	20
3.2.3 Extração exaustiva da torta industrial em maior escala	20
3.2.4 Extração otimizada da torta obtida em laboratório	21
3.3 Concentração dos extratos	22
3.3.1 Concentração do extrato da torta industrial	22
3.3.2 Concentração do extrato da torta obtida em laboratório	22
3.4 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)	23
3.5 Aplicação dos extratos fenólicos em morangos	23
3.5.1 Aplicação dos extratos da torta industrial	24
3.5.2 Aplicação dos extratos da torta obtida em laboratório	25
4 Resultados	28
4.1 Extração assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF)	28

---

4.2	Caracterização das tortas – umidade e concentrações de CFT e SST	29
4.3	Capacidade antifúngica dos extratos aplicados nos morangos	30
4.3.1	Testes com extrato da torta industrial	30
4.3.2	Testes com extrato da torta obtida em laboratório	31
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	36
6	Referências	38
	Apêndice A – Fotografias dos morangueiros dos cultivares utilizados e suas respectivas estufas.	45
	Apêndice B – Fotografias dos morangos e tabela de observações diárias da primeira etapa de testes com os extratos da TortaLab (5, 7, 10 e 15 g CFT/L).	47
	Apêndice C – Fotografias dos morangos e tabelas de observações diárias da segunda etapa de testes com o ácido clorogênico (1 g CFT/L) e os extratos da TortaLab (0,5; 1 e 2 g CFT/L).	49
	Anexo A – Curva analítica do ácido gálico utilizado.	51

## **Agradecimentos**

Acima de tudo, agradeço à minha amada mãe Nilva (*in memoriam*), pelo imenso apoio e encorajamento aos estudos, pelo grandioso exemplo e pelas grandes memórias que deixou.

Ao meu admirável namorado Lucas Ranzan, pelo companheirismo e compreensão, e por todo suporte durante a graduação, em especial no decorrer deste trabalho.

À professora Ligia pela orientação neste trabalho e pelos importantes conhecimentos passados durante a graduação.

Aos meus sogros Iracema e Angelin, aos meus padrinhos Altair, Ivone e Ilze, e ao meu irmão Maicon, pelo incentivo, carinho e amparo nos momentos de dificuldade.

Aos meus amigos Pedro, Júlia e Alberto, pelos momentos de alegria, que tornaram esta jornada um pouco mais leve.

Aos colegas do LATEPA, e hoje amigos, Laura e Marcelo, pelo apoio, as conversas e o auxílio neste trabalho.

## Resumo

A torta de semente de girassol é um subproduto da indústria de extração de óleo intensamente explorado para alimentação animal devido ao elevado teor proteico. No entanto, a presença de compostos fenólicos reduz a digestibilidade das proteínas. Dessa forma, a extração desses compostos da torta de girassol é bastante relevante, melhorando a qualidade nutricional do concentrado proteico e recuperando compostos químicos de alto valor agregado. Tais compostos fenólicos, por sua vez, apresentam conhecido potencial antifúngico e podem auxiliar no combate de patógenos. No cenário agroindustrial brasileiro, a cultura do morango é uma atividade de grande relevância econômica e social, sendo o país o maior produtor do fruto na América Latina. As características físico-químicas do morango são favoráveis ao desenvolvimento de fungos, o que acarreta elevadas perdas na pós-colheita. Devido à crescente rejeição da população ao uso de agrotóxicos sintéticos, há real interesse pela obtenção de defensivos atóxicos de fontes naturais. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou estudar a extração de compostos fenólicos da torta de girassol assistida por campo elétrico moderado e caracterizar o potencial antifúngico dos extratos fenólicos aplicando-os sobre morangos na pós-colheita. A aplicação do campo elétrico de 100 V não apresentou efeito significativo sobre a cinética da extração, e a quantidade de compostos fenólicos totais extraída ao final do experimento foi estatisticamente igual ao experimento sem tensão aplicada (teste de Tukey com  $p < 0.05$ ). Para os testes com morangos, foram obtidos extratos fenólicos a partir de torta industrial e de torta preparada em laboratório. As concentrações fenólicas utilizadas para os extratos da torta industrial foram de 1 e 7 g/L, e para os da torta de laboratório foram de 0,5, 1, 2, 5, 7, 10 e 15 g/L. Também foi testada solução de ácido clorogênico puro a 1 g/L. Os morangos foram submersos individualmente nos extratos, na solução do ácido e em água destilada (controle), mantidos sob secagem forçada por 90 minutos, embalados e monitorados diariamente. Os testes em morangos utilizando extratos da torta industrial revelaram tendência positiva na ação antifúngica com a elevação da concentração, sendo os resultados do concentrado de 7 g/L visivelmente melhores que os obtidos para o grupo de controle. Entretanto, o oposto foi observado para os extratos da torta de laboratório. Para esses, um aumento de concentração, no geral, acarretou um maior desenvolvimento fúngico; apenas para o extrato de concentração 1 g/L houve melhora sutil quando comparado ao grupo de controle. O experimento com ácido clorogênico a 1 g/L apresentou resultado similar ao obtido com extratos de mesma concentração. A fim de caracterizar as tortas, foram realizadas análises gravimétricas para determinação da umidade, e cinéticas de extração exaustiva para quantificação fenólica. Ao observar comportamentos conflitantes entre os extratos das tortas, análises de grau Brix para determinação dos sólidos solúveis totais também foram realizadas. A torta industrial apresentou 2,06% de umidade e 27,7% de sólidos solúveis totais, enquanto a torta de laboratório apresentou 7,68% e 5,2% respectivamente. Para a extração exaustiva, a quantidade de compostos fenólicos totais obtida a partir da torta de laboratório foi 65% superior àquela obtida a partir da torta industrial. A torta de semente de girassol apresentou potencial como fonte para extração de compostos fenólicos, mas a sua aplicação como agente antifúngico foi contraditória. É indicado um estudo aprofundado de caracterização dos compostos do extrato, assim como um maior controle nas condições dos testes de potencial antifúngico, como a eliminação de patógenos aleatórios e introdução controlada de cepas selecionadas.

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial. Girassol. Campo elétrico moderado. Extração. Morango. Antifúngico. Extrato fenólico.

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Farelo de girassol – Produção e consumo mundial na safra 2016/17. ....	4
Figura 2.2: Estruturas moleculares do ácido cafeico e do ácido clorogênico. ....	6
Figura 2.3: Reação do ácido gálico em presença do molibdato (VI), componente do reagente de Folin-Ciocalteu. ....	7
Figura 3.1: Fotografia da máquina extratora de óleo caseira em operação. ....	17
Figura 3.2: Aparato experimental utilizado para as extrações assistidas por MEF; (A) célula ôhmica, (B) agitador magnético, (C) banho de aquecimento, (D) banho de resfriamento, (E) sistema <i>by-pass</i> , (F) estabilizador, (G) sistema de aquisição de dados, (H) variador de tensão manual e (I) computador. ....	19
Figura 3.3: Extratos obtidos a cada ponto da cinética da extração exaustiva. ....	20
Figura 3.4: Aparato utilizado para a extração no ponto ótimo. ....	21
Figura 3.5: Morangos na etapa de secagem; à esquerda os morangos imersos em extrato da torta industrial e à direita, em água destilada. ....	24
Figura 3.6: Morangos embalados e identificados sobre a bancada; à esquerda, o experimento controle e à direita, com extrato. ....	25
Figura 3.7: Fotografia dos morangos após a aplicação dos extratos fenólicos provenientes da TortaLab, sob secagem. ....	26
Figura 3.8: Bandejas de morangos identificadas após aplicação dos extratos fenólicos da TortaLab, no local de armazenamento. ....	26
Figura 4.1: Cinética da extração assistida por MEF, utilizando tensão de 100 V, comparada ao controle (0 V). ....	28
Figura 4.2: Curvas resultantes da cinética de extração para ambas as tortas. ....	29
Figura 4.3: Acima, fotografia da superfície superior dos morangos; abaixo, fotografia da superfície inferior; sendo à esquerda a bandeja controle e à direita a bandeja submetida ao extrato de 1 g CFT/L. ....	30
Figura 4.4: Acima, fotografia da superfície superior dos morangos; abaixo, fotografia da superfície inferior; sendo à esquerda a bandeja controle e à direita a bandeja submetida ao extrato de 7 g CFT/L. ....	31
Figura 4.5: Evolução do índice de infecção (I.D. %) em função do número de dias a partir da aplicação, para os morangos das bandejas imersos em extratos de 5, 7, 10 e 15 g CFT/L e controle. ....	32
Figura 4.6: Evolução do índice de infecção (I.D. %) em função do número de dias a partir da aplicação, para os morangos das bandejas imersos em extratos de 0,5, 1 e 2 g CFT/L, ácido clorogênico a 1 g CFT/L e controle. ....	33
Figura A.1: Fotografia dos morangueiros do cultivar Albion em sistema semi-hidropônico suspenso no dia da colheita (14/out/2018). ....	45
Figura A.2: Fotografia dos morangueiros do cultivar San Andreas em sistema semi-hidropônico suspenso no dia da colheita (14/out/2018). ....	45

---

Figura A.3: Fotografia das estufas de morangueiros; à esquerda plantação do cultivar Albion, à direita, do cultivar San Andreas (14/out/2018). .....	46
Figura B.1: Fotografias dos morangos no quinto dia. ....	48
Figura C.1: Fotografias dos morangos no quinto dia. ....	50
Figura Anexo.1: Curva analítica do ácido gálico, utilizando Folin 2 N, marca MediQuímica fab. maio/17, lote 18732/17. ....	51

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Girassol grão – Comparativo entre área, produção e produtividade nas safras 2015/16 e 2016/17. ....	3
Tabela 2.2: Classes de compostos fenólicos presentes em vegetais, exemplos e estruturas. ....	5
Tabela 2.3: Principais doenças fúngicas do morangueiro e agentes causais. ....	13
Tabela B.1: Observações diárias dos morangos com os extratos de 5, 7, 10 e 15 g CFT/L. ....	47
Tabela C.1: Observações diárias dos morangos com o ácido clorogênico a 1 g CFT/L e os extratos de 0,5; 1, e 2 g CFT/L. ....	49

**Lista de Símbolos**

$C_1$	concentração inicial
$C_2$	concentração final
I.D.	índice de doença
$m_{as}$	massa de amostra úmida
$m_{au}$	massa de amostra seca
$n_1...n_4$	número de frutos com o respectivo escore
R	número total de frutos por tratamento
$x_w$	umidade da amostra

### **Lista de Abreviaturas e Siglas**

CFT	Compostos Fenólicos Totais
HIPEF	<i>High Intensity Pulsed Electric Field</i> (Campo Elétrico Pulsado de Alta Intensidade)
LACIP	Laboratório de Controle e Integração de Processos
LATEPA	Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos
Mapa	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEF	<i>Moderate Electric Field</i> (Campo Elétrico Moderado)
MIPEF	<i>Moderate Intensity Pulsed Electric Field</i> (Campo Elétrico Pulsado de Moderada Intensidade)
PEF	<i>Pulsed Electric Field</i> (Campo Elétrico Pulsado)
RMD	Resistência a Múltiplas Drogas
SST	Sólidos Solúveis Totais
TortaInd	Torta Industrial
TortaLab	Torta Obtida em Laboratório

## 1 Introdução

Nas últimas décadas, a exploração de resíduos agroindustriais como fontes promissoras de compostos funcionais e nutricionais tem se intensificado. O Brasil é um país de grande atividade agrícola e, por consequência, um grande gerador de resíduos deste segmento, dos quais o aproveitamento é um fator de notável importância ambiental e econômica (ZARDO; FERREIRA, 2016).

Atualmente, o girassol é a quarta oleaginosa mais consumida no mundo. A partir de suas sementes, é extraído óleo com excelente qualidade industrial e nutricional, o qual é destinado, principalmente, às produções de óleo comestível e biodiesel. Ainda, o subproduto do processo de extração por prensagem, chamado “torta”, é rico em proteína bruta, sendo a quarta fonte proteica mais explorada para ração animal e alimentação humana (CASTRO et al., 1997; CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 2005).

As tortas de oleaginosas, entretanto, preservam alto teor de polifenóis, os quais dificultam a absorção de proteínas pelo organismo animal, conferindo característica antinutricional (SOARES, 2002; MATTHÄUS, 2002). Por outro lado, a presença de compostos fenólicos em vegetais vem sendo amplamente estudada devido às suas atividades farmacológicas e de inibição à oxidação lipídica e à proliferação de fungos (SOARES, 2002). Consequentemente, a recuperação destes compostos da torta de girassol alia duas importâncias: a obtenção de extratos bioativos de alto valor agregado e a melhora do valor nutricional dos concentrados e isolados proteicos.

A remoção dos compostos fenólicos da torta é um dos principais desafios da indústria de processamento de girassol (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2002). As técnicas convencionais de extração, além de provocar uma possível degradação térmica dos compostos fitoquímicos, geralmente demandam tempos longos (TAHA et al., 2011). Visando diminuir o tempo de extração, o consumo de solventes e a necessidade de elevadas temperaturas, bem como aumentar o rendimento do processo, novas técnicas de extração vêm sendo desenvolvidas (WANG et al., 2008), dentre elas a extração assistida por campo elétrico. Entretanto, até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados envolvendo sementes e os processos de campo elétrico (SARKIS, 2014).

Ainda no cenário agroindustrial, a crescente preocupação dos consumidores em relação à segurança dos alimentos e ao desequilíbrio ecológico vem acarretando restrição e rejeição ao uso de pesticidas sintéticos (LOEBLER et al., 2018; KIMATI et al., 2005). Neste sentido, além de benéficos à saúde, muitos dos compostos fenólicos extraídos de fontes naturais apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas as quais estão sendo exploradas para auxiliar no combate a pragas em lavouras ou na pós-colheita, em substituição ou sinergia com os antifúngicos atualmente utilizados, visando menor ou nenhuma toxicidade aos seres humanos aliada à viabilidade ecológica (ANSARI et al., 2013).

Uma das atividades consideradas de grande relevância econômica e social no Brasil é a cultura do morango. No cenário sul americano, o país ocupa o primeiro lugar entre os principais produtores desse fruto (ANTUNES et al., 2011), o qual é um dos frutos mais

consumidos *in natura* no mundo (GIAMPIERI et al., 2012). Entretanto, sua composição química o torna um substrato ideal para o crescimento de microrganismos (ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011), tornando-o um fruto facilmente perecível. Apesar de todos os cuidados, no Brasil as perdas na pós-colheita se encontram em torno de 40% das frutas comercializadas (SOARES, 2009), levando ao aumento de custos e, portanto, à redução dos lucros do produtor.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivos: (i) estudar uma técnica alternativa de extração de compostos fenólicos através da utilização de campo elétrico moderado aplicado sobre tortas de girassol e (ii) aplicar o extrato fenólico obtido a partir dessas tortas sobre morangos para avaliar seu potencial como defensivo orgânico antifúngico na pós-colheita. A combinação destes estudos estrutura um novo ciclo de processamento para sementes de girassol: melhoramento do subproduto proteico, extração de compostos de química fina de alto valor agregado, e uso final destes compostos como defensivos orgânicos em uma das culturas frutíferas mais importantes do Brasil.

Com base nisso, este trabalho está estruturado da seguinte forma: o Capítulo 2 apresenta uma revisão a respeito da cultura de girassol e a torta obtida a partir de seu processamento. Além disso, são abordados os compostos fenólicos, os métodos utilizados para sua quantificação e técnicas de extração destes compostos a partir da matriz vegetal, dentre elas a utilização de campo elétrico moderado como forma de obter o rompimento celular. Também é apresentada uma revisão sobre morangos e suas propriedades físico-químicas, os fungos mais comuns nestes frutos e agentes antifúngicos.

O Capítulo 3 descreve os materiais e métodos utilizados, abordando desde a obtenção da torta em laboratório, a caracterização das tortas utilizadas com relação à umidade, quantidade de compostos fenólicos totais e teor de sólidos solúveis totais no extrato obtido até as metodologias adotadas para extração e quantificação dos compostos fenólicos, os procedimentos seguidos para obter os extratos fenólicos concentrados, e métodos utilizados para aplicação destes extratos nos morangos bem como para a avaliação de suas infecções.

O Capítulo 4 apresenta e discute os resultados obtidos para os experimentos descritos no capítulo que o antecede, e o Capítulo 5 discorre a respeito das principais conclusões e sugestões para continuidade deste trabalho.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 A cultura e a torta de girassol

O girassol (*Helianthus annuus*) é uma dicotiledônea pertencente à família *Asteraceae*, nativa das Américas do Norte e Central, tendo como centro de origem o México. Seu cultivo no Brasil teve início no século XIX, na região Sul, estabelecido por colonizadores europeus, os quais consumiam as sementes torradas ou sob forma de chá rico em cafeína (ZHAO et al., 2011). Entretanto, somente a partir de 1988 essa cultura passou a ser plantada também na região centro-oeste do país, por apresentar boa tolerância à seca (DALL'AGNOL et al., 2005).

O Brasil ainda não apresenta grande expressão mundial na produção de girassol, representando aproximadamente 0,5% dessa; todavia, houve crescimento de 317% da produção nacional nos últimos cinco anos (USDA, 2018). A Tabela 2.1 apresenta os dados comparativos da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) sobre área, produção e produtividade de girassol grão nas safras 2015/16 e 2016/17.

Tabela 2.1: Girassol grão – Comparativo entre área, produção e produtividade nas safras 2015/16 e 2016/17.

REGIÃO/UF	Área (Em mil ha)			Produtividade (Em kg/ha)			Produção (Em mil t)			Área	Produção
	15/16	16/17	Var. %	15/16	16/17	Var. %	15/16	16/17	Var. %	(%)	(%)
<b>Centro-Oeste</b>	<b>41,2</b>	<b>40,8</b>	<b>-1,0</b>	<b>1.261</b>	<b>1.418</b>	<b>12,5</b>	<b>52,0</b>	<b>57,8</b>	<b>11,2</b>	<b>79,8</b>	<b>79,7</b>
MT	25,6	29,4	14,8	1.390	1.426	2,6	35,6	41,9	17,7	57,5	57,8
MS	1,3	1,3	0,0	1.236	1.575	27,4	1,6	2,0	25,0	2,5	2,8
GO	14,0	9,5	-32,1	1.000	1.302	30,2	14,0	12,4	-11,4	18,6	17,1
DF	0,3	0,6	100,0	2.500	2.500	-	0,8	1,5	87,5	1,2	2,1
<b>SUDESTE</b>	<b>7,0</b>	<b>7,0</b>	<b>0,0</b>	<b>952</b>	<b>1.326</b>	<b>39,3</b>	<b>6,7</b>	<b>9,3</b>	<b>38,8</b>	<b>13,7</b>	<b>12,8</b>
MG	7,0	7,0	0,0	952	1.326	39,3	6,7	9,3	38,8	13,7	12,8
SUL	3,3	3,3	0,0	1.339	1.626	21,4	4,4	5,4	22,7	6,5	7,4
RS	3,3	3,3	0,0	1.339	1.626	21,4	4,4	5,4	22,7	6,5	7,4
<b>CENTRO-SUL</b>	<b>51,5</b>	<b>51,1</b>	<b>-0,8</b>	<b>1.224</b>	<b>1.419</b>	<b>15,9</b>	<b>63,1</b>	<b>72,5</b>	<b>14,9</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>
<b>BRASIL</b>	<b>51,5</b>	<b>51,1</b>	<b>-0,8</b>	<b>1.224</b>	<b>1.419</b>	<b>15,9</b>	<b>63,1</b>	<b>72,5</b>	<b>14,9</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

Fonte: ANTUNES; CARVALHO; SANTOS (2011)

Atualmente, o girassol é a quarta oleaginosa mais consumida no mundo, estando atrás de soja, palma e canola. A partir de suas sementes, produz-se um óleo com excelente qualidade industrial e nutricional, sendo sua principal destinação o óleo comestível, seguido da produção de biodiesel. Ainda, o subproduto do processo de extração de óleo por prensagem, chamado “torta”, é explorado como fonte proteica, sendo a quarta opção para ração animal e alimentação humana - na forma de farinhas, concentrados e isolados proteicos. A cada tonelada de sementes, são extraídos, em média, 400 kg de óleo, 250 kg de casca e 350 kg de torta, a qual contém cerca de 45% a 50% de proteína bruta (CASTRO et al., 1997; CARRÃO-PANIZZI & MANDARINO, 2005). Além dessas destinações, as sementes sem processamento também são largamente utilizadas na alimentação de pássaros (CANUTO, 2017).

A semente de girassol, assim como de outras oleaginosas, possui minerais em sua composição, responsáveis por inúmeros benefícios à saúde. Dentre eles estão cálcio, fósforo, ferro, sódio, potássio, magnésio, manganês, selênio e zinco, sendo esses dois últimos considerados essenciais, devido ao fato de serem fundamentais para a atividade de algumas enzimas antioxidantes (CARDOZO; MAFRA, 2015; MUHAMMAD et al., 2012).

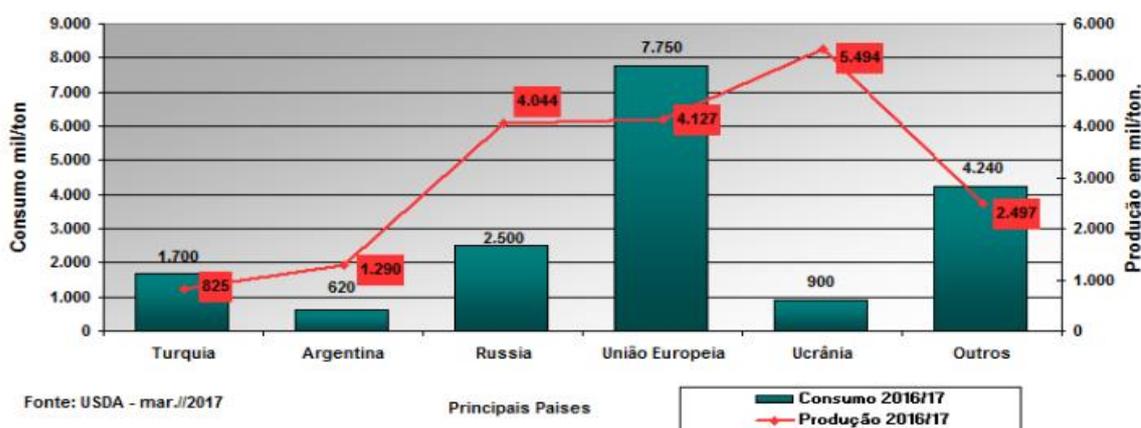
Seu fruto apresenta, ainda, grande quantidade de vitaminas do complexo B, tais como tiamina, riboflavina e biotina, além de vitaminas A e E. Também fazem parte da sua composição aminoácidos e carboidratos, bem como ácidos fenólicos, destacando-se o ácido caféico, o ácido ferúlico e o ácido clorogênico (encontrado em maior quantidade) (ZHAO et al., 2011). Também estão presentes os sesquiterpenos, importantes agentes de defesa contra pragas, além de detentores de propriedades farmacêuticas (MACÍAS et al., 2006).

Nos últimos anos, os resíduos agroindustriais - tais como bagaços, cascas, farelos e sementes de frutas e cereais - vêm sendo mais intensamente explorados como fontes de compostos funcionais, por serem ricos em proteínas, vitaminas e antioxidantes; além disso, há estudos para aplicação na produção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas e outros produtos bioquímicos. Desta forma, o uso de resíduos agroindustriais é um campo que tem se mostrado promissor, e o qual requer pesquisas interdisciplinares envolvendo tecnologia de alimentos, nutrição, agronomia e toxicologia, de modo a permitir aplicação em larga escala, com custo acessível e promoção da minimização de geração de resíduos (RAMACHANDRAN et al., 2007; SCHIEBER et al., 2001).

A obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos de produção de óleo se mostra promissora. De acordo com Matthäus (2002), estes resíduos da extração preservam alto teor de polifenóis, devido ao fato de que os ácidos fenólicos dificilmente se solubilizam na fase lipídica. Por conseguinte, a recuperação destes compostos da torta de oleaginosas, em especial o girassol, foco do presente trabalho, alia duas importâncias: a obtenção de extratos bioativos de alto valor agregado e a melhora do valor nutricional dos concentrados e isolados proteicos (SOUZA, 2013).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017), houve aumento tanto na produção quanto no consumo do farelo de girassol em decorrência da maior oferta do produto e do baixo preço, ocasionados pelo aumento da produção de grãos. A União Europeia é o segundo maior produtor mundial e o maior consumidor de torta de girassol, sendo responsável pelo consumo estimado de 43% da produção global (7,8 milhões de toneladas). A Figura 2.1 apresenta os valores de consumo e de produção referentes à safra 2016/17 no cenário mundial.

Figura 2.1: Farelo de girassol – Produção e consumo mundial na safra 2016/17.

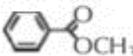
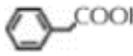
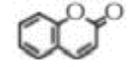
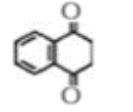
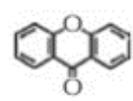
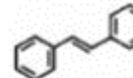
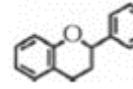


Fonte: USDA (2017, apud ANTUNES; CARVALHO; SANTOS, 2011)

## 2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza, estando presentes, principalmente, nos alimentos de origem vegetal. Sua estrutura molecular é formada por pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem, assim, estrutura variável, permitindo existir cerca de cinco mil fenóis catalogados (NACZK; SHAHIDI, 2006). Alguns destes estão presentes nos vegetais sob a forma de polímeros, dentre os quais estão os taninos e as ligninas. Os taninos conferem ao alimento a sensação de adstringência, já as ligninas conferem à planta rigidez e resistência mecânica. Os compostos não polimerizados estão divididos em dois grandes grupos: as cumarinas e os ácidos fenólicos (como ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e os flavonóides e derivados (neste grupo se encontram as antocianidinas, flavonas e flavonóis) (SOARES, 2002). De acordo com Harborne (1989), são as diferentes ligações dos flavonóides as responsáveis pela gradação de cores das flores. A Tabela 2.2 apresenta algumas das classes de compostos fenólicos presentes em vegetais e suas estruturas moleculares.

Tabela 2.2: Classes de compostos fenólicos presentes em vegetais, exemplos e estruturas.

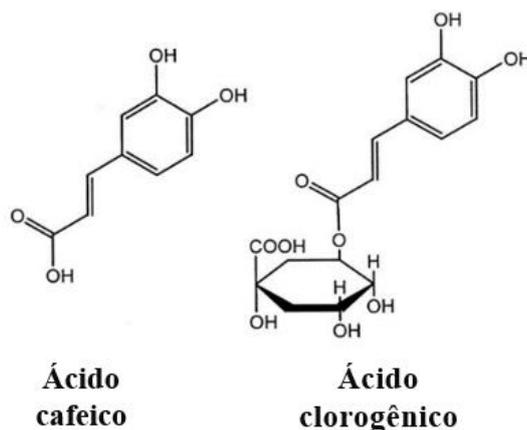
Número de carbonos	Esqueleto	Classificação	Exemplo	Estrutura básica
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	Ácido gálico	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas	Galacetofenona	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácidos fenilacéticos	Ácido p-hidroxifenilacético	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos	Ácido p-cumárico	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas	Esculetin	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	Juglona	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas	Mangiferina	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	Naringenina	

Fonte: adaptado de CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD (2007)

Dentre esses compostos, os ácidos clorogênicos - grupo de ésteres - são os mais abundantes nos alimentos. Fazem parte do grupo de ácidos clorogênicos os ácidos: isoclorogênico, neoclorogênico, criptoclorogênico e, o mais explorado deles: o ácido

clorogênico (ACG) (JOHNSTON et al., 2003; SOARES, 2002). Este é o principal composto fenólico nas sementes de girassol, constando também em pequenas quantidades os ácidos cafeico (AC), sináptico, cinâmico, felúrico, cumárico e ácidos hidroxicinâmicos (MIKOLAJCZAK et al., 1970; MILIC et al., 1968). Conforme apresentado na Figura 2.2, o ácido clorogênico é um éster formado pela junção do ácido cafeico com outro ácido, o ácido quínico (NARDINI et al., 2002).

Figura 2.2: Estruturas moleculares do ácido cafeico e do ácido clorogênico.



Fonte: adaptado de MORIDANI et al. (2001)

A presença dos compostos fenólicos em vegetais vem sendo amplamente estudada devido às suas atividades farmacológica, antinutricional, de inibição à oxidação lipídica e à proliferação de fungos (SOARES, 2002). Alguns destes compostos de baixa massa molar são empregados como antissépticos, como é o caso do timol (HARBORNE, 1989). Estudos epidemiológicos sugerem uma relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos, como café, erva mate, uva, tomate e maçã, e a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, dentre as quais constam câncer, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (GARAMBONE; ROSA, 2008). Adicionalmente, Sakamoto et al. (2003) observaram, tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*, que o ácido clorogênico é capaz de inibir a síntese da molécula 8-hidroxideoxiguanosina, um dos maiores agentes danosos ao DNA.

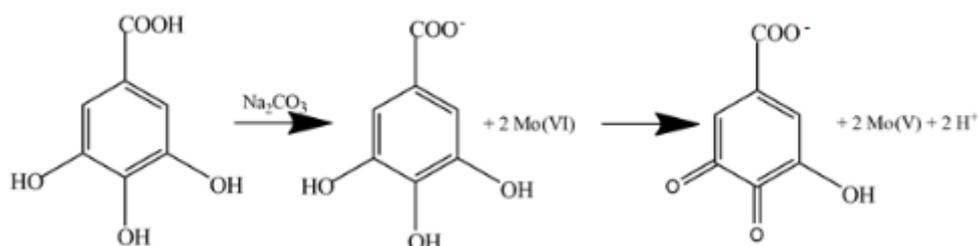
Geralmente os compostos fenólicos se encontram ligados a outras moléculas, como a açúcares (glicosídeos) e proteínas, podendo, porém, ser encontradas livres nos tecidos vegetais de maneira menos comum (SOARES, 2002). Provavelmente isso se deva ao fato de serem tóxicas quando neste estado e, ao menos em parte, detoxificadas quando ligadas. Essa característica confere à planta mecanismo de defesa contra pragas e predadores (HARBORNE, 1989). Estas substâncias, portanto, estão envolvidas em várias funções nos vegetais, conferindo propriedades sensoriais (sabor, adstringência, cor e aroma), estruturais e de defesa e nos processos de germinação, crescimento e reprodução. Devido a isso, são compostos essenciais para a fisiologia e o metabolismo das plantas (TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001).

### 2.2.1 Quantificação de compostos fenólicos

Muitos pesquisadores vêm trabalhando na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, mas diversos problemas metodológicos necessitam ser enfrentados. Isso decorre do fato de que esses compostos são, em sua maioria, de elevada polaridade, muito reativos e suscetíveis à ação enzimática, além de englobarem uma gama de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, ligninas, entre outras), (KING; YOUNG, 1999). Além desses fatores, estão também envolvidas a complexidade química da matriz e a presença de interferentes. Como consequência, a concentração exata de compostos fenólicos é difícil de ser determinada, sendo usualmente efetuada uma estimativa da concentração total desses, conhecida como “índice de polifenóis totais” (ARCHELA; DALL’ANTONIA, 2013).

Tradicionalmente, o termo “fenólicos totais” se refere às medidas realizadas por métodos espectrofotométricos, principalmente pelo método de Folin e Ciocalteu (1927, apud BLASCO et al., 2005), o qual fornece apenas o índice de polifenóis totais (BLASCO et al., 2005). Esse método foi desenvolvido originalmente para determinação de tirosinase, e o reagente utilizado consiste na mistura de sais de molibdato de sódio, tungstato de sódio e outros reagentes. No teste, o grupo fenólico deve estar na forma de fenolato, a fim de reduzir os íons molibdato e tungstato, os quais se encontram no estado de oxidação 6+, produzindo molibdênio azul e tungstênio azul, que apresentam estado de oxidação entre 5 e 6, conforme Figura 2.3. As moléculas oxidadas são posteriormente decompostas em pH alcalino. Por reagir com moléculas facilmente oxidáveis, este método encontra vários interferentes (ANGELO; JORGE, 2007; EVERETTE et al., 2010). Pesquisadores identificaram que o reagente de Folin e Ciocalteu reage, também, com moléculas como proteínas, carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, tiol, ácidos graxos insaturados, vitaminas, aminas, aldeídos e cetonas (EVERETTE et al., 2010).

Figura 2.3: Reação do ácido gálico em presença do molibdato (VI), componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: CANUTO (2017)

Apesar do método Folin-Ciocalteu ser o método de quantificação de fenólicos mais utilizado (SOUSA et al., 2007), outras técnicas e suas associações são empregadas para esta finalidade, a depender das moléculas de interesse. Archela e Dall’Antonia (2013) apresentam, em sua revisão a respeito da determinação de compostos fenólicos em vinho, algumas dessas metodologias, as quais são divididas entre métodos espectrofotométricos, cromatográficos, eletroquímicos e com uso de biossensores. Os autores concluem que, apesar dos grandes avanços, tanto em aparelhagem quanto em metodologias, muitas

melhorias ainda são necessárias para maior controle dos fenólicos pela indústria de alimentos, como maior seletividade, menor susceptibilidade a interferentes, menor custo operacional e maior rapidez, em virtude da complexidade química das matrizes alimentícias.

### **2.3 Métodos de extração de compostos fenólicos**

De acordo com González-Pérez et al. (2002), a remoção dos compostos fenólicos da torta, aspirando à produção de um concentrado proteico mais nutritivo e com conseqüente maior valor de mercado, é um dos principais desafios da indústria de processamento de girassol. Conforme explicam Silva et al. (2007), a composição de fenólicos nas fontes naturais é bastante diversa, assim como sua estrutura e propriedades químicas. Uma vez que não é possível a obtenção de um protocolo universal para extração, devem ser, portanto, elaborados e otimizados processos específicos para cada classe de compostos fenólicos.

A extração com solventes orgânicos é a metodologia mais adotada na recuperação de compostos fenólicos de vegetais e frutas. No entanto, é essencial o conhecimento da influência exercida por alguns fatores no desempenho da extração, como o tipo de solvente, a temperatura e o tempo (SOUZA et al., 2014).

#### *2.3.1 Extração sólido-líquido convencional*

A técnica clássica de extração de compostos nutracêuticos de tecidos vegetais utilizando solventes é baseada na associação de um solvente com a aplicação de calor e/ou agitação (WANG; WELLER, 2006). Esse processo pode ser realizado tanto em um único quanto em múltiplos estágios, havendo posterior separação e recuperação do solvente (FELLOWS, 2006).

Durante o processo de extração, a concentração de cada componente presente no tecido vegetal atinge o equilíbrio termodinâmico com aquela que se encontra dissolvida no solvente. Esse equilíbrio é caracterizado pelo “coeficiente de partição” - ou “constante de distribuição de equilíbrio” -, da qual um maior valor representa uma maior afinidade entre o solvente e o componente a ser extraído e, portanto, uma maior capacidade quantitativa do componente se dissolver no solvente. Esse coeficiente é função tanto das características do solvente e do soluto quanto da temperatura (CACACE; MAZZA, 2002).

A extração de compostos fenólicos a partir de vegetais objetiva liberá-los dos vacúolos através da ruptura destas estruturas ou a partir do processo de difusão (CACACE; MAZZA, 2002). No entanto, alguns desses compostos se apresentam em formas ligadas a outras moléculas, como proteínas e açúcares (glicosídeos) insolúveis, dificultando sua extração (SOARES, 2002). Portanto, para cada composto fenólico de interesse e tipo de tecido vegetal a partir do qual se deseja extraí-lo, são necessários estudos prévios dos possíveis parâmetros a serem otimizados visando a maximização de sua extração.

Em seu trabalho, Sarkis (2014) lista alguns desses parâmetros, os quais podem afetar na eficiência da extração, como: solvente, razão solvente-sólido, área superficial, viscosidade e taxa de escoamento do solvente e temperatura. A respeito do último parâmetro, observa-se, em alguns casos, a diminuição do rendimento da extração acima de determinada temperatura. Esse comportamento geralmente é associado à degradação dos compostos extraídos (POMPEU et al., 2009), porém pode estar, também, relacionado à desnaturação das membranas celulares – a qual ocorre em temperaturas entre 55 e 75°C (CACACE; MAZZA, 2002).

Para Taha et al. (2011), as técnicas convencionais de extração, além de provocarem uma possível degradação térmica dos compostos fitoquímicos, normalmente requerem tempos longos. Com a finalidade de diminuir o tempo de extração, o consumo de solvente e a necessidade de elevadas temperaturas, bem como de aumentar o rendimento do processo, novas técnicas de extração vêm sendo desenvolvidas (WANG et al., 2008), citando-se a extração assistida por campo elétrico.

### 2.3.2 *Extração assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF do inglês Moderate Electric Field)*

Em 1949 e 1958, Flaumenbaum e Zagorulko, respectivamente, registraram a aceleração do processo de extração devido ao rompimento das membranas celulares ao submeterem frutas e vegetais à aplicação de campos elétricos com correntes alternada e contínua. Esse fenômeno é, atualmente, chamado de “eletroporação das membranas” (GRIMI et al., 2011), e pode ser descrito como um aumento significativo na permeabilidade das membranas causado pela aplicação de pulsos elétricos externos e curtos (TSONG, 1991).

O modelo mais aceito para descrever o fenômeno de eletroporação é o de poro aquoso transiente, o qual explica que poros hidrofílicos são formados na camada lipídica da membrana celular quando esta é exposta a pulsos elétricos externos (KANDUSER; MIKLAVCI, 2009; TSONG, 1991). A eletropermeação pode ser afetada pela composição química do meio utilizado, pelas características da célula exposta ao campo elétrico e pelos parâmetros dos pulsos elétricos, dentre os quais os mais importantes são a amplitude, a duração, o número de pulsos e a sua frequência de repetição (BILSKA et al., 2000; LEBAR et al., 1998; ROLS; TEISSIÉ, 1990).

Adicionalmente, Grimi et al. (2011) citam a conclusão de Sale e Hamilton (1967) de que os dois parâmetros mais relevantes para determinar a eficiência do tratamento por PEF (do Inglês *Pulsed Electric Field*) são a intensidade do campo elétrico aplicado – moderada (MIPEF) a alta (HIPEF) - e o tempo total de exposição a ele, sendo que, em geral, o aumento do campo elétrico aumenta o dano causado às células pelo tratamento. Para Goettel et al. (2013), influenciam, também, na eficiência da eletroporação, a forma, a duração e o número de pulsos elétricos aplicados.

No entanto, no processo de MEF não são utilizados pulsos, mas corrente elétrica alternada de maneira contínua. A utilização de corrente elétrica alternada é análoga à utilização de pulsos, e o número de pulsos por segundo é dado pela frequência utilizada, sendo que a eletroporação é favorecida pela aplicação de baixas frequências -

normalmente em torno de 50 Hz (SENSOY; SASTRY, 2004). Tecidos vegetais, quando expostos a baixas frequências, estão sujeitos à dispersão dielétrica devido à relaxação de cargas na membrana celular, fenômeno que não ocorre em altas frequências (KULSHRESTHA; SASTRY, 2010). A aplicação de campo elétrico a baixas frequências proporciona maior tempo para a distribuição de cargas na membrana celular, o que pode vir a facilitar a eletroporação (KULSHRESTHA; SASTRY, 2003).

O campo elétrico moderado é um processo caracterizado pela utilização de campo elétrico de intensidade variando de 1 a 1000 V.cm<sup>-1</sup> com forma de onda arbitrável, com ou sem os efeitos de aquecimento ôhmico (SENSOY; SASTRY, 2004); além disso, de acordo com Zimmermann et al. (1974), é um método minimamente invasivo e capaz de evitar mudanças indesejáveis que são típicas de outras tecnologias como as térmicas, químicas e enzimáticas. Conforme Grimi et al. (2011), as técnicas convencionais de danificação celular visando recuperação de componentes de seu interior, como fragmentação, danos térmicos e químicos e tratamentos enzimáticos, levam a uma desintegração mais severa dos componentes do tecido, incluindo as paredes e as membranas celulares. Ainda, quando combinado um pré-tratamento elétrico a um processo de difusão, o tempo total de extração é reduzido. Segundo Lebovka et al. (2005), espera-se que essa tecnologia seja menos danosa que o calor para os componentes dos tecidos vegetais, como vitaminas, pigmentos e agentes de sabor e aroma.

Nas últimas décadas, vêm aumentando o número de pesquisas realizadas a respeito do impacto da tecnologia de campo elétrico na composição química dos alimentos, na extração de compostos e no rendimento de processos de prensagem, aplicações que oferecem inúmeras possibilidades para a indústria de alimentos (JAEGER et al., 2008). López et al. (2008) avaliaram a extração de compostos fenólicos utilizando a tecnologia de PEF durante a produção de vinho, demonstrando aumento da eficiência da extração nas etapas de vinificação e fermentação, mesmo em temperaturas moderadas (25 °C). Grimi et al. (2011) avaliaram o emprego da tecnologia para extrair o mesmo tipo de compostos a partir de suco de maçã, obtendo também ótimos resultados.

Entretanto, até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados envolvendo sementes e os processos de campo elétrico (SARKIS, 2014). Um destes poucos trabalhos foi realizado por Sarkis (2014), a qual utilizou tecnologias de campo elétrico pulsado e de descargas elétricas de alta tensão como pré-tratamentos ao processo de extração com solvente de alguns compostos da torta de gergelim. Seus resultados demonstraram eficácia no aumento dos rendimentos do processo para fenólicos totais, lignanas e proteínas.

## 2.4 Morango

A espécie de morango atualmente comercializada (*Fragaria x ananassa* Duch) foi identificada pelo botânico francês Antoine Nicolas Duchesne, sendo originada na França, a partir do cruzamento casual entre duas espécies americanas: *Fragaria virginiana* Mill (da América do Norte) e *Fragaria chiloensis* (Linnaeus) Duchesne (do Chile). Trata-se de uma planta pertencente à família das rosáceas, da qual também fazem parte outras espécies frutíferas de interesse econômico, como a macieira, a pereira e o marmeleiro (ANTUNES et al.).

Por definição botânica, *Fragaria x ananassa* Duch não é uma fruta verdadeira, mas um pseudofruto, pois se origina de uma única flor com vários ovários. Estes ovários se desenvolvem originando os frutos verdadeiros, ou aquênios, correspondentes aos pontos escuros do morango – popularmente chamados de sementes. Já o receptáculo floral é que dá origem à porção suculenta do morango, assim como ocorre na maçã e na pera, onde o fruto verdadeiro é a parte central endurecida que contém as sementes (ANTUNES et al., 2011; FILLINGER; ELAD, 2016).

Entre os pequenos frutos, o morango se destaca por ser o mais atraente e com maior procura nos mercados internacionais (LOEBLER et al., 2018); apresenta alto potencial de aproveitamento, sendo destinado tanto a consumo direto nas formas *in natura*, quanto à indústria, para processamento de polpas, geleias, caldas, sorvetes, iogurtes, sucos e sobremesas (ANTUNES et al., 2011). Em Portugal, o morango é o pequeno fruto mais cultivado e comercializado, sendo altamente apreciado não apenas devido ao sabor e aroma, mas também pela sua riqueza nutricional (rico em antioxidantes e sais minerais), baixo teor de lipídios (0,5%), baixas calorias (aproximadamente 35 kcal/100 g) e preço bastante acessível (LOEBLER et al., 2018; VERBEYST et al., 2010).

Este fruto apresenta, ainda, elevado teor de fibras, responsáveis por promover regulação intestinal e contribuir, assim, para prevenir doenças como desobstinação, cancro do cólon e diabetes (LOEBLER et al., 2018; VERBEYST et al., 2010). É, também, uma excelente fonte de vitamina C e muito rico em compostos fenólicos, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos (LOEBLER et al., 2018), sendo considerado, assim como a uva tinta e o mirtilo, uma das principais espécies em conteúdo de flavonóides (ANTUNES et al., 2011).

O morango é um dos frutos mais consumidos em forma *in natura* no mundo (GIAMPIERI et al., 2012), representando uma das culturas mais importantes economicamente (ANTUNES et al., 2015). Segundo o Serviço Nacional de Estatística Agrícola dos Estados Unidos (2017), esse país é o maior produtor mundial de morango, seguido pela Turquia e pela Espanha. Já no cenário sul americano, o Brasil ocupa o primeiro lugar entre os principais produtores de morango, com uma produção média de 30 t/ha (ANTUNES et al., 2015), sendo cultivados cerca de 3,5 mil hectares, fragmentados, em sua maioria, em pequenas propriedades rurais familiares. Isso torna seu cultivo uma atividade de relevância econômica e social (ANTUNES et al., 2011).

A produção comercial do morango é feita em vários estados brasileiros, com cultivares variadas, a depender da adaptabilidade ao clima (subtropical ou temperado) da região de

cultivo. Oito estados brasileiros destacam-se como os maiores produtores, estando entre eles o Rio Grande do Sul. No Brasil, o padrão varietal se concentra em um número reduzido de cultivares, sendo mais explorada na região Sudeste a variedade “Oso Grande”, e na região Sul as variedades “Camarosa”, “Aromas” e “Albion” (ANTUNES et al., 2011).

No livro “A cultura do morango”, Antunes, Carvalho e Santos (2011) explicam a respeito de doze diferentes variedades de morango. De acordo com os autores, a cultivar Albion foi lançada comercialmente pela Universidade da Califórnia (Davis) em 2004, sendo uma cultivar de dia neutro, resultante do cruzamento entre a variedade Diamante e outra originária da Califórnia, EUA. Sua planta é mais aberta, facilitando a colheita, e seu fruto tem sabor mais agradável que de outras variedades de dia neutro. Resultante do cruzamento entre Albion e uma outra seleção, tem-se também a cultivar San Andreas, lançada comercialmente em 2008 pela mesma universidade, sendo também uma variedade de dia neutro. O fruto tem como características sua superfície de um vermelho ligeiramente mais leve que a do Albion, polpa mais escura, e firmeza e sabor semelhantes. Segundo Husaini e Neri (2016) as variedades de dia neutro são menos sensíveis ao fotoperíodo (luz) em relação a plantas de dias curtos.

Por conter elevado percentual de água em sua composição, o morango é um fruto facilmente perecível e, portanto, deve ser colhido, embalado e colocado no mercado no menor tempo possível. A colheita deve ser realizada diariamente de forma manual, com uso de luvas para prevenir danos mecânicos e contaminação biológica nas frutas, e nas horas menos quentes do dia, pois o calor acelera o processo de deterioração da fruta. Após colhidos e embalados, os frutos devem ser imediatamente resfriados, a fim de diminuir a taxa de respiração, desacelerando a decomposição e permitindo sua conservação por maior período. A temperatura deve ser reduzida rapidamente (em poucas horas) para cerca de 5 °C; após, as bandejas devem ser colocadas em câmaras frias, à temperatura de 2 a 4 °C e umidade controlada de 90%, permitindo um período de conservação de 7 dias (ANTUNES et al., 2011). Apesar de todos esses cuidados, no Brasil as perdas na pós-colheita do morango, por todos os fatores, se encontram em torno de 40% das frutas comercializadas (SOARES, 2009).

#### 2.4.1 Fungos comuns em morangos

Devido ao elevado teor de água ( $\geq 90\%$ ), à quantidade de açúcares, ao baixo pH, à intensa atividade metabólica e às suas condições fisiológicas, o morango é um fruto altamente perecível na pós-colheita, suscetível a danos mecânicos e à invasão de agentes patogênicos, especialmente fungos, sendo necessário o uso de diferentes técnicas a fim de garantir a qualidade e o aumento de vida de prateleira (ESTECA, 2017; GIAMPIERI et al., 2012; MALGARIM et al., 2006; TOURNAS; KATSLOUDAS, 2005). Fungos, vírus, nematóides e bactérias são os principais responsáveis por doenças no morangueiro; ácaros e insetos como percevejo, besouros e pulgões também causam danos à cultura se não controlados adequadamente (ESTECA, 2017).

As principais doenças que afetam as frutas e a planta, e as quais estão entre os maiores responsáveis pelas perdas de morangos pré e pós-colheita, estão associadas a fungos: o *Rhizopus stolonifer*, origina a podridão aquosa; o mofo-cinzento, causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, leva ao apodrecimento das flores, frutas, folhas e cálices; a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., é caracterizada por manchas necróticas, deprimidas, de tonalidade escura, nos estolões, pecíolos, folhas e frutas, podendo ocasionar a morte da planta (ANTUNES et al., 2011; LOEBLER et al., 2018). A Tabela 2.3 apresenta as principais doenças fúngicas que acometem o morangueiro e os fungos responsáveis por cada uma delas.

Tabela 2.3: Principais doenças fúngicas do morangueiro e agentes causais.

<b>Doença fúngica</b>	<b>Agente causal</b>
Antracnose	<i>Colletotrichum</i> spp.
Mancha de Micosferela	<i>Mycosphaerella fragariae</i>
Mancha da Dendrofoma	<i>Dendrofoma obscurans</i>
Mancha de Diplocarpon	<i>Diplocarpon earlianum</i>
Podridão de Phytophthora	<i>Phytophthora cactorum</i>
Murcha de Verticillium	<i>Verticillium dahliae</i>
Oídio	<i>Sphaerotecha macularis</i>
Mofa cinzento	<i>Botrytis cinerea</i>

Fonte: ALMEIDA (2015)

O fungo *Botrytis cinerea* é um dos principais fitopatógenos de frutas e vegetais, incluindo alface, batata, berinjela, caqui, cebola, citros, feijão-vagem e girassol, sendo o responsável pela principal doença que acomete a cultura do morango (ANTUNES, 2018). Na presença de condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, as perdas pós-colheita podem ser elevadas, principalmente porque ele tem capacidade de se desenvolver dentro da embalagem durante o armazenamento. Em condições desfavoráveis, o fungo pode permanecer na forma de micélio dormente (GRABKE, 2014). Temperaturas moderadas (15 a 25 °C) são favoráveis ao desenvolvimento do fungo, porém, em temperaturas próximas a 0 °C, também é possível haver crescimento fúngico (AHLEM et al., 2012; GINDRO; PEZET, 2001), sendo a umidade o principal fator regulatório para o desenvolvimento da doença e a germinação de esporos, também chamados de conídios (KOIKE et al., 2006). Entretanto, para Kimati et al. (2005), a “flor preta”, causada por *Colletotrichum acutatum*, é considerada o principal problema fitossanitário da cultura do morangueiro, sendo capaz de infectar flores, frutos, folhas, meristemas apicais e parte superior do rizoma.

## 2.5 Agentes antifúngicos

As doenças de pós-colheita reduzem drasticamente a qualidade dos frutos, levando ao aumento de custos e, portanto, à redução dos lucros do produtor. Tradicionalmente, a gestão dos problemas microbiológicos e fisiológicos dos frutos durante o período pós-colheita se dá através da aplicação de fungicidas, refrigeração e utilização de atmosferas controladas (LOEBLER et al., 2018). Não obstante, por mais que sejam desenvolvidos novos agentes antifúngicos, o fenômeno de Resistência a Múltiplas Drogas (RMD) é o principal obstáculo associado à eficiência dos tratamentos. Uma vez que compostos sintéticos podem ser muito caros e ter efeitos tóxicos, compostos naturais que possam ser utilizados como agentes antifúngicos capazes de contornar a RMD com efeitos secundários adversos mínimos tornaram-se objeto de grande interesse (ANSARI et al., 2013).

A crescente preocupação dos consumidores em relação à segurança dos alimentos vem desencadeando restrição ao uso de fungicidas sintéticos e, assim, tem estimulado o estudo de métodos alternativos para o controle de doenças de pós-colheita e para a conservação da qualidade nutricional e organoléptica dos produtos hortofrutícolas (LOEBLER et al., 2018). Além do interesse por alternativas mais saudáveis aos seres humanos, outra meta é obter antifúngicos menos nocivos ao meio ambiente, visto que o intenso uso de defensivos vem acarretando desequilíbrio ecológico em diversas regiões agrícolas (KIMATI et al., 2005). Assim, na tentativa de minimizar o uso de agroquímicos, o sistema de produção adotado e normatizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), dá prioridade a métodos ecológicos (ANTUNES et al., 2011).

Para a pesquisa brasileira, há grande potencial de exploração de novos defensivos, naturais e menos nocivos. A flora nacional é considerada a mais rica do mundo, contando com cerca de 56 mil espécies de plantas e entre 12,5 e 13,5 mil espécies de fungos (PEIXOTO; MORIM, 2003). Os fungos são os microrganismos mais comuns no ambiente, e, apesar de muitos deles serem nocivos, ainda estão entre os patógenos mais negligenciados (ANSARI et al., 2013).

Substâncias de ocorrência natural podem ser uma alternativa para inibir o crescimento microbiano em morangos (REDDY et al., 2000). Entre os produtos naturais que têm sido estudados, encontram-se extratos de frutos e plantas aromáticas e medicinais, quitosanas e óleos essenciais (LOEBLER et al., 2018; REDDY et al., 2000), os quais têm despertado o interesse científico por conterem substâncias responsáveis pela proteção do vegetal: os metabólitos secundários, capazes de agir como defensores frente a uma gama de microrganismos (FILIPPI; FRIEDRICH, 2018). A grande diversidade desses metabólitos tem estimulado o interesse por sua extração para, posteriormente, avaliá-los quanto ao seu potencial antifúngico (AQUEVEQUE et al., 2016; LAGROUH et al., 2017).

Dentre os metabólitos secundários, tem-se entre os destaques o ácido clorogênico, de cuja ação antifúngica corresponde a uma das principais atividades biológicas mencionadas na literatura (KARACA, 2011; MARTÍNEZ et al., 2017). Segundo Martínez et al. (2017), sua concentração influencia para que este composto desempenhe ação fungicida ou

fungiostática sobre a germinação de conídios do *Botrytis cinerea*, por exemplo. Abaixo de 10 µg/µL de extrato, o ácido clorogênico pode desempenhar ação fungiostática frente a esse fungo. Sung e Lee (2010) explicam, ainda, que os ácidos fenólicos e flavonóides podem promover o rompimento da membrana celular e a disfunção das mitocôndrias fúngicas, atuando, dessa forma, principalmente sobre a membrana citoplasmática do fungo.

Em seu trabalho com aplicação de extrato de própolis para inibição de atividade fúngica em morangos no período pós-colheita, Loebler et al. (2018) obtiveram sucesso na inibição de *B. cinerea* e *Colletotrichum*, sendo que, quanto maior a concentração do extrato aplicado, menores foram os diâmetros dos micélios dos fungos nos testes *in vitro*. Além disso, foi observado que os frutos tratados com o extrato também apresentaram uma atividade antioxidante consideravelmente superior, acrescentando, assim, importantes benefícios nutricionais. Em outro trabalho utilizando extrato de *Physalis peruviana* como agente inibidor de *Botrytis cinerea* em morangos, Fillipi (2018) constatou que a aplicação do extrato nos frutos ainda verdes atua como uma camada protetora, reduzindo a capacidade do fungo em metabolizar os nutrientes dos morangos, mesmo com o avanço da maturação.

### 3 Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias empregadas para a obtenção da torta de girassol em laboratório, caracterização das tortas utilizadas, realização das extrações dos compostos fenólicos das tortas, concentração dos extratos e aplicação nos morangos, bem como equipamentos e métodos analíticos utilizados.

O presente trabalho foi majoritariamente desenvolvido no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e na Central Analítica, localizados no prédio do Anexo I – Saúde, no Campus Saúde, enquanto a última etapa do estudo, referente à aplicação dos extratos concentrados nos morangos, foi realizada no Laboratório de Controle e Integração de Processos (LACIP) e na Central Analítica, localizados no Campus Centro. Toda a estrutura é pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, situada na cidade de Porto Alegre.

O trabalho, a princípio, era voltado à utilização de torta de girassol proveniente de indústria de óleo; entretanto, no decorrer dos experimentos, a quantidade desta matéria-prima foi insuficiente. Devido ao fato de se tratar de um cultivo de verão na região Sul do país, as indústrias contatadas não possuíam torta, com previsão de produção apenas a partir de dezembro/2018. Por conseguinte, a alternativa encontrada foi produzir a torta de girassol em laboratório.

Isto posto, o estudo passou a compreender, na ordem em que seguem, as seguintes etapas:

- 1) teste da metodologia de extração de compostos fenólicos totais assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF) em torta industrial (denominada doravante TortaInd);
- 2) extração exaustiva e concentração dos extratos a partir da TortaInd;
- 3) aplicação dos extratos obtidos a partir da TortaInd em morangos;
- 4) obtenção de torta em laboratório (doravante denominada TortaLab) e determinação de sua umidade;
- 5) comparação entre as tortas industrial e de laboratório através das curvas cinéticas da extração exaustiva;
- 6) extração otimizada e concentração dos extratos a partir da TortaLab;
- 7) aplicação dos extratos obtidos a partir da TortaLab em morangos;
- 8) determinação dos Sólidos Solúveis Totais presentes nos extratos de ambas as tortas (grau Brix).

### 3.1 Matéria-prima

#### 3.1.1 Torta industrial – TortaInd

A torta de girassol utilizada foi gentilmente fornecida pela empresa Pazze Indústria de Alimentos LTDA (Panambi, RS, Brasil), sendo um subproduto do processo de extração de óleo por prensagem a frio das sementes de girassol parcialmente descascadas. Uma vez no LATEPA, essa torta foi moída em moinho (MF 10, IKA®, Werke, Staufen, Alemanha) e peneirada em malha de 20 *mesh* (0,85 mm). Após o preparo, houve separação em porções menores, as quais foram embaladas a vácuo e armazenadas em temperaturas inferiores a 5 °C, permanecendo assim até o uso. Esse preparo foi realizado por alunos do laboratório anteriormente ao início deste trabalho, os quais haviam, adicionalmente, determinado a umidade da torta, para a qual o valor obtido foi de 2,06%. Este valor é de conhecimento necessário para o cálculo da quantidade de compostos fenólicos totais (CFT) presente na torta (massa de CFT por massa de torta em base seca).

#### 3.1.2 Torta obtida em laboratório – TortaLab

Para a obtenção da torta em laboratório, optou-se por utilizar sementes de girassol sem casca, de modo a obter extratos com maior concentração de compostos fenólicos totais. Esta decisão teve como embasamento o estudo realizado por Canuto (2017), no qual a autora comparou o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e de flavonas e flavonóis (CTFLA) em extratos metanólicos obtidos a partir de sementes sem casca, cascas e sementes com casca para três diferentes tipos de cultivares (BRS 387, BRS 324 e BRS 122).

As sementes de girassol descascadas foram adquiridas na Banca Macrobiótica Sauer, localizada no Mercado Público de Porto Alegre, e o equipamento utilizado para extrair o óleo das sementes foi a Extratora de Óleo Gourmet By Chef Erick Jacquin (Home Up, modelo MQO 001, China). A Figura 3.1 apresenta a máquina extratora em operação, com indicações dos compartimentos de entrada e saída.

Figura 3.1: Fotografia da máquina extratora de óleo caseira em operação.



A fim de determinar o rendimento, as sementes foram pesadas antes de serem submetidas à extração, sendo a torta obtida também pesada ao final do processo, e o rendimento atingido foi de aproximadamente 50%. Após, foram separadas e embaladas a vácuo pequenas porções da torta, as quais permaneceram refrigeradas até o uso.

A umidade da torta obtida foi determinada pelo método gravimétrico, conforme metodologia AOAC (1990). Procedeu-se com a pesagem, em quadruplicata, em balança analítica com precisão de 0,0001g (SHIMADZU, modelo AY220, Brasil), de 5 g de amostra de torta em cápsulas de alumínio previamente secas e posterior secagem das amostras em estufa (De Leo, modelo Estufa para Secagem e Esterilização Tamanho 6, com controle de temperatura automático / DL-SE) a 105 °C, onde permaneceram durante a noite (por aproximadamente 16 h). A umidade (em porcentagem) foi, então, calculada conforme a Equação 3.1, através da diferença de massa antes e após a secagem de cada amostra.

$$x_w(\%) = \frac{m_{au} - m_{as}}{m_{au}} \times 100 \quad (3.1)$$

sendo  $x_w(\%)$  a umidade em porcentagem,  $m_{au}$  a massa de amostra úmida e  $m_{as}$  a massa de amostra seca.

### 3.1.3 Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (SST)

A refratometria na escala Brix se constitui em um método físico para medir a quantidade de sólidos solúveis presentes em uma amostra. A escala Brix é calibrada pelo número de gramas de açúcar contidos em 100 g de solução, e suas escalas apresentam as concentrações percentuais dos sólidos solúveis contidos em uma amostra (solução com água). O valor medido é a soma total desses sólidos dissolvidos, como açúcares, sais, proteínas, ácidos, etc. (MORAES, 2006, apud CAVALCANTI et al., 2006)

Segundo Moraes (2006, apud CAVALCANTI et al., 2006), a leitura em porcentagem de Brix deve ser semelhante à concentração real de açúcar existente nas soluções analisadas. Portanto, esta metodologia foi escolhida para avaliar a possível interferência dos açúcares presentes nos extratos das tortas industrial e de laboratório na ação antifúngica.

Para essas análises, alíquotas dos extratos de ambas as tortas com concentração fenólica semelhante (6 g CFT/L) foram previamente centrifugadas em tubos *Eppendorf* por seis minutos sob rotação máxima. A centrifugação teve como objetivo remover os sólidos em suspensão, mantendo apenas os sólidos solúveis (SST), permitindo melhor aproximação do valor à quantidade de açúcares.

As leituras do grau Brix do sobrenadante de cada amostra foram realizadas utilizando refratômetro digital portátil (MEGABRIX, modelo REDI-P, China), o qual foi calibrado com água deionizada a temperatura ambiente antes de cada medição.

## 3.2 Extração dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

### 3.2.1 Extração assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF)

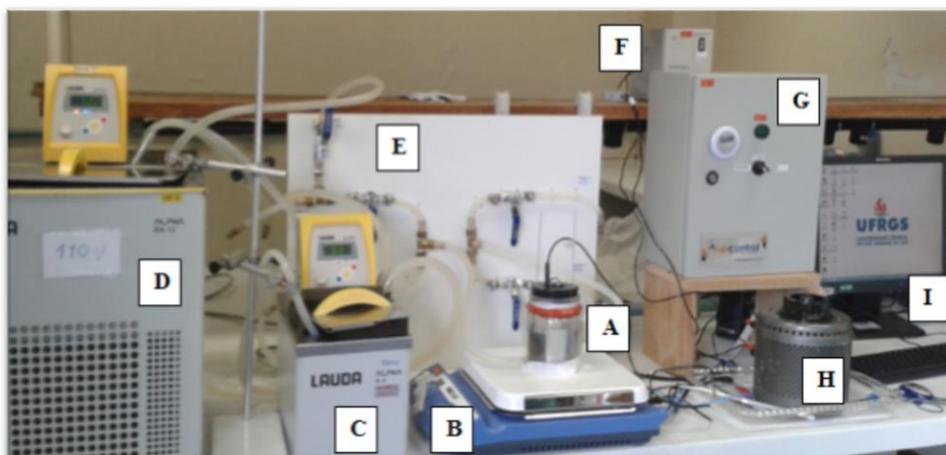
Nesta etapa, foram realizadas cinéticas de extração para duas diferentes tensões (50 volts e 100 volts) e um experimento controle (0 volt), a fim de verificar modificações no comportamento da curva de *Concentração de CFT versus Tempo* para os extratos da TortaInd. A análise dos dados foi realizada através do teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), no *software* Statistica® versão 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa OK, USA).

A solução extratora utilizada para todos os experimentos da etapa foi água-etanol 30% vol., havendo advertência de que a utilização de solução inflamável sob aplicação de tensão pode oferecer riscos de incêndio e que, portanto, deve haver atenção à temperatura e à concentração máxima da solução a ser utilizada.

A metodologia consistiu em conectar uma célula encamisada de 250 mL de capacidade a um banho de resfriamento (Lauda, modelo Alpha RA 12, Alemanha) e um banho de aquecimento (Polystat, modelo Cole-Parmer, Estados Unidos), de cujas temperaturas foram setadas a fim de manter a menor variabilidade durante e entre os experimentos. Assim, para cada voltagem, as temperaturas dos banhos foram alteradas, devido ao fato de que uma maior tensão acarreta uma maior elevação de temperatura. Essa célula, ainda, foi colocada sobre um agitador magnético (IKA C-MAG, modelo HS 10, Alemanha), e em seu interior foi introduzida uma barra magnética (ou “peixinho”). Ainda, o sistema para fornecimento de energia é composto por um regulador de tensão de 0 a 220 V (Sociedade Técnica Paulista LTDA, modelo Varivolt, Brasil), um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000T/2-2, Brasil) e um disjuntor (Siemens, Brasil).

O computador foi ligado, e os parâmetros de calibração, alterados no *software*. Foram, então, inseridos os 250 mL de solução extratora e, após obter estabilização da temperatura no valor desejado ( $15 \pm 2$  °C), foram adicionados os 5 g de torta de girassol, pesados em balança analítica. Rapidamente foi ligada a agitação e foram, enfim, inseridos os termopares - do tipo Pt-100 (Novus, Brasil) de aço inoxidável - e os eletrodos juntamente com a tampa. A imersão foi realizada até cerca de 0,5 cm de distância do fundo para os termopares, e até metade da profundidade para os eletrodos. A partir do sistema de aquisição de dados, foi possível monitorar e registrar os valores de corrente elétrica, tensão e temperatura ao longo do tempo. A Figura 3.2 apresenta o aparato utilizado nesta etapa.

Figura 3.2: Aparato experimental utilizado para as extrações assistidas por MEF; (A) célula ôhmica, (B) agitador magnético, (C) banho de aquecimento, (D) banho de resfriamento, (E) sistema *by-pass*, (F) estabilizador, (G) sistema de aquisição de dados, (H) variador de tensão manual e (I) computador.



A tensão foi setada no valor desejado (0 V, 50 V ou 100 V) e iniciou-se imediatamente a coleta de amostras através do orifício central da tampa, utilizando uma pipeta Pasteur. Foram coletadas amostras em triplicata para os tempos de 0, 1, 3, 5, 7 e 10 minutos, e para cada tensão os experimentos foram realizados duas vezes. As amostras foram armazenadas em tubos *Eppendorf* identificados e submetidos à centrifugação (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Alemanha). O sobrenadante de cada amostra foi coletado e destinado à análise quantitativa de compostos fenólicos totais.

### 3.2.2 Extração exhaustiva

Ambas as tortas (industrial e de laboratório) foram submetidas à análise de cinética da extração exhaustiva, no intuito de comparar sua capacidade de fornecer compostos fenólicos totais. A solução extratora utilizada foi água-etanol 30% vol.

A metodologia consistiu em pesar em balança analítica 2,5 g de torta de girassol direto em tubo Falcon de 50 mL. Após, verter sobre a torta 25 mL de solução extratora e levar o tubo ao vórtex (Phoenix Luferco, modelo AP56, Brasil) sob rotação máxima, por 5 min cronometrados. Levar, então, o tubo à centrífuga (Sigma, modelo 2-16KL, Alemanha) sob rotação máxima (15.300 rpm) e refrigeração a 10 °C por 5 min. Ao retirar o tubo da centrífuga, procedeu-se com a coleta, utilizando pipeta Pasteur, do sobrenadante, o qual foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, sendo este completado com solução extratora. Novamente foram adicionados 25 mL de etanol 30% sobre a mesma torta e os procedimentos foram seguidos conforme a primeira extração. Repetiu-se o processo até concluir sete extrações sucessivas a partir da mesma porção de torta. A metodologia foi repetida duas vezes para cada torta. As amostras provenientes de cada experimento foram destinadas à quantificação de CFT a fim de possibilitar a plotagem das curvas de *Concentração de CFT versus Número de extrações*. A Figura 3.3 apresenta os balões volumétricos numerados contendo os extratos obtidos a cada extração.

Figura 3.3: Extratos obtidos a cada ponto da cinética da extração exhaustiva.



### 3.2.3 Extração exhaustiva da torta industrial em maior escala

Com a finalidade de obter quantidade suficiente de extrato para aplicação nos morangos, foi realizada a extração exhaustiva a partir da torta industrial em maior escala. O procedimento consistiu na introdução de 100 g de torta de girassol em becker de vidro juntamente com 300 mL de etanol 30% e uma barra magnética. O sistema permaneceu sobre agitador magnético (Fisatom, modelo 754A, Brasil) por cerca de 30 min. A mistura foi

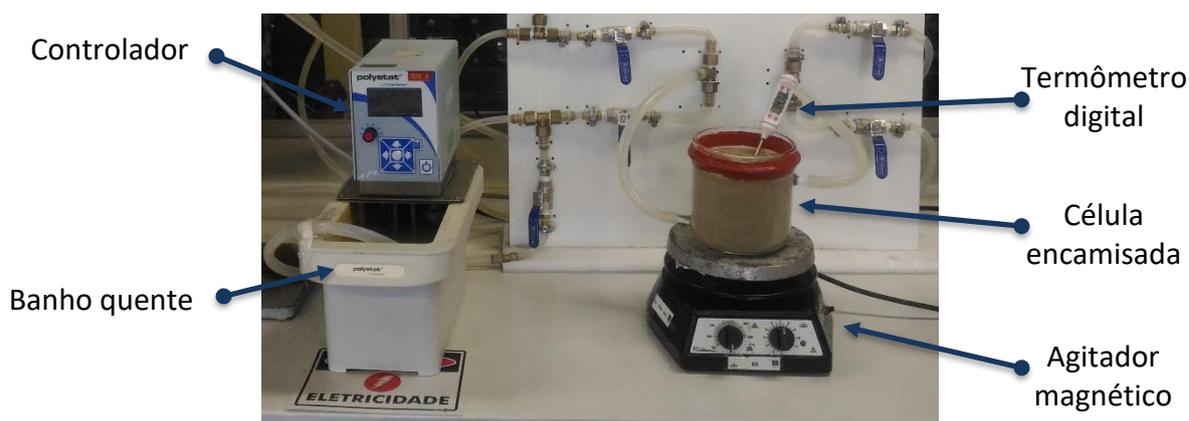
comportada em tubos Falcon de 50 mL e centrifugada sob rotação máxima (15.300 rpm) e refrigeração a 10 °C por 5 min. O sobrenadante foi separado com o auxílio de pipeta Pasteur e a torta foi novamente levada ao becker com mais 300 mL de etanol 30%. O procedimento foi repetido até totalizar cinco extrações. Ao final, portanto, foram obtidos 1.500 mL de extrato a ser concentrado.

### 3.2.4 Extração otimizada da torta obtida em laboratório

Com o objetivo de obter grande quantidade de extratos mais concentrados e que, portanto, requeressem menos evaporação de solvente para posterior aplicação em morangos, foi utilizada metodologia diferenciada para a torta caseira nesta etapa. De acordo com Zardo (2017), ao submeter torta de girassol a uma solução extratora de etanol 43% na razão 1:10 em temperatura de 45 °C, a concentração final do extrato obtido sob agitação demonstrou maior eficiência na extração quando comparado a outras combinações de temperatura e concentração de etanol.

Tendo isso em vista, foram realizadas quatro extrações de modo a obter quantidade suficiente de extrato. Em cada uma delas, foram utilizados 75 g de torta de girassol pesados em balança analítica e 750 mL de etanol 43%. Uma célula encamisada foi conectada a um banho de aquecimento e colocada sobre um agitador magnético; em seu interior foram introduzidos 750 mL de solução extratora, uma barra magnética e um termômetro digital. A agitação foi ligada e esperou-se até que o termômetro indicasse temperatura de cerca de 47 °C (ao adicionar a torta, a temperatura sofre diminuição). Após, foi adicionada a torta, a qual permaneceu no sistema sob agitação por 10 min. A Figura 3.4 apresenta o aparato descrito.

Figura 3.4: Aparato utilizado para a extração no ponto ótimo.



Após cada extração, o extrato foi submetido à filtragem com auxílio de uma bomba de vácuo forçando a passagem através de papel filtro. Os quatro extratos foram misturados e uma alíquota foi retirada para posterior determinação da concentração dos CFT. O restante dos extratos foi armazenado em garrafas de vidro âmbar e congelado para posterior concentração.

### 3.3 Concentração dos extratos

#### 3.3.1 Concentração do extrato da torta industrial

A concentração consistiu em evaporar parte dos solventes (água e etanol) em rotaevaporador (Fisatom, modelo 558, Brasil), com rotação do balão setada em 80 rpm, temperatura de refrigeração do condensador, em 10 °C e temperatura do banho de aquecimento em contato com o balão, em 55 °C, de modo a evitar degradação dos compostos fenólicos, a qual pode ocorrer em temperaturas acima de 60 °C. A evaporação ocorreu em vários ciclos: iniciou-se com 500 mL de extrato e, à medida que o volume diminuía consideravelmente, o balão ia sendo completado com mais extrato. Ao longo de dez dias reduziu-se o volume de 1.500 mL a 55 mL.

#### 3.3.2 Concentração do extrato da torta obtida em laboratório

A concentração do extrato foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na concentração em rotaevaporador dos 3 litros de extrato divididos em seis partes de 500 mL. Cada uma das partes foi submetida à evaporação com rotação do balão setada em 80 rpm; temperatura do banho de aquecimento, em 55 °C e temperatura de refrigeração do condensador, em 10 °C, por em média 3 horas – tempo suficiente para observar a diminuição do volume em cerca de 50%. Ao final, as seis partes foram misturadas e uma alíquota foi separada para análise da concentração de compostos fenólicos totais. O restante do extrato foi novamente armazenado em garrafas âmbar e congelado.

Após quantificação da concentração de CFT, foi estimado o volume necessário a ser submetido à próxima etapa de concentração de modo a obter um volume garantido de 40 mL para cada uma das concentrações pretendidas. Esse volume é o mínimo necessário para submersão total dos morangos em um becker de 50 mL. Para essa estimativa, foi utilizada a equação:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (3.2)$$

sendo  $C_1$  a concentração inicial,  $V_1$  o volume inicial,  $C_2$  a concentração final e  $V_2$  o volume final.

O extrato concentrado anteriormente (em rotaevaporador) foi descongelado em banho-maria e o volume inicial nos tubos ( $V_1$ ), dividido igualmente em tubos Falcon de 15 mL, os quais foram submetidos à centrífuga concentradora (Labconco, modelo CentriVap #7810016, Estados Unidos) com temperatura setada de 55 °C. De tempos em tempos, o equipamento foi pausado e o volume, observado, até que o volume em cada tudo correspondesse ao esperado ( $V_2$ ). Uma alíquota foi guardada para posterior quantificação dos CFT, enquanto o restante do extrato foi guardado em recipiente de vidro âmbar identificado e, em seguida, congelado. Essa etapa de concentração em centrífuga concentradora foi realizada separadamente para cada uma das concentrações desejadas.

### 3.4 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A metodologia utilizada para a quantificação dos compostos fenólicos foi adaptada de Waterhouse (2002). Para avaliação do teor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras, as análises foram realizadas em, no mínimo, triplicatas. A metodologia consistiu em, inicialmente, diluir com água destilada as amostras que se supunha muito concentradas a fim de obter uma absorbância na faixa compreendida pela curva analítica do ácido gálico (entre 0,100 e 0,900), a qual se encontra no Anexo A. O fator de diluição é dado por:

$$FD = \frac{V_{extrato} + V_{\acute{a}gua}}{V_{extrato}} \quad (3.3)$$

sendo FD o fator de diluição,  $V_{extrato}$  o volume de extrato e  $V_{\acute{a}gua}$  o volume de água destilada utilizado na diluição.

Em tubos Falcon de 15 mL foram, então, adicionados 850  $\mu$ L de água destilada, 200  $\mu$ L de extrato diluído ou não (ou água destilada, no caso dos dois brancos) e 100  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu; a mistura foi agitada em vórtex e foram adicionados 850  $\mu$ L de solução de carbonato de sódio 7%. Submeteu-se cada tubo novamente ao vórtex por alguns segundos. As misturas foram transferidas para cubetas de quartzo, as quais foram posteriormente armazenadas em caixa de isopor específica por 1 h em abrigo da luz.

Posteriormente, as análises de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV 1600, Brasil), com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 765 nm e lâmpada Wi selecionada, utilizando o *Software* UV-Wins. Os resultados obtidos são apresentados na forma de miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra seca.

### 3.5 Aplicação dos extratos fenólicos em morangos

Foram realizados testes envolvendo aplicação de extratos obtidos a partir tanto da torta de girassol industrial quanto da torta de girassol obtida em laboratório. Inicialmente, as aplicações foram efetuadas seguindo uma metodologia mais simples, com análise somente qualitativa, apenas para verificar a capacidade antifúngica do extrato da torta industrial. Após, a aplicação do extrato da TortaLab seguiu uma metodologia quali e quantitativa, em ambiente controlado.

Os morangos utilizados nos testes foram obtidos diretamente de produtor da cidade de Fazenda Souza – RS. Provenientes de cultivo através de sistema semi-hidropônico suspenso, os morangos – geralmente no dia anterior a cada aplicação, com exceção da última - foram colhidos pessoalmente, e escolhidos cuidadosamente, de modo a evitar o uso de frutos deteriorados, visualmente infectados e de coloração muito desuniforme. Para a última etapa de testes, devido à logística, foi necessário colher os morangos quatro dias antes da aplicação. Os frutos foram armazenados sob refrigeração em geladeira doméstica, a cerca de 12 °C. No Apêndice A, são apresentadas fotografias das estufas e dos morangueiros das variedades utilizadas.

### 3.5.1 Aplicação dos extratos da torta industrial

Para os testes destes extratos, foram utilizados morangos da variedade Albion (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Albion). As aplicações foram realizadas no LATEPA, e os testes envolveram duas diferentes concentrações, testadas em dias diferentes. Na primeira aplicação, foi utilizado extrato de concentração 1 g CFT/L; já na segunda aplicação, foi utilizada a concentração de 7 g CFT/L.

O procedimento foi o mesmo para os dois ensaios: inicialmente, os morangos foram separados em três grupos de dois morangos, os quais apresentavam características semelhantes de coloração e tamanho. Posteriormente, foram preparados dois beakers de 50 mL de capacidade: um com 40 mL de água destilada (experimento controle) e o outro com 40 mL de extrato.

Um morango de cada grupo foi mergulhado em água destilada (controle), enquanto o outro foi mergulhado no extrato. A imersão de cada morango, um a um, teve duração de 1 minuto cronometrado. A medida que foram retirados da imersão, eram colocados sobre uma grade para secagem forçada na presença de um ventilador, por 90 minutos, sendo virados na metade do tempo. A Figura 3.5 ilustra essa etapa.

Figura 3.5: Morangos na etapa de secagem; à esquerda os morangos imersos em extrato da torta industrial e à direita, em água destilada.



Após secos, os morangos foram colocados em bandejas plásticas comuns, um de cada grupo, totalizando três morangos em cada bandeja e em seguida foram cobertos com filme plástico PVC para alimentos. Devidamente identificadas, as bandejas permaneceram sobre a bancada do LATEPA, sendo fotografadas diariamente para acompanhamento da evolução das infecções. Acompanhadas de termômetro digital para registro das temperaturas

diárias, as bandejas permaneceram no local até que fosse consideravelmente intensa a diferença entre elas. A Figura 3.6 apresenta a maneira com a qual ficaram dispostas na bancada as bandejas no segundo experimento (com extrato fenólico a 7 g CFT/L); nela aparecem as identificações e o registro de temperaturas na tela do termômetro digital. A fotografia foi feita no dia da aplicação, e a configuração é semelhante à adotada no primeiro experimento (com extrato fenólico a 1 g CFT/L).

Figura 3.6: Morangos embalados e identificados sobre a bancada; à esquerda, o experimento controle e à direita, com extrato.



### 3.5.2 Aplicação dos extratos da torta obtida em laboratório

#### 3.5.2.1 Primeira aplicação

Para as aplicações destes extratos, as quais ocorreram no LACIP, foram utilizados morangos da variedade San Andreas (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. San Andreas), sendo que as concentrações testadas foram de 5, 7, 10 e 15 g CFT/L. A escolha das concentrações teve como intuito a comparação entre o extrato de torta caseira e o de torta industrial por meio da utilização de 7 g CFT/L; a utilização de uma concentração um pouco menor para avaliar a possibilidade de um meio interferente (como presença de açúcares e lipídios os quais poderiam servir de substrato aos fungos) que seria abrandado utilizando 5 g CFT/L; e duas concentrações maiores (10 e 15 g CFT/L) com a intenção de observar possível aumento no potencial antifúngico.

Para estes testes, foi selecionado maior número de frutos por bandeja, de modo a obter resultados estatisticamente mais consistentes. Em vista disso, foram separados grupos de dez morangos para cada uma das concentrações. Após, 40 mL de cada extrato foram colocados em beakers de 50 mL identificados. Os morangos foram submersos, um a um, no respectivo extrato (enquanto os controles foram imersos em água destilada), por 1 minuto cronometrado e, à medida que foram retirados da solução, foram posicionados sobre uma grade, a qual se encontrava no interior de uma capela com exaustão ligada, conforme ilustrado pela Figura 3.7. Os frutos permaneceram sob secagem, com uso de ventilador direcionado, por cerca de 90 min, sendo virados na metade do tempo.

Figura 3.7: Fotografia dos morangos após a aplicação dos extratos fenólicos provenientes da TortaLab, sob secagem.



Após a secagem, os morangos foram colocados em bandejas plásticas redondas com tampas identificadas, de maneira a ficarem igualmente espaçados de forma concêntrica, evitando interferência na evolução fúngica por contato. As bandejas, conforme mostra a Figura 3.8, foram, então, armazenadas na Central Analítica do Campus Centro, em ambiente com temperatura e umidade controladas, sendo diariamente abertas para que os morangos fossem fotografados e avaliados um a um. Observações foram registradas após a inspeção diária da superfície dos cinquenta morangos.

Figura 3.8: Bandejas de morangos identificadas após aplicação dos extratos fenólicos da TortaLab, no local de armazenamento.



### 3.5.2.2 Segunda aplicação

Com o intuito de minimizar os efeitos de interferentes, nesta etapa foram testadas três concentrações menores de extrato da TortaLab: 0.5, 1 e 2 g CFT/L, bem como o ácido clorogênico puro (Sigma-Aldrich, CAS 327-97-9, Brasil) dissolvido em água destilada em concentração 1 g CFT/L. A metodologia utilizada foi a mesma da primeira aplicação dos extratos da TortaLab em morangos, a qual é descrita na subseção 3.5.2.1.

### 3.5.2.3 Avaliação da infecção fúngica

No intuito de converter em dados quantitativos as observações (qualitativas) das infecções na superfície dos morangos, foi adaptada a equação de Anaruma et al. (2010) para o cálculo do Índice de Doença (I.D.) – referida pela Equação 3.4 -, utilizando a escala proposta por Tzortzakis (2007).

- Escala:
- 0: sem presença visível de fungo;
  - 1: até 25% da superfície infectada por fungo;
  - 2: de 26 a 50% da superfície infectada por fungo;
  - 3: de 51 a 75% da superfície infectada por fungo;
  - 4: acima de 75% da superfície infectada por fungo.

$$I.D. (\%) = \frac{(1.n_1)+(2.n_2)+(3.n_3)+(4.n_4)}{4.R} \times 100 \quad (3.4)$$

sendo I.D.(%) o índice de doença em porcentagem,  $n_1...n_4$  o número de frutos com o respectivo escore e R o número total de frutos por tratamento.

Dessa forma, a análise passa a contemplar tanto parâmetros quantitativos (número de frutos) quanto qualitativos (grau de infecção), possibilitando gerar um gráfico de *I.D.(%) versus Número de dias* e comparar as curvas.

## 4 Resultados

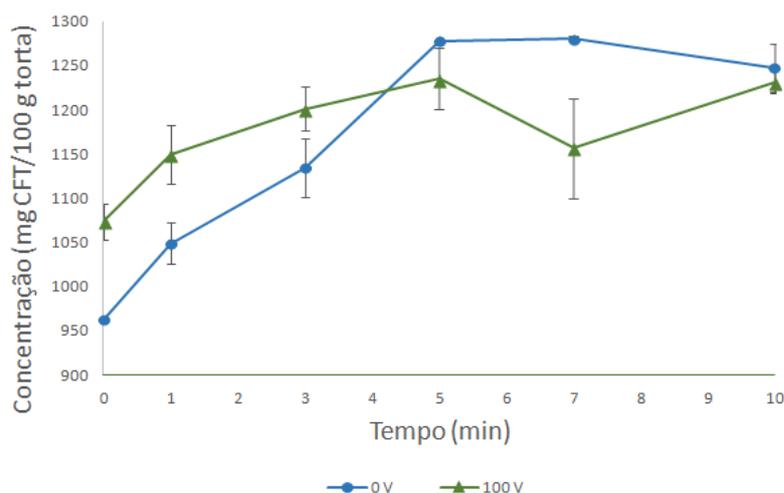
Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a extração de compostos fenólicos a partir da torta de girassol industrial assistida por campo elétrico moderado, as diferenças avaliadas entre as tortas industrial e de laboratório (umidade e concentrações de CFT e SST) e o potencial antifúngico dos respectivos extratos aplicados em morangos.

### 4.1 Extração assistida por Campo Elétrico Moderado (MEF)

A extração assistida por MEF seguiu a metodologia descrita na subseção 3.2.1, e o teor de CFT obtido a cada ponto, em triplicata, foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu modificado, conforme apresentado na subseção 3.4. A temperatura durante os experimentos foi mantida em  $15 \pm 1$  °C.

A curva obtida para a tensão de 50 volts foi desconsiderada, pois apresentava incoerência entre os dados nos dois ensaios realizados. Dessa forma, foram consideradas apenas as curvas referentes ao experimento controle (0 V) e à tensão de 100 V. A Figura 4.1 apresenta os resultados obtidos para essas extrações, onde a concentração de fenólicos totais é plotada em função do tempo. As marcações verticais em cada ponto representam o desvio padrão entre as triplicatas, e o ponto em si representa o valor médio das mesmas. As linhas que ligam os pontos servem somente para facilitar a visualização do comportamento da cinética da extração em cada tratamento, sendo que não foi realizada uma modelagem dos resultados.

Figura 4.1: Cinética da extração assistida por MEF, utilizando tensão de 100 V, comparada ao controle (0 V).



Através da análise da figura, observa-se que a aplicação do campo elétrico de 100 V não apresentou efeito significativo sobre a cinética da extração, sendo a quantidade de compostos fenólicos totais extraída ao final dos dois tratamentos estatisticamente igual, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). O comportamento diverge do esperado, sendo possível que a intensidade do campo elétrico não tenha sido suficiente para causar o fenômeno de eletroporação. Sob outra perspectiva, existe também a possibilidade de a

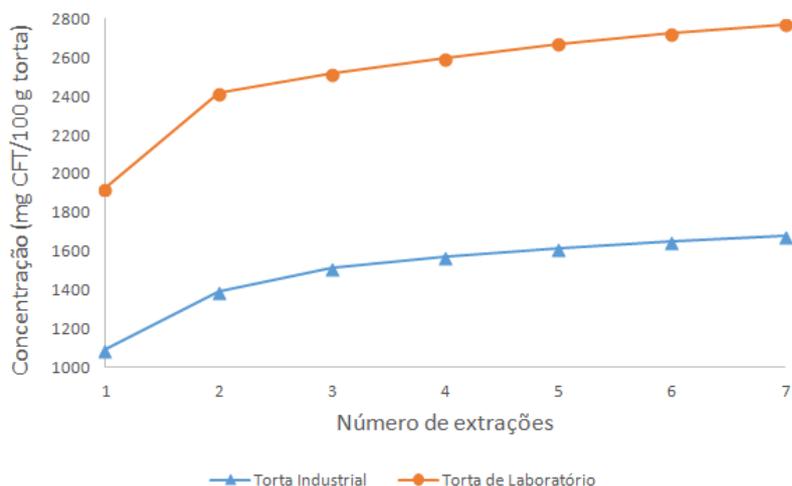
ruptura celular já ter sido realizada durante o processamento da torta, na etapa de prensagem. Nesse caso, a aplicação do MEF já não seria capaz de elevar a permeabilização das células a ponto de aumentar a extração.

#### 4.2 Caracterização das tortas – umidade e concentrações de CFT e SST

A umidade das tortas foi determinada através do método gravimétrico, conforme apresentado na subseção 3.1.2.1, e os valores obtidos foram de 2,06% para a TortaInd e 7,68% para a TortaLab. O teor de açúcares (a partir das medições dos SST), conforme mencionado na subseção 3.1.3, foi determinado por refratometria, e os valores obtidos foram de 27,7 °Bx (grau Brix) para a TortaInd e 5,2 °Bx para a TortaLab. Em comparação à TortaInd, a TortaLab apresenta, portanto, maior umidade (quase quatro vezes), enquanto seu teor de açúcares (relativo aos SST) é muito inferior, cerca de 20% do montante na TortaInd.

Para obter a capacidade das tortas em fornecer compostos fenólicos, foi realizada a cinética de extração exaustiva (segundo subseção 3.2.2), de cujas curvas são apresentadas na Figura 4.2, a qual relaciona a quantidade de compostos fenólicos extraídos por 100 gramas de torta com a quantidade de extrações realizadas. As linhas que ligam os pontos servem somente para facilitar a visualização do comportamento da cinética de cada extração.

Figura 4.2: Curvas resultantes da cinética de extração para ambas as tortas.



A partir da comparação entre as curvas obtidas, é possível inferir que a TortaLab apresenta uma concentração de compostos fenólicos totais superior à da TortaInd. Ao final de sete extrações, a quantidade de CFT obtida a partir da TortaLab é 65% superior àquela obtida a partir da TortaInd.

Conforme revela o estudo de Canuto (2017), há amplas diferenças entre os tipos e concentrações de compostos fenólicos existentes em sementes de girassol de distintas regiões. Além disso, a composição dos polifenóis nos alimentos pode variar com o tipo, época de colheita, fatores do meio ambiente, processamento e armazenamento (MANACH et al., 2004).

### 4.3 Capacidade antifúngica dos extratos aplicados nos morangos

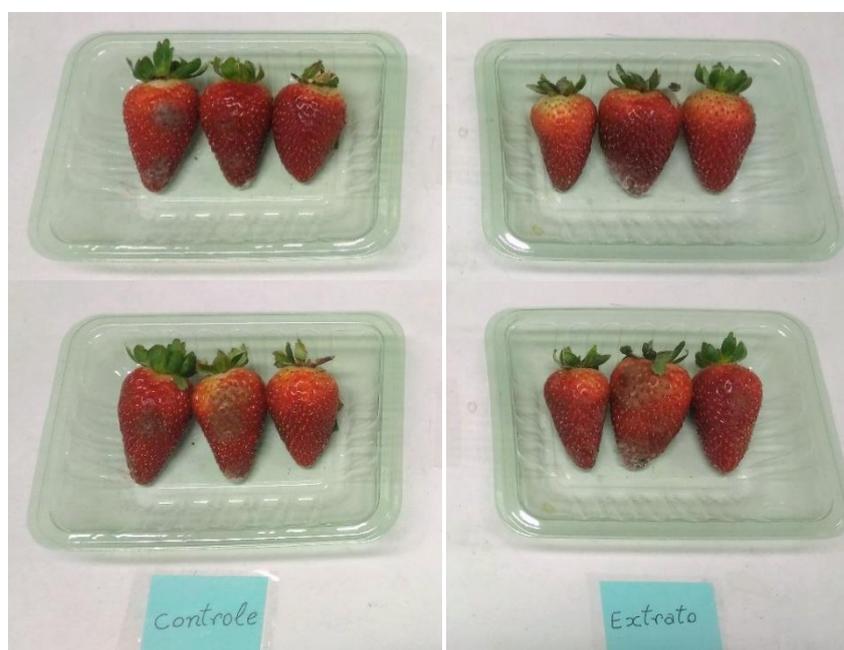
As infecções fúngicas avaliadas correspondem a qualquer tipo de modificação observada na superfície dos morangos, incluindo, portanto, antracnose, oídio, mofo cinzento e podridão aquosa.

#### 4.3.1 Testes com extrato da torta industrial

As aplicações dos extratos da TortaInd seguiram a metodologia apresentada na subseção 3.5.1. Para o teste com o extrato de concentração 1 g CFT/L, os morangos foram acompanhados ao longo de cinco dias, nos quais as temperaturas variaram entre 18 e 20°C.

A partir do quarto dia, observou-se o desenvolvimento de fungos na superfície dos morangos tanto na bandeja controle quanto na bandeja submetida ao extrato. Ao quinto dia, os morangos da bandeja controle apresentavam manchas de infecção ligeiramente maiores em sua superfície em comparação aos morangos imersos em extrato. A Figura 4.3 apresenta os morangos das duas bandejas antes e após serem virados, de modo a analisar toda a superfície.

Figura 4.3: Acima, fotografia da superfície superior dos morangos; abaixo, fotografia da superfície inferior; sendo à esquerda a bandeja controle e à direita a bandeja submetida ao extrato de 1 g CFT/L.



A partir desse resultado, decidiu-se fazer novo teste com extrato de maior concentração (7 g CFT/L). O monitoramento ocorreu ao longo de quatro dias, nos quais as temperaturas variaram entre 24 e 27 °C. A partir do terceiro dia, observou-se modificação da coloração dos morangos submersos no extrato, os quais apresentaram escurecimento; em ambas as bandejas houve pequeno desenvolvimento de fungo esbranquiçado.

Ao quarto dia, entretanto, observou-se grande distinção entre os morangos do experimento controle e da bandeja do extrato. A Figura 4.4 apresenta os morangos das

duas bandejas antes e após serem virados, de modo a analisar toda a superfície. A infecção fúngica se apresentou muito mais severa nos morangos do grupo de controle, os quais tiveram como características fungos de maior comprimento por toda a superfície, e morangos de aspecto gelatinoso, apresentando perda de líquido na bandeja, enquanto os morangos imersos no extrato se mantiveram firmes, sem perda de suco e com menor desenvolvimento fúngico (menor área superficial e comprimento).

Figura 4.4: Acima, fotografia da superfície superior dos morangos; abaixo, fotografia da superfície inferior; sendo à esquerda a bandeja controle e à direita a bandeja submetida ao extrato de 7 g CFT/L.



A partir desses resultados, os quais demonstram tendência de inibição fúngica, foi decidido testar outras concentrações de extrato de modo a obter um valor capaz de inibir efetivamente o crescimento fúngico. No entanto, a impossibilidade de adquirir torta industrial no período levou à utilização de torta fabricada em laboratório para obtenção dos extratos a serem aplicados nos morangos nos testes subsequentes.

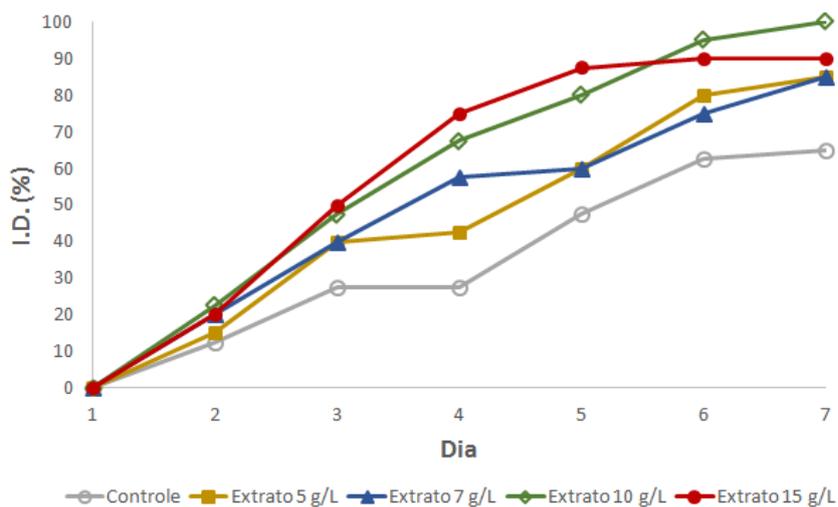
#### 4.3.2 Testes com extrato da torta obtida em laboratório

Foram aplicados, na primeira etapa de testes com a TortaLab, extratos de concentração 5, 7, 10 e 15 g CFT/L, seguindo a metodologia descrita na subseção 3.5.2.1. A avaliação da infecção fúngica foi realizada conforme consta na subseção 3.5.2.3, de forma a obter resultados quali e quantitativos e facilitar, desta forma, a comparação entre as diferentes concentrações utilizadas e o experimento controle.

Os morangos desta fase foram monitorados ao longo de sete dias, nos quais a temperatura se manteve em  $25 \pm 1$  °C, enquanto a umidade esteve em  $41 \pm 3$  %. A Figura 4.5

apresenta as relações obtidas, para cada tratamento, entre os índices de infecção e o tempo de monitoramento, sendo o dia 1 correspondente ao dia da aplicação.

Figura 4.5: Evolução do índice de infecção (I.D. %) em função do número de dias a partir da aplicação, para os morangos das bandejas imersos em extratos de 5, 7, 10 e 15 g CFT/L e controle.



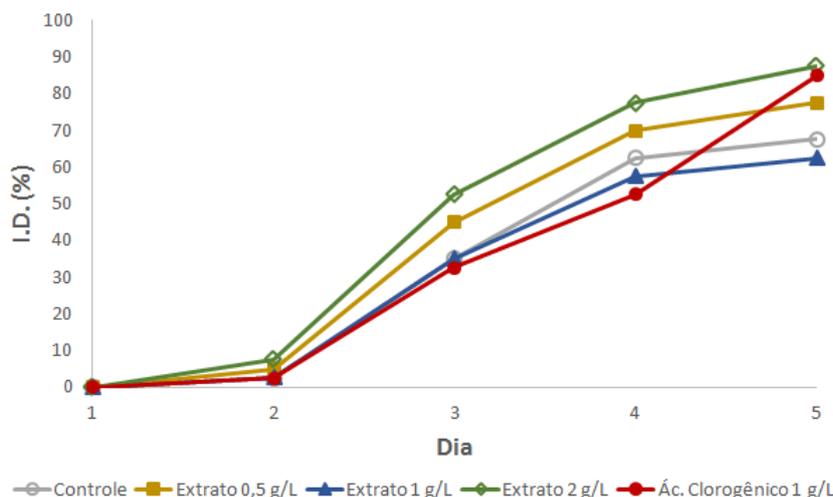
A análise revela que os morangos da bandeja controle apresentaram menor desenvolvimento fúngico, e que, à medida que foram aumentadas as concentrações aplicadas, o desenvolvimento das infecções também aumentou. No quarto dia, por exemplo, as infecções fúngicas observadas nos morangos imersos em extrato de concentração 15 g CFT/L (I.D. 75%) foram quase três vezes o valor observado nos morangos controle (I.D. 27,5%). Algumas fotografias dos morangos bem como as tabelas de observações (qualitativas) diárias são apresentadas no Apêndice B.

Os resultados obtidos nesta etapa divergem do esperado ao serem considerados apenas os efeitos antifúngicos dos compostos fenólicos nos frutos. Ao observar a tendência apresentada na Figura 4.5, foi levantada a hipótese de que a elevação das concentrações está aliada ao aumento das concentrações de açúcares e proteínas, os quais teriam servido de substrato aos fungos e, assim, promovido um maior desenvolvimento destes. Além disso, o fato de obter tendência positiva à inibição fúngica com o uso de extrato da TortaInd em concentração 1 g CFT/L, com melhora dos resultados ao utilizar 7 g CFT/L, a qual não foi verificada ao serem utilizadas as concentrações 5 e 7 g CFT/L de extratos da TortaLab, demonstra certa incompatibilidade entre as tortas.

Com base na tendência acarretada pela elevação de concentração fenólica dos extratos, decidiu-se realizar uma segunda etapa de testes para a TortaLab. Nesta fase, foram testadas concentrações menores (0,5, 1 e 2 g CFT/L) e solução de ácido clorogênico padrão de concentração 1 g CFT/L, objetivando verificar diminuição da interferência de outros componentes presentes no extrato e comparar sua influência (comparando extrato e solução padrão de mesma concentração), conforme descrito na subseção 3.5.2.2. A Figura 4.6 apresenta as curvas obtidas nesta etapa para cada tratamento, as quais relacionam os índices de infecção e o tempo de monitoramento, utilizando as mesmas

condições de armazenamento do experimento anterior. Algumas fotografias dos morangos bem como as tabelas de observações diárias são apresentadas no Apêndice C.

Figura 4.6: Evolução do índice de infecção (I.D. %) em função do número de dias a partir da aplicação, para os morangos das bandejas imersos em extratos de 0.5, 1 e 2 g CFT/L, ácido clorogênico a 1 g CFT/L e controle.



A partir da figura, podem ser observados desvios do comportamento esperado. Até o terceiro dia, os morangos imersos em água destilada (controle), extrato 1 g CFT/L e ácido clorogênico 1 g CFT/L tiveram índice de infecção similar; no quarto dia, houve diferenciação, sendo os I.D. destes dois (I.D. ácido clorogênico 52,5%; I.D. extrato 1 g CFT/L 57,5%) inferiores ao do controle (I.D. 62,5%). Entretanto, ao último dia, o ácido clorogênico, que apresentava o melhor desempenho, sofreu um salto de infecção, passando a ter seu índice similar ao do extrato de 2 g CFT/L (I.D. 85%), o qual foi o mais elevado.

Observou-se, também, que na primeira etapa de testes com extratos da TortaLab as infecções predominantes se deram por antracnose e mofo cinzento, enquanto na segunda etapa ocorreram majoritariamente por oídio, originando juntamente podridão aquosa. Ao contatar o produtor dos morangos, obteve-se a informação de que havia ocorrido um surto de oídio na região, bem como de mosca *Drosophila suzukii* (causadora de perfuração e degradação de frutos). Talvez esse surto tenha promovido a infecção dos morangos, distorcendo totalmente os resultados da esperada ação antifúngica dos extratos.

Quando relacionado o desempenho antifúngico do extrato da TortaLab de 1 g CFT/L com o da TortaInd de mesma concentração, observa-se similaridade, pois nos dois casos houve atividade antifúngica sutil. No entanto, esta foi a única compatibilidade observada entre as duas tortas. É possível que a essa concentração haja confluência entre os agentes fúngicos e antifúngicos dos extratos.

A hipótese anteriormente levantada, a qual relacionaria o maior desenvolvimento fúngico com a maior concentração de açúcares foi refutada ao obter, através da análise de grau Brix, uma concentração de sólidos solúveis totais muito superior (quase quatro vezes) para a TortaInd, a qual, apesar disso, teve melhor desempenho antifúngico. Além disso, o grande crescimento do índice de infecção observado na utilização do ácido clorogênico puro entre o quarto e o quinto dia, enquanto houve menor infecção nos morangos com

extrato 1 g CFT/L, remete a uma nova hipótese: a de que outros constituintes da solução sejam os responsáveis pela atividade antifúngica, possivelmente entre os SST. E que os compostos fenólicos possam ser, talvez, substrato para o desenvolvimento fúngico. Ou, ainda, que a expressão dos compostos fenólicos contra a atividade destes fungos específicos talvez seja insuficiente, prevalecendo os açúcares como alimento aos fungos, e que componentes mais concentrados na torta industrial possam ser antifúngicos mais potentes (como proteínas).

Para avaliar a coerência da hipótese levantada, foram realizadas pesquisas na literatura as quais correlacionassem compostos fenólicos como substratos fúngicos e proteínas (entre os SST) componentes da semente de girassol como agentes antifúngicos.

Regente e de la Canal (2000) purificaram e caracterizaram uma proteína antifúngica de sementes de *Helianthus annuus* L. (Ha-AP10). Testes antifúngicos demonstraram que a proteína Ha-AP10 exerce um efeito fungistático, inibindo o crescimento de 50% dos esporos do fungo patógeno *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* a 6,5 mg/L e impedindo completamente sua germinação a uma concentração de 40,1 mg/L. Esses dados colocam a Ha-AP10 entre as proteínas vegetais de transferência de lipídios (PTLs) antifúngicas mais potentes descritas.

Giudici et al. (2000) também isolaram de *Helianthus annuus* uma proteína (SAP16) com capacidade de inibir a germinação de esporos de fungos. A SAP16 apresenta uma atividade associada ao inibidor de tripsina, capaz de inibir completamente a germinação dos ascosporos de *Sclerotinia sclerotiorum* a uma concentração de 5 mg/L e uma clara redução do crescimento micelial em baixas concentrações, indicando uma forte potência antifúngica.

Ainda, Picman, Schneider e Gershenzon (1990) isolaram do girassol cinco terpenóides, duas lactonas sesquiterpênicas e três ácidos diterpênicos (moléculas as quais não apresentam anel aromático) e avaliaram seus efeitos sobre o crescimento de dois fungos patógenos economicamente importantes de girassol e outras culturas: *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae*, configurando potentes inibidores do crescimento das hifas.

Quanto à ação antifúngica de compostos fenólicos na prática, Upadhyay e Hofrichter (1993) realizaram estudos, os quais indicaram que o fenol (0,1 a 1,0 mM) incorporado no ágar de extrato de malte não teve efeito inibitório a alguns fungos. Contrariamente ao esperado, ocasionou melhor crescimento micelial e frutificação de *P. cornucopia*, *P. ostreatus* Z-15 e *Calocybe indica* que quando utilizada água (controle). Efeitos inibitórios foram observados apenas para os fungos *Stachybotrys* sp. e *Coprinus* sp.

Soares e Martins (2000) estudaram a influência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) associada à adição de compostos fenólicos. Em seu estudo, os autores obtiveram aceleração no crescimento dos fungos ao empregar os flavonóides quercetina e morina e o isoflavonóide formononetina. Soares e Martins também apontam diversos estudos que

têm demonstrado que compostos fenólicos, especialmente do grupo dos flavonóides, tendem a estimular o desenvolvimento de diversas espécies de fungos.

Isto posto, a diferença entre as composições das tortas justificaria a divergência do comportamento fúngico, uma vez que, conforme exposto por Canuto (2017) e Manach et al. (2004), os tipos e concentrações de compostos da torta variam enormemente em função da região de plantio do girassol, a cultivar utilizada, a utilização de sementes com ou sem casca, a época de colheita, os fatores do meio ambiente, o processamento e o armazenamento.

Há, também, a hipótese de que a melhor ação antifúngica observada com a utilização da torta industrial se deva ao fato de que seus extratos estiveram sob concentração em rotaevaporador por períodos muito maiores, levando à desnaturação proteica e formação de peptídeos.

## 5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como objetivos: (i) estudar uma técnica alternativa de extração de compostos fenólicos através da utilização de campo elétrico moderado aplicado sobre tortas de girassol e (ii) aplicar o extrato fenólico obtido a partir dessas tortas sobre morangos para avaliar seu potencial como defensivo orgânico antifúngico na pós-colheita.

O campo elétrico moderado não acarretou melhoras satisfatórias na extração de compostos fenólicos da torta de girassol nas condições utilizadas (100 V, 15±1 °C), sendo a quantidade de compostos fenólicos totais extraída ao final estatisticamente igual à obtida através do experimento sem aplicação de tensão ( $p < 0.05$ ).

Os compostos fenólicos presentes na torta de girassol se mostraram ser facilmente extraídos, resultando em uma torta com menor teor de compostos antinutricionais e com consequente melhora para a alimentação animal. O extrato obtido é rico em compostos fenólicos, podendo ser potencialmente explorado para diversas finalidades, em diferentes linhas de pesquisa, como de fármacos, defensivos agrícolas e aditivos alimentares.

Ao comparar duas diferentes tortas – uma industrial e uma obtida em laboratório - os resultados obtidos para suas composições e seus desempenhos foram bastante distintos. A torta industrial apresentou menor concentração de compostos fenólicos ao ser exaustivamente extraída com etanol (65% menos CFT), menor umidade estimada através de método gravimétrico (2,06%, sendo 75% menor) e maior teor de sólidos solúveis totais obtido através de refratometria (27,7 °Bx, cinco vezes maior). No entanto, apesar de sugerir maior concentração de açúcares, apresentou desempenho positivo quanto à capacidade de inibição fúngica ao ter seus extratos de concentrações 1 e 7 g CFT/L aplicados em morangos.

Por outro lado, a torta obtida em laboratório apresentou maior tendência a servir de substrato ao desenvolvimento fúngico à medida que suas concentrações foram sendo elevadas, sendo suas patogenias piores que as observadas nos morangos do experimento controle, os quais foram submersos em água destilada. As concentrações de 0,5, 2, 5, 7, 10 e 15 g CFT/L apresentaram, na mesma ordem, aumento do índice de infecção. Entretanto, para o extrato com concentração de 1 g CFT/L, as infecções foram sutilmente menores que nos morangos controle e similares aos morangos submetido à solução de ácido clorogênico puro em concentração de 1 g CFT/L, com exceção do último dia de experimento, no qual as infecções dos morangos submersos em ácido clorogênico sofreram uma súbita elevação, para a qual não há causa identificada.

Algumas pesquisas revelam a existência de moléculas isoladas do girassol com capacidade de inibir certos fungos testados *in vitro*, como as proteínas Ha-AP10 (REGENTE; DE LA CANAL, 2000) e SAP16 (GIUDICI et al., 2000) e terpenóides, lactonas sesquiterpênicas e ácidos diterpênicos (PICMAN; SCHNEIDER; GERSHENZON, 1990). Portanto, é possível que haja uma maior concentração destas moléculas nos extratos da torta industrial e que sejam esses os verdadeiros agentes das respostas antifúngicas observadas. Isso explicaria o maior valor obtido para a análise de grau Brix o qual não estaria diretamente relacionado aos açúcares, mas a outras moléculas como essas.

Já os extratos da torta de laboratório podem possuir menos moléculas bioativas e maior quantidade de compostos nutritivos ao fungo. Além disso, o método utilizado para quantificação dos compostos fenólicos totais pode fornecer resultados incorretos.

Pesquisadores identificaram que o reagente de Folin e Ciocalteau reage, também, com moléculas como proteínas, carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, tiol, ácidos graxos insaturados, vitaminas, aminas, aldeídos e cetonas (EVERETTE et al., 2010).

Dessa forma, algumas sugestões para trabalhos futuro e possíveis continuações desse trabalho são apresentadas a seguir.

Para os estudos de extração com campo elétrico moderado, sugerem-se testes com tensões mais elevadas, objetivando que sejam suficientes para causar o fenômeno de eletroporação.

Para as pesquisas envolvendo os extratos de torta de oleaginosas, sugere-se purificação prévia de forma a eliminar ao máximo os interferentes da matriz, e testes *in vitro* envolvendo cepas de cada fungo comum em morangos, visando otimizar concentrações fungistáticas e fungicidas, e a efetividade sobre cada fungo para então testar os extratos nos frutos.

A fim de minimizar a aleatoriedade na interferência de patógenos, indica-se esterilização prévia dos frutos e borrifação das cepas dos fungos em igual quantidade sobre a superfície de cada um deles.

Finalmente, destaca-se que também é importante conhecer melhor as características da torta, conforme se pôde concluir através deste trabalho. Assim, recomenda-se fortemente a determinação e caracterização de açúcares, proteínas e demais constituintes dos extratos por HPLC/GC.

## 6 Referências

- AGRICULTURE, U. S. D. OF. **National Agricultural Statistics Service: Quick Stats**. Disponível em: <[https://quickstats.nass.usda.gov/results/6AB689B0-CF71-38E4-A892-C453772DA167?pivot=short\\_desc](https://quickstats.nass.usda.gov/results/6AB689B0-CF71-38E4-A892-C453772DA167?pivot=short_desc)>. Acesso em: 28 dez. 2017.
- AHLEM, H. et al. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 2210–2217, 2012.
- ALMEIDA, G. S. D. E. **Potencial de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos em pós-colheita de morango**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2015.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passionfruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 66–73, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANSARI, M. A. et al. Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, n. Table 1, p. 1189–1195, 2013.
- ANTUNES, L. E. C. et al. **Morangos - do jeito que o consumidor gosta**. [s.l.: s.n.].
- ANTUNES, L. E. C. **Árvore do Conhecimento - Morango**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/morango/arvore/CONT000fmxotm4d02wyiv8065610do1fgl2q.html>>. Acesso em: 30 set. 2018.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. DOS. **A cultura do morango**. 2. ed. Brasília/DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. v. 2a edição
- AOAC, A. OF O. A. C. **AOAC: Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington, Virginia-USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc, 1990. v. 1
- AQUEVEQUE, P. et al. Antifungal activities of extracts produced by liquid fermentations of Chilean *Stereum* species against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). **Crop Protection**, v. 89, p. 95–100, 2016.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193, 2013.
- BILSKA, A. O.; DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Theoretical modeling of the effects of shock duration, frequency, and strength on the degree of electroporation. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 51, n. 2, p. 133–143, 2000.
- BLASCO, A. J. et al. “Electrochemical index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1–2, p. 237–244, 2005.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5939–5946, 1 out. 2002.

CANUTO, M. S. **Avaliação da capacidade antioxidante e identificação e quantificação de compostos fenólicos de sementes e cascas de nvos cultivares de girassol (Helianthus annuus L.)**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2017.

CARDOZO, L.; MAFRA, D. Alimentação Pode Levar a Benefícios para o Sistema Cardiovascular : Fato ou Ficção ? **Internacional Journal of Cardiovascular Science**, v. 28, n. 2, p. 87–88, 2015.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. .; MANDARINO, J. M. G. Produtos protéicos do girassol. In: REGINA MARIA VILLAS BÔAS DE CAMPO LEITE, ALEXANDRE MAGNO BRIGHENTI, C. DE C. (Ed.). . **Girassol no Brasil**. Londrina - Embrapa Soja: [s.n.]. p. 51–68.

CASTRO, C.DE; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A.; LEITE,R.M.V.B.DEC.; KARAM, D.; MELLO H.C.; GUEDES, L.C.A.; FARIAS, J. R. B. A cultura do girassol. In: Londrina- Embrapa Soja: [s.n.]. p. 36.

CAVALCANTI, A. L. et al. Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de Frutas Industrializados. In: **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. 1. ed. Paraíba/BR: Universidade Federal da Paraíba, 2006. v. 6p. 57–64.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. [s.l: s.n.].

DALL´AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. Origem e história do girassol. In: Londrina- Embrapa Soja: [s.n.]. p. 163–164.

ESTECA, F. DE C. N. **Manejo integrado de pragas na cultura do morangueiro no sul de Minas Gerais**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 7 jun. 2017.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–8144, 2010.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos - Princípios e Práticas**. 2ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006.

FILIPPI, D.; FRIEDRICH, M. T. **Ação antifúngica do extrato de Physalis peruviana Linnaeus frente ao fungo Botrytis cinerea**. [s.l.] Universidade de Passo Fundo, 2018.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. (EDS.). **Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. In: **Alimentos e Nutrição**. 18. ed. [s.l: s.n.]. p. 229–235.

- GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012.
- GINDRO, K.; PEZET, R. Effects of long-term storage at different temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 1, p. 101–104, 2001.
- GIUDICI, A. M.; REGENTE, M. C.; DE LA CANAL, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 881–888, 2000.
- GOETTEL, M. et al. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. **Algal Research**, v. 2, n. 4, p. 401–408, 2013.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, S. et al. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1713–1719, 2002.
- GRABKE, A. Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry - Molecular Mechanisms and Management. 2014.
- GRIMI, N. et al. Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 1, p. 52–61, 2011.
- HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics**. London: Academic Press Ltd., 1989.
- HUSAINI, A.; NERI, D. **Strawberry Growth, Development and Diseases**. [s.l: s.n.].
- JAEGER, H.; BALASA, A.; KNORR, D. **Food Industry Applications for Pulsed Electric Fields**. [s.l.] Springer, New York, NY, 2008.
- JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 4, p. 728–733, 1 out. 2003.
- KANDUSER, M.; MIKLAVCI, D. **Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials**. [s.l: s.n.].
- KARACA, A. **Biology of Earthworms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. v. 24
- KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia, Vol II**. [s.l: s.n.].
- KING, A.; YOUNG, G. **Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals** **Journal of the American Dietetic Association**, 1999.
- KOIKE, S. T.; GLADDERS, P.; PAULUS, A. **Vegetable Diseases: A Colour Handbook**. 1. ed. Boca Raton/FL: Manson Publishing, 2006.
- KULSHRESTHA, S. A.; SASTRY, S. K. Changes in permeability of moderate electric field

(MEF) treated vegetable tissue over time. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 78–83, 2010.

KULSHRESTHA, S.; SASTRY, S. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 189–194, 2003.

LAGROUH, F.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 3, p. 303–311, 2017.

LEBAR, A. M. et al. Significance of Treatment Energy in Cell Electroporation. **Electro- and Magnetobiology**, v. 17, n. 2, p. 255–262, 1 jan. 1998.

LEBOVKA, N. I. et al. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 2, p. 177–184, 2005.

LOEBLER, M.; DUARTE, P.; CRUZ, A. **Aplicação de extratos de própolis para conservação pós-colheita de morangos**. [s.l.: s.n.].

LÓPEZ, N. et al. **Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety**. 4. ed. [s.l.] Springer-Verlag, 2008.

MACÍAS, F. A. et al. Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 795–800, 1 maio 2006.

MALGARIM, M. B.; CANTILLANO, R. F. F.; COUTINHO, E. F. Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 185–189, ago. 2006.

MANACH, C. et al. Polyphenols - Food Sources and Bioavailability.pdf. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 727–47, 2004.

MARTÍNEZ, G. et al. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 30–35, 2017.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444–3452, 2002.

MIKOLAJCZAK, K. L.; SMITH JR, C. R.; WOLFF, I. A. Phenolic and sugar components of Armavireo variety sunflower (*Helianthus annuus*) seed meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 27–32, 1970.

MILIC, B.; STOJANOVIC, S.; M, V. N. T. Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 108–113, 1968.

MORAES, R. R. **Refratometria**. Disponível em:  
<<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>>. Acesso em: 27 mar. 2006.

MORIDANI, M. Y. et al. Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, and Dihydrocaffeic Acid

Metabolism: Glutathione Conjugate Formation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 11, p. 1432 LP-1439, 1 nov. 2001.

MUHAMMAD, S. A. et al. Effect of antioxidant mineral elements supplementation in the treatment of hypertension in albino rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, 2006.

NARDINI, M. et al. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5735–5741, set. 2002.

PEIXOTO, A. L.; MORIM, M. P. **Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira Ciência e Cultura** scielocec , , 2003.

PICMAN, A. K.; SCHNEIDER, E. F.; GERSHENZON, J. Antifungal activities of sunflower terpenoids. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 18, n. 5, p. 325–328, 1990.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 2000–2009, jul. 2007.

REDDY, M. V. B. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 1, p. 39–51, 2000.

REGENTE, M. C.; DE LA CANAL, L. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 110, n. 2, p. 158–163, 2000.

ROLS, M. P.; TEISSIÉ, J. Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. **Biophysical Journal**, v. 58, n. 5, p. 1089–1098, 1990.

SAKAMOTO, W. et al. Coffee increases levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in rats. **Toxicology**, v. 183, n. 1–3, p. 255–263, 2003.

SARKIS, J. R. Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de tecnologias elétricas no gergelim -. **Tese De Doutorado**, p. 228, 2014.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. ; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 11, p. 401–413, nov. 2001.

SENSOY, I.; SASTRY, S. K. Extraction Using Moderate Electric Fields. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 1, p. 7–13, 2004.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. v. 55, p. 381–387, 2007.

SOARES, A. G. **Perdas pós-colheita de frutas e hortaliças** Fórum Agronegócios da UNICAMP – Qualidade e Segurança de Alimentos. Mesa Redonda – Qual o Tamanho do Desperdício, , 2009.

SOARES, A.; MARTINS, M. Influência de fungos micorrízicos arbusculares, associada à adição de compostos fenólicos no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpus*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 731–740, 2000.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, A. C. P. **Extração de compostos fenólicos de subprodutos do processamento de sementes de girassol**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

SOUZA, A. C. P.; MARCZAK, L. D. F.; SARKIS, J. Extração de Compostos Fenólicos do Subproduto do Processamento De Sementes De Girassol. p. 1–9, 2014.

SUNG, W. S.; LEE, D. G. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 219–226, 2010.

TAHA, F. S. et al. Optimization of the Extraction of Total Phenolic Compounds from Sunflower Meal and Evaluation of the Bioactivities of Chosen Extracts. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 12, p. 1002–1020, 1 dez. 2011.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 853–876, 2001.

TOURNAS, V. H.; KATSLOUDAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 11–17, 2005.

TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. **Biophysical Journal**, v. 60, n. 2, p. 297–306, 1991.

TZORTZAKIS, N. G. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 111–116, 2007.

UPADHYAY, R. C.; HOFRICHTER, M. Effect of phenol on the mycelial growth and fructification in some of basidiomycetous fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 343–347, 1993.

USDA; U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Research Service**. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornel.edu/data-sets/Baseline>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

USDA; U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Share of Brazil ' s Soybean Exports to China Spikes in August**. [s.l: s.n.].

VERBEYST, L. et al. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 269–274, 2010.

WANG, J. et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804–810, 2008.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2002. p. 463–470.

ZARDO, I. et al. Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. **Waste and Biomass Valorization**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2017.

ZARDO, I.; FERREIRA, L. D. **Extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos da torta de semente de girassol**. Porto Alegre / RS: [s.n.].

ZHAO G. V.; ZHONG, P.; CHEN, X. Recent progress and the development strategy of sunflower (*Helianthus annuus*) in China. **Food Industry**, v. 10, p. 76–78, 2011.

ZIMMERMANN, U.; PILWAT, G.; RIEMANN, F. Dielectric Breakdown of Cell Membranes. **Biophysical Journal**, v. 14, n. 11, p. 881–899, 1974.

## Apêndice A – Fotografias dos morangueiros dos cultivares utilizados e suas respectivas estufas.

Figura A.1: Fotografia dos morangueiros do cultivar Albion em sistema semi-hidropônico suspenso no dia da colheita (14/out/2018).



Figura A.2: Fotografia dos morangueiros do cultivar San Andreas em sistema semi-hidropônico suspenso no dia da colheita (14/out/2018).



Figura A.3: Fotografia das estufas de morangueiros; à esquerda plantação do cultivar Albion, à direita, do cultivar San Andreas (14/out/2018).

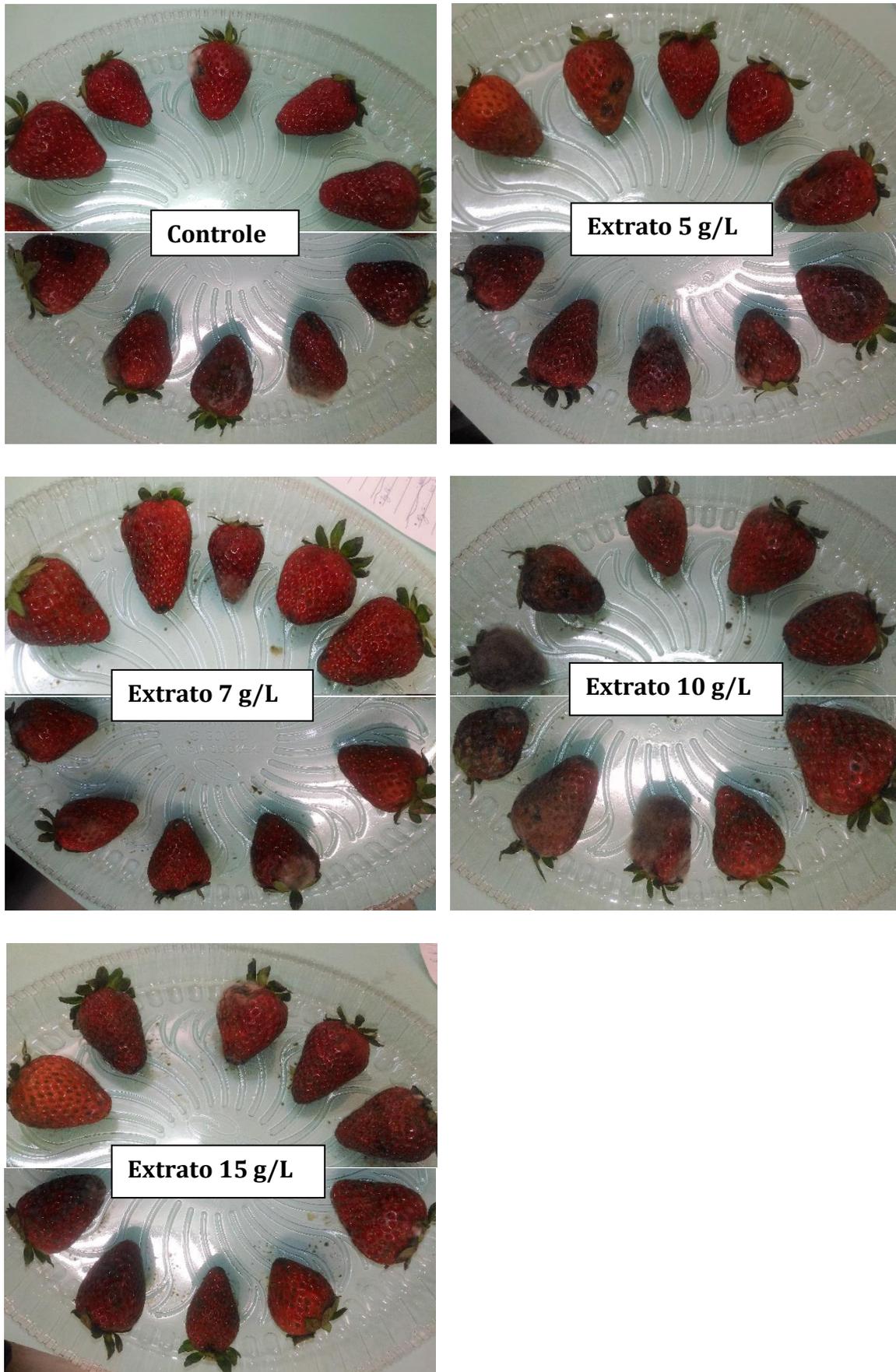


## Apêndice B – Fotografias dos morangos e tabela de observações diárias da primeira etapa de testes com os extratos da TortaLab (5, 7, 10 e 15 g CFT/L).

Tabela B.1: Observações diárias dos morangos com os extratos de 5, 7, 10 e 15 g CFT/L.

	Controle 0 g/L	Extrato 5 g/L	Extrato 7 g/L	Extrato 10 g/L	Extrato 15 g/L
<b>Dia 1 (Seg.)</b>	Aplicação	Aplicação	Aplicação	Aplicação	Aplicação
<b>Dia 2 (Ter.)</b>	Algumas poucas manchas escuras na superfície	Algumas poucas manchas escuras na superfície	Algumas poucas manchas escuras na superfície	Algumas poucas manchas escuras na superfície	Extrato com aroma doce; morangos pegajosos após escumas na superfície
<b>Dia 3 (Qua.)</b>	Manchas de fungos Botrytis + Antracnose	Fungos concentrados nas pontas e distribuídos uniformemente pelos aqüênios ("sementes"); predominantemente Botrytis	Fungos concentrados nas pontas e distribuídos uniformemente pelos aqüênios ("sementes"); predominantemente Botrytis	Regiões maiores de Botrytis e Antracnose, com pontas mais escuras	Regiões de Botrytis e Antracnose, pontas não tão infectadas. 1 mancha de fungo na tampa
<b>Dia 4 (Qui.)</b>	Botrytis nas pontas e superfície; mais manchas de Antracnose. Morangos firmes	Pontas menos firmes, além de manchas de Antracnose	Morangos úmidos; Botrytis mais desenvolvido em algumas regiões, como pontas, meio e próximo às folhas. Fungos na bandeja	Morangos úmidos; Botrytis bem desenvolvidos (longos), assim como Antracnose. Fungos na bandeja	Morangos com pontos de umidade; Botrytis por toda superfície e Oídio bem desenvolvido mais perto das folhas. Fungos na tampa e bandeja
<b>Dia 5 (Sex.)</b>	Alguns morangos com Botrytis e Antracnose muito evoluídos	Maior desenvolvimento de Antracnose e aparência aquosa	Morangos firmes; menor desenvolvimento de Antracnose e Botrytis	Severidade nas infecções de todos os tipos	Antracnose em apenas um morango, no qual há também Botrytis/Oídio bastante desenvolvido
<b>Dia 6 (Sáb.)</b>	4 morangos gelatinosos e com Botrytis/Oídio muito evoluído (longo) por toda superfície; o restante com pequenas manchas de Antracnose	1 dos morangos apresentou perda de líquido na bandeja; 6 morangos em estágio avançado de Botrytis, Antracnose e Aquoso	2 morangos gelatinosos, totalmente infectados por Botrytis, e mais 1 com Botrytis/Oídio bastante evoluído	Todos os morangos gelatinosos e com Botrytis e Antracnose; 7 morangos totalmente infectados	Manchas grandes de Botrytis/Oídio evoluído; 1 dos morangos com Botrytis/Oídio e Antracnose por toda a superfície
<b>Dia 7 (Dom.)</b>	Ao cortá-los ao meio, os 4 morangos com estágio evoluído de Botrytis/Oídio estavam completamente podres; outros 2 apresentavam podridão apenas nas pontas	Ao cortá-los ao meio, os 6 morangos com estágio evoluído de Botrytis/Oídio estavam completamente podres, estando 1 deles com consistência gelatinosa (aquele que perdeu líquido); outros 3 apresentavam regiões de podridão coincidentes com as manchas de antracnose	Ao cortá-los ao meio, 3 morangos estavam completamente podres; outros 4 apresentavam regiões de podridão; nenhum apresentou perda de líquido	7 morangos completamente tomados por Botrytis; 1 totalmente infectado com fungo de aparência estranha (alaranjado, com perda de líquido dessa coloração); 4 morangos com perda de líquido. Ao cortá-los ao meio, apenas 1 não estava completamente podre, estando o de fungo alaranjado também com podridão de coloração diferente	Ao cortá-los ao meio, 5 dos morangos se encontravam completamente podres, os outros 5 apresentavam apenas regiões de podridão

Figura B.1: Fotografias dos morangos no quinto dia.

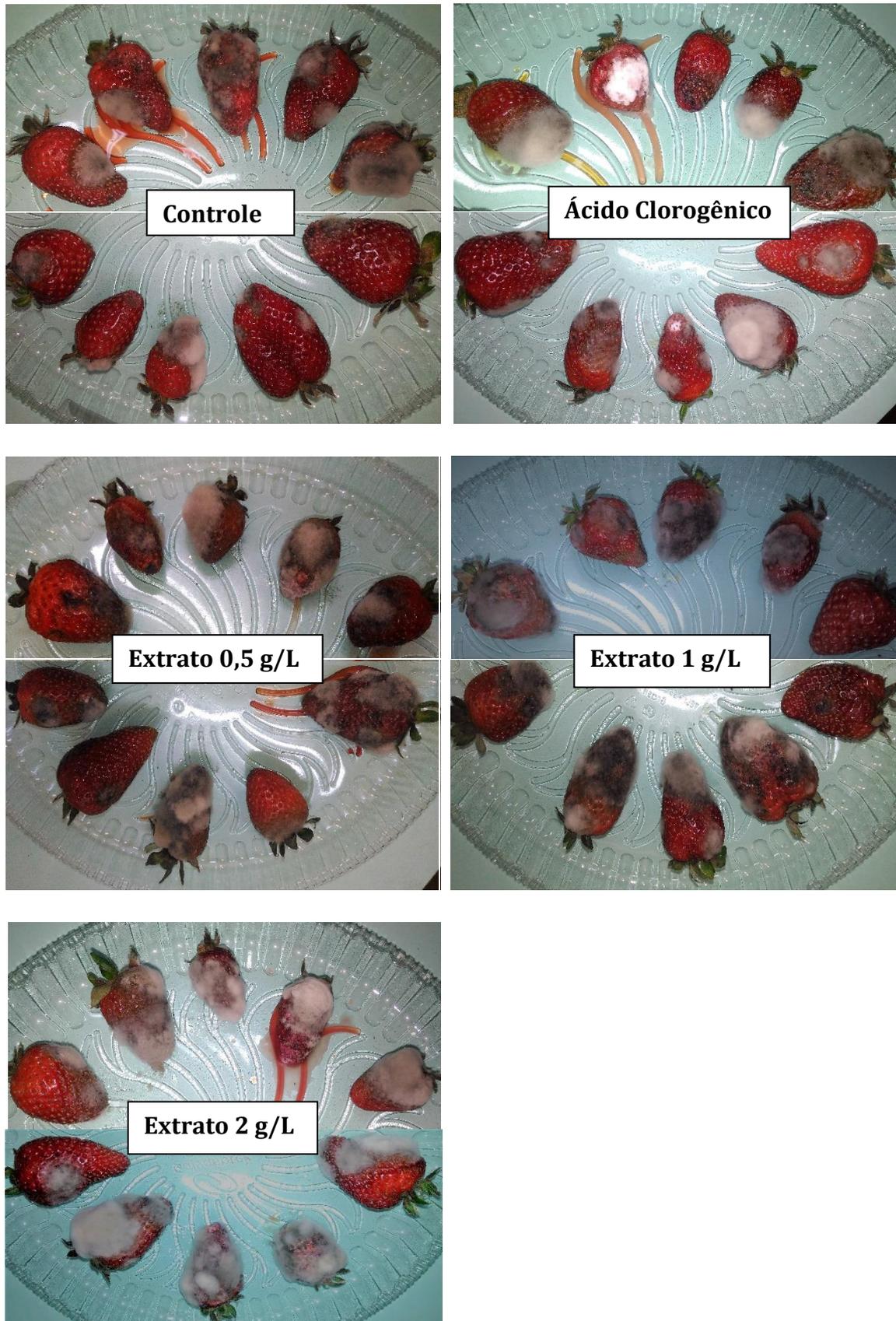


**Apêndice C – Fotografias dos morangos e tabelas de observações diárias da segunda etapa de testes com o ácido clorogênico (1 g CFT/L) e os extratos da TortaLab (0,5; 1 e 2 g CFT/L).**

Tabela C.1: Observações diárias dos morangos com o ácido clorogênico a 1 g CFT/L e os extratos de 0,5; 1, e 2 g CFT/L.

	Controle 0 g/L	Ác. Clorogênico 1 g/L	Extrato 0,5 g/L	Extrato 1 g/L	Extrato 2 g/L
	Aplicação	Aplicação	Aplicação	Aplicação	Aplicação
Dia 1 (Seg.)					
Dia 2 (Ter.)	1 morango com pequena mancha de Botrytis na ponta	1 morango com pequena mancha de Antracnose	2 morangos com pequena mancha de Antracnose	1 morango com Antracnose maior	1 morango com Oídio desenvolvido na ponta e 1 com pequena mancha de Oídio no centro; 1 morango com Antracnose e perda de líquido;
Dia 3 (Qua.)	2 morangos com Oídio evoluído (comprido) e 8 com Antracnose	2 morangos com região de Oídio evoluído; 6 morangos com Antracnose, sendo 3 com Antracnose nas pontas e 1 com Antracnose severa e princípio de perda de líquido	2 morangos gelatinosos; 4 com Oídio bastante evoluído em regiões; manchas de Antracnose menores que no Controle e no Ác. Clorogênico	1 morango com região de Oídio bastante evoluído; 1 com Antracnose evoluída e consistência gelatinosa	2 morangos com Antracnose muito evoluída por toda superfície e consistência gelatinosa, sendo em 1 deles verificada perda de líquido; 6 morangos apresentando Oídio evoluído
Dia 4 (Qui.)	Oídio bastante evoluído e 2 morangos com perda de líquido	Oídio e Antracnose; morangos mais firmes que os Controles, com a exceção de 1, que perdeu líquido	3 morangos gelatinosos e com perda de líquido; Oídio/Botrytis e Antracnose	3 morangos gelatinosos e com perda de líquido; Oídio/Botrytis e Antracnose	3 morangos bastante degradados, de consistência gelatinosa; predominantemente Oídio
Dia 5 (Sex.)	3 morangos com perda de líquido, estando totalmente infectados; o restante com regiões predominantes de Oídio e Botrytis	5 morangos com perda de líquido; 8 gelatinosos; regiões predominantes de Oídio e Botrytis	4 morangos com perda de líquido; 6 gelatinosos; regiões predominantes de Oídio e Botrytis	2 morangos com perda de líquido; 3 gelatinosos; regiões predominantes de Oídio e Botrytis	4 morangos com perda de líquido; 9 gelatinosos; regiões predominantes de Oídio, sendo muito evoluído

Figura C.1: Fotografias dos morangos no quinto dia.



**Anexo A – Curva analítica do ácido gálico utilizado.**

Figura Anexo.1: Curva analítica do ácido gálico, utilizando Folin 2 N, marca MediQuímica fab. maio/17, lote 18732/17.

