



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 de subprodutos do processamento de sementes de girassol

Autor: Ana Cardinale Pereira Souza

Orientador: Ligia Damasceno Ferreira Marczack

M. Sc. Júlia Ribeiro Sarkis

Porto Alegre, janeiro de 13

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Símbolos	vii
1 Introdução	8
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 Girassol	2
2.2 Aproveitamento de resíduos agroindustriais	3
2.3 Compostos fenólicos	5
2.4 Extração com solventes	6
3 Materiais e Métodos	9
3.1 Matéria prima	9
3.1.1 Preparo da amostra	9
3.1.2 Determinação da composição centesimal	9
3.2 Extração dos compostos fenólicos	10
3.3 Determinação dos compostos fenólicos totais	11
3.4 Determinação de flavonoides	12
3.5 Determinação da capacidade antioxidante com o radical ABTS13	
3.6 Planejamento Fatorial	13
4 Resultados	15
4.1 Umidade e estudo da cinética	15
4.2 Fenólicos Totais	16
4.3 Flavonoides	20
4.4 Atividade Antioxidante	24
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	27
6 Referências	28

Agradecimentos

Às minhas orientadoras Ligia e Júlia pela atenção, apoio e orientação dedicados no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos pela ajuda e pelos momentos de alegria durante a execução dos experimentos.

Aos meus pais, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional na escolha da minha carreira profissional e à minha irmã, Naira, pela amizade.

Aos amigos pelo apoio e paciência.

Aos meus queridos amigos Pablo e Gian, pelo companheirismo nas madrugadas escrevendo o TCC.

Resumo

Nas últimas décadas, a exploração de resíduos agroindustriais como fontes promissoras de compostos funcionais e nutricionais tem se intensificado. As tortas de girassol são um subproduto obtido após a extração mecânica do óleo, apresentam alto valor nutricional proteico e são fontes naturais de compostos com atividade antioxidante. No entanto, a presença de compostos fenólicos faz com que ocorra o escurecimento da torta devido à ação da enzima polifenoloxidase reduzindo a digestibilidade das proteínas. Desta forma, a recuperação desses compostos da torta de girassol é bastante relevante, pois os extratos obtidos apresentam notável atividade antioxidante e o valor nutricional dos concentrados e isolados proteicos é mantido ou melhorado. O objetivo desse trabalho foi obter uma condição ótima de extração de compostos fenólicos da torta de girassol liofilizada através da metodologia de superfície de resposta. Para a realização de cada ensaio, a temperatura (25 – 90 °C), a razão sólidos/solvente (1:50 – 1:9) e a concentração de etanol (20 – 80 %) foram determinadas através de um planejamento fatorial. O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico da AOAC e o tempo de extração através de um estudo de cinética, para a temperatura de 58 °C, a razão sólidos/solvente de 1:11 e concentração de etanol de 48%. Os teores de fenólicos totais, de flavonoides e a atividade antioxidante foram quantificados por espectrometria. Para as condições acima mencionadas, os teores de fenólicos totais ficaram na faixa de 8,1 – 14,1 mg AGE/g , os teores de flavonoides na faixa de 7,5 – 22,4 mg EE/g e a atividade antioxidante na faixa de 55,3 – 155,0 mM TE/g, respectivamente. A análise estatística dos valores obtidos mostrou que as variáveis de processo exercem uma influência significativa sobre as variáveis de resposta. Os modelos desenvolvidos por todas as respostas apresentaram uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa para um nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: metodologia de superfície de resposta, torta de girassol e extração de compostos fenólicos.

Lista de Figuras

Figura 3.1 – Fotografia do aparato experimental de extração.....	10
Figura 4.1 – Resultados da cinética de extração de compostos fenólicos da torta de girassol.....	15
Figura 4.2 – Superfícies de contorno para o teor de fenólicos totais (a) da temperatura e razão sólidos/solvente, (b) da concentração de etanol e temperatura e (c) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol.....	18
Figura 4.3 – Superfícies de contorno para o teor de flavonoides (a) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol, (b) da razão sólidos/solvente e temperatura e (c) da concentração de etanol e temperatura.....	22
Figura 4.4 – Superfícies de contorno para a atividade antioxidante (a) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol, (b) da razão sólidos/solvente e temperatura e (c) da concentração de etanol e temperatura.....	26

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Composição química da semente de girassol.....	3
Tabela 3.1 - Planejamento Fatorial Composto Central	14
Tabela 4.1 - Teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante na torta de girassol para as condições estabelecidas no planejamento composto central.	16
Tabela 4.2 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre o teor de fenólicos totais.....	17
Tabela 4.5 - Resultados da análise de variância do modelo reduzido para o teor de fenólicos totais.....	17
Tabela 4.6 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre o teor de flavonoides da torta de girassol.....	20
Tabela 4.7 - Resultados da análise de variância do modelo reduzido para o teor de flavonoides.....	21
Tabela 4.8 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de torta de girassol.	24
Tabela 4.9 - Resultados da análise de variância do modelo reduzido para a atividade antioxidante.....	25

Lista de Símbolos

A absorvância

A_{734} absorvância em 734 nm

β_n coeficientes de regressão

C_1 concentração de fenólicos totais (mg EAG/g)

C_2 concentração de flavonoides (mg EE/g)

C_3 concentração de trolox (mM/g)

E erro médio (%)

m_{au} massa de amostra seca (kg)

m_{as} massa de amostra úmida (kg)

x^w umidade (%)

x_1, x_2, x_3 variáveis independentes

y_i variável de resposta

y_{exp} dados experimentais

y_{cal} valores preditos pelo modelo

1 Introdução

O girassol (*Helianthus annuus* L) é a quarta oleaginosa em produção de óleo comestível do mundo; é cultivado em todos os continentes por apresentar características agrônômicas importantes e uma ampla adaptabilidade a diferentes condições climáticas. No Brasil, a produção de girassol é pouco expressiva, representando apenas 0,5% da produção mundial. No entanto, a cultura do girassol vem se consolidando no país devido às características nutricionais do óleo comestível, rico em ácidos graxos poliinsaturados, e pela política de bioenergia (Castro, Castiglioni *et al.*, 1997).

As tortas são os subprodutos do processo de extração industrial do óleo de girassol por prensagem mecânica; por serem ricos em proteínas são utilizados como ração animal, mas a presença do ácido clorogênico, um potente antioxidante, faz com que ocorra o escurecimento da torta devido à ação da enzima polifenoloxidase reduzindo assim a qualidade nutricional da proteína.

O crescente interesse nos compostos fenólicos está associando às suas propriedades antioxidantes; vários estudos mostram os benefícios à saúde humana proporcionada por uma dieta rica nesses compostos. Esses compostos estão incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres e apresentam uma grande gama de efeitos biológicos incluindo ações antioxidantes, antiviral, antimicrobiana, antitumoral e atividade antibacteriana (Haminiuk, Maciel *et al.*, 2012).

A extração com solventes orgânicos é a metodologia mais empregada na recuperação de compostos fenólicos de frutas e vegetais. Entretanto, o conhecimento do comportamento de alguns fatores que influenciam as condições de extração - tais como tipo de solvente, temperatura, tempo de extração dentre outros - é essencial, pois pode influenciar significativamente a eficácia da extração.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi determinar a melhor condição de extração (temperatura, razão sólidos/solvente e concentração de etanol) de compostos fenólicos da torta de girassol através da metodologia de superfície de resposta.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L) é uma dicotiledônea pertencente à família Asteraceae, originária na América do Norte; destaca-se entre as quatro maiores culturas de oleaginosas produtoras de óleo vegetal comestível do mundo, ficando atrás apenas da palma, da soja e da canola (Usda, 2009).

O girassol apresenta características agronômicas importantes, como maior resistência à seca, ao frio e ao calor do que a maioria das espécies normalmente cultivadas no Brasil. Essa semente apresenta ampla adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas e seu rendimento é pouco influenciado pela latitude, pela altitude e pelo fotoperíodo. Essa versatilidade e a crescente demanda do setor industrial e comercial torna a cultura uma opção nos sistemas de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos (Castro, Castiglioni *et al.*, 1997).

Atualmente, o girassol é cultivado em todos os continentes, atingindo uma área superior a 24 milhões de hectares e uma produção acima de 32 milhões de toneladas. A Rússia é a maior produtora dessa oleaginosa superando 6,7 milhões de toneladas, seguido pela União Europeia com mais de 6,2 milhões de toneladas. Na América do Sul, destaca-se a Argentina com uma produção de aproximadamente 5,0 milhões de toneladas (Agriannual, 2009).

O Brasil é um produtor pouco expressivo de girassol, tendo participado com aproximadamente 0,5% da produção mundial nos últimos dois anos (Castro, Castiglioni *et al.*, 1997). Verifica-se, no entanto, que a produção nacional vem crescendo nos últimos dez anos, estimulado pelo consumo interno, importância da oleaginosa e da política de bioenergia. Quanto às regiões produtoras, destaca-se o Centro-Oeste com aproximadamente 80% tanto de área explorada quanto de produção de grãos, destacando-se as regiões de Goiás e o Mato Grosso, esse último, atualmente, o maior produtor de girassol. A região Sul ocupa a segunda posição com 17% da área explorada e 20% da produção nacional, sendo que o Rio Grande do Sul representa mais de 96% desse total plantado. O restante da produção no Brasil encontra-se na região Nordeste que, nos últimos dois anos, aparece como região produtora destacando-se apenas os estados do Rio Grande do Norte e do Ceará (Abastecimento, Setembro, 2009).

As sementes de girassol constituem uma importante fonte de óleo e proteínas. De acordo com a variedade, condições agronômicas, ambientais, época do ano que foram cultivadas e densidade das sementes, estas podem conter de 38 a 50% de óleos, de 20 a 25% de proteína e teores de 14 a 16 % de fibras, conforme apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição química da semente de girassol

Componentes (%)	Semente de girassol
Umidade	7 - 8
Matéria graxa	38 - 50
Proteína	20 - 25
Fibra bruta	14 - 16
Cinza bruta	3 - 4
Carboidratos	17 - 20

Fonte: (Tsuzuki, 2003), (Portas, 2001)

O óleo de girassol é considerado nobre e com elevado valor nutricional devido à presença de ácidos graxos insaturados. Por ser essencial ao organismo humano, o óleo deve ser ingerido por meio dos alimentos na forma de margarinas, azeites e óleos refinados (Oliveira e Vieira, 2004). Também desempenha funções importantes no organismo humano como produto farmacêutico, atuando como antiinflamatório e redutor de colesterol, contribuindo assim, para a prevenção da aterosclerose e dos problemas cardiovasculares (Castro, Castiglioni *et al.*, 1997; Oliveira e Vieira, 2004).

A maioria dos óleos comestíveis é extraída das sementes por processos industriais convencionais com solvente orgânico e são refinados antes da comercialização. As principais etapas de refinação - neutralização, branqueamento e desodorização - ocorrem em condições muito drásticas, que, inevitavelmente, resultam na perda de substâncias químicas importantes, tais como as vitaminas, os esteróis, fenóis e aromas. Com os avanços tecnológicos, a extração do óleo por prensagem mecânica a frio tem sido cada vez mais utilizada. Essa técnica é considerada economicamente melhor, pois não é necessária a etapa de refino, podendo ser consumido o óleo logo após a etapa de decantação. Esses óleos têm características organolépticas e qualidades nutricionais superiores aos óleos extraídos com solventes (De Leonardis, Macciola *et al.*, 2003).

As tortas de óleos tem alto valor nutricional, com teor de proteína entre 15 e 50 %, sua composição depende da variedade, das condições de cultivo e métodos de extração do óleo. Devido ao seu alto teor de proteína, as tortas são usadas como ração animal, especialmente para ruminantes e peixes (Ramachandran, Singh *et al.*, 2007). No entanto, esses subprodutos podem ter diversas aplicações, como ingrediente funcional, como aditivo em alimentos fortificados e como antioxidante natural para alimentos (Weisz, Kammerer *et al.*, 2009). Entre outras aplicações das tortas estão a produção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas e outros produtos bioquímicos (Ramachandran, Singh *et al.*, 2007).

2.2 Aproveitamento de resíduos agroindustriais

O aproveitamento de subprodutos do processamento de frutas e vegetais como fontes de compostos bioativos tem se intensificado nos últimos anos. Os resíduos orgânicos como farelos, cascas, bagaços, sementes de frutas e cereais têm se mostrado como potenciais ingredientes por serem ricos em proteínas, vitaminas e antioxidantes (Ramachandran, Singh *et al.*, 2007).

De acordo com Schieber *et al.* (2001), a exploração de resíduos agroindustriais como fontes de compostos funcionais e a sua aplicação é um campo promissor que requer uma pesquisa interdisciplinar envolvendo tecnologia de alimentos, química de

alimentos, nutrição e toxicologia. A tecnologia de processamento deve ser aperfeiçoada para minimizar a geração de resíduos e métodos para a completa utilização dos subprodutos devem ser desenvolvidos de modo que possam ser aplicados em larga escala e que tenham custo acessível.

Os compostos extraídos a partir de subprodutos da indústria de alimentos podem ser divididos de forma ampla em: insolúveis (como as fibras, por exemplo); hidrossolúveis (como os compostos fenólicos, por exemplo); e lipossolúveis, que é o caso dos carotenoides (Schieber, Stintzing *et al.*, 2001). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários cujos potenciais efeitos na saúde humana e atividade antioxidante têm sido amplamente revisados. A capacidade antioxidante desses compostos faz com que eles tenham uma ampla gama de aplicações sendo as principais a prevenção de reações de oxidação lipídica em alimentos contendo óleos e gorduras e o uso como ingrediente funcional em alimentos e suplementos alimentares.

No processamento e armazenamento de óleos e gorduras as reações de oxidação lipídica são responsáveis pela deterioração da qualidade dos alimentos, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais. A adição de antioxidantes é necessária, pois proporciona a preservação do sabor, cor e das propriedades nutricionais dos produtos. Os compostos antioxidantes são capazes de evitar as etapas de iniciação e propagação das reações radiculares no processo oxidativo. Na indústria de alimentos são utilizados antioxidantes sintéticos como butil-hidro-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA), propil galato (GP) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), porém estudos mostram que essas substâncias possuem propriedades tóxicas à saúde humana e por isso seu uso é restringido por normas legislativas (Matthäus, 2002).

A obtenção de antioxidantes a partir de extratos vegetais tem sido sugerida como uma importante alternativa frente ao uso de antioxidantes sintéticos, diminuindo assim a oxidação lipídica e o escurecimento não enzimático durante processamento de alimentos (Lugasi, Hovari *et al.*, 2006; Kammerer, Schillmoller *et al.*, 2007)(Porter, Conca *et al.*, 2006).

A disponibilidade de compostos fenólicos em resíduos agroindustriais foi objeto de uma revisão realizada por Moure *et al.* (2001). Entre os resíduos que têm sido estudados como fontes de antioxidantes podem ser citadas: casca de arroz (Ramarathnam, Osawa *et al.*, 1989), cascas de trigo sarraceno (Watanabe, Ohshita *et al.*, 1997), casca de amêndoa (Takeoka e Dao, 2002), bagaço de oliva (Sheabar e Neeman, 1988), sementes e bagaço de uva (Lu e Foo, 1997), bagaço e casca de maçã (Lu e Yeap Foo, 1999), sementes e cascas de frutas cítricas (Bocco, Cuvelier *et al.*, 1998) entre outros.

As características organolépticas dos extratos vegetais devem ser adequadas para a incorporação em produtos alimentares; além da cor e do sabor, os aspectos de custos de produção, atividade antioxidante e atividade tóxica ou patogênica devem ser considerados. Embora, ainda seja necessária uma extensa pesquisa para selecionar as fontes de compostos bioativos, os resíduos agroindustriais são considerados bastante promissores.

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente encontrados no reino vegetal caracterizados pela sua atividade antioxidante, são essenciais para o crescimento e reprodução da planta. A quantidade dessas substâncias é influenciada pelas técnicas de cultivo, condições de crescimento, maturação, bem como condições de processamento e armazenamento (Shahidi e Naczk, 2004).

O crescente interesse nestas substâncias é principalmente devido ao seu potencial antioxidante e aos benefícios à saúde ligados à ingestão regular e à sua biodisponibilidade. Estudos demonstraram a importância do consumo de frutas e vegetais, em particular para a prevenção de doenças associadas com o estresse oxidativo (Haminiuk, Maciel *et al.*, 2012). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo (Kurosumi, Sasaki *et al.*, 2007). Estão incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres e apresentam uma grande gama de efeitos biológicos incluindo ações antioxidantes, antiviral, antimicrobiana, antitumoral e atividade antibacteriana (Haminiuk, Maciel *et al.*, 2012).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (Shahidi e Naczk, 2004). Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Balasundram, Sundram *et al.*, 2006).

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por este ser mais prevalente na etapa da autooxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio (Decker, 1998). O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, pode originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos (Shahidi, Naczk *et al.*, 1992).

O ácido clorogênico (ACG) é o principal composto fenólico presente nas sementes de girassol, sendo também encontradas pequenas quantidades de ácido caféico (AC), cinâmico, cumárico, felúrico, sináptico e ácidos hidroxicinâmicos (Milic, Stojanovic *et al.*, 1968; Mikolajczak, Smith *et al.*, 1970). Quimicamente o ACG é um éster do ácido caféico com o ácido quínico sendo encontrado nos vegetais em três possíveis formas isoméricas: 3-ACG, 4-ACG e 5-ACG. Tanto o ACG quanto o AC são conhecidos como antioxidantes eficazes (Nakatani, Kayano *et al.*, 2000). Kubicka, Jedrychowski *et al.* (1999) demonstraram que esses dois compostos fenólicos são capazes de inibir a ação da enzima lipoxigenase de sementes de girassol. Marinova e Yanishlieva (1997) relataram a eficiente

capacidade antioxidante do ácido caféico em óleo de girassol quando submetidos ao tratamento térmico a 25 e 100 °C.

Ainda que ocorra a remoção dos tocoferóis e parte dos fosfolipídios no processo de extração do óleo, o alto teor de polifenóis nos resíduos da produção de óleo demonstra que o processo de extração não diminui o teor desses compostos, pois dificilmente os ácidos fenólicos se solubilizam na fase lipídica (Matthäus, 2002). A presença do ACG na torta de girassol está associada ao desenvolvimento de uma coloração verde escura e marrom. A reação de escurecimento ocorre pela ação da enzima polifenoloxidase que catalisa a oxidação do ACG em o-quinonas; por serem altamente reativas essas substâncias ligam-se covalentemente com grupos tiol ou amino das proteínas (Nakatani, Kayano *et al.*, 2000).

As proteínas de girassol são deficientes em lisina e a interação dos compostos fenólicos com as proteínas diminui ainda mais o seu valor nutritivo reduzindo a quantidade de aminoácidos essenciais e a digestibilidade, além de alterar suas propriedades organoléptica e funcional, estabilidade e vida de prateleira (Subramanian, Shamanthaka Sastry *et al.*, 1990). Desta forma, a recuperação de compostos fenólicos de tortas de girassol é bastante relevante, pois os extratos obtidos apresentam notável atividade antioxidante e o valor nutricional dos concentrados e isolados proteicos é mantido ou melhorado.

2.4 Extração com solventes

A extração, purificação e identificação de compostos bioativos oriundos de fontes naturais são imprescindíveis, uma vez que estas substâncias são muitas vezes utilizadas na preparação de suplementos alimentares, ingredientes para alimentos funcionais e nutracêuticos, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos e cosméticos (Chavan, Shahidi *et al.*, 2001).

A extração com solventes orgânicos é a metodologia mais empregada na recuperação de compostos fenólicos de frutas e vegetais. Algumas etapas preliminares devem ser realizadas para facilitar o processo de extração e conservação destes compostos antioxidantes, que são sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor (Nacz e Shahidi, 2006).

A solubilidade dos compostos fenólicos está diretamente relacionada com a sua natureza química variando desde substâncias simples ao altamente polimerizado. Nos vegetais as substâncias antioxidantes estão presentes em quantidades variáveis na forma livre ou complexados com carboidratos e proteínas. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido. Portanto, estágios adicionais podem ser necessários para purificar o extrato e remover substâncias fenólicas e não fenólicas indesejáveis, tais como ceras, terpenos, clorofilas e gorduras (Nacz e Shahidi, 2006).

A preparação das amostras desempenha uma etapa importante na quantificação de fitoquímicos, influenciando fortemente a repetibilidade e exatidão da análise (Zhao, Lv *et al.*, 2011). Os vegetais normalmente são desidratados, liofilizados ou congelados, e

ainda peneirados ou moídos antes do processo de extração. Assim, os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente de extração e as enzimas lipoxigenase tornam-se inativas. Tais enzimas, naturalmente presentes em vegetais, são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática (Gámez-Meza, 1999; Juntachote e Berghofer, 2005).

O conhecimento do comportamento de alguns fatores que influenciam as condições de extração, tais como a polaridade do solvente, o tempo de extração, a temperatura, o pH, a razão solvente/soluto e o tamanho de partícula, entre outros é essencial pois podem influenciar significativamente a eficácia da extração (Wettasinghe e Shahidi, 1999; Cacace e Mazza, 2003). A taxa de transferência de massa e equilíbrio são dois conceitos fundamentais que regem o processo de extração (Cacace e Mazza, 2002)

A escolha do solvente mais adequado depende da sua seletividade, miscibilidade, densidade, custo, pressão de vapor, viscosidade, estabilidade química e térmica (Mukhopadhyay, 2006; Prasad, Hassan *et al.*, 2011; Haminiuk, Maciel *et al.*, 2012). A polaridade do solvente desempenha um papel importante na extração seletiva de diferentes antioxidantes: água e os solventes orgânicos tais como metanol, etanol e acetona, bem como misturas aquosas dos mesmos são comumente utilizados (Murga, Ruiz *et al.*, 2000; Shahidi e Naczki, 2004; Sun e Ho, 2005). No entanto, a toxicidade do metanol e da acetona tem levado a um interesse da indústria alimentícia pelo etanol e pela água como solventes extratores.

Mohsen e Ammar (2009) avaliaram os efeitos da polaridade de diferentes tipos de solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, hexano, clorofórmio, butanol, éter de petróleo e cloreto de metileno) e o efeito da polaridade da água no processo de extração de compostos fenólicos de farelo de milho. O etanol mostrou o melhor resultado na extração de compostos fenólicos seguido pelo metanol e pela água. Os solventes com menor polaridade tais como, a acetona, o éter de petróleo, o butanol, o clorofórmio, o cloreto de metileno e hexano, demonstraram uma menor capacidade de extração comparada com os solventes polares.

Matthäus (2002) mostrou que as quantidades de compostos fenólicos extraídas de subprodutos do processamento de oitos sementes oleaginosas foram influenciadas pela polaridade dos solventes utilizados: água, metanol 70%, acetona 70% e acetato de etila. Os resultados indicaram que a quantidades de substâncias extraídas foram menores para solventes com menor polaridade.

A temperatura e o tempo também são variáveis importantes que influenciam a extração de compostos fenólicos. De acordo com Wettasinghe e Shahidi (1999), os compostos antioxidantes podem ser mobilizados tanto em temperaturas mais baixas quanto em temperaturas mais elevadas, porém em temperaturas mais elevadas pode ocorrer a degradação térmica dessas substâncias. Também foi afirmado que a taxa de extração de antioxidantes termicamente estáveis em temperaturas elevadas é maior do que a taxa de decomposição. Isto tem sido sugerido pelo fato de que extratos preparados a temperatura mais elevada apresentaram atividade antioxidante relativamente superior. O aumento da temperatura pode favorecer a extração devido ao aumento da solubilidade dos compostos fenólicos no solvente. Um efeito importante do aumento da temperatura de extração pode ser o aumento da taxa de extração e conseqüentemente, a redução do tempo de extração (Cacace e Mazza, 2002).

Silva, Rogez et al. (2007) avaliaram que a temperatura apresentou uma correlação linear na extração de compostos fenólicos de ioga-cipó *Inga edulis*; a temperatura foi variada 15 a 65 °C e os autores concluíram que, quanto maior a temperatura, mais elevada é a quantidade de fenólicos extraídos.

A razão sólidos/solvente é outro parâmetro importante que deve ser considerado durante a extração, pois determina a quantidade de solvente que será utilizado. O aumento do custo de produção devido ao uso de quantidades elevadas de solvente não está apenas relacionado com a quantidade de solvente empregada, mas também com o custo associado com a sua remoção (Meireles, 2009).

Cacace e Mazza (2003) relataram a influência da razão sólidos/solvente durante a extração de antocianinas de groselhas pretas moídas. Eles concluíram que essa foi a variável mais importante em relação aos demais estudados (temperatura e composição do solvente). O aumento da razão sólidos/solvente foi relacionado com maiores recuperações de antocianinas de uma forma quase linear, para todos os solventes testados, efeito este corroborado de forma teórica pelos princípios de transferência de massa. A razão sólidos/solvente variou de 6 a 74 mL g⁻¹, e os rendimentos de antocianinas ficaram na faixa de 11 a 15 mg g⁻¹.

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo, é apresentada a metodologia empregada para a realização da extração dos compostos fenólicos da torta de girassol, bem como equipamentos e métodos analíticos para determinação dos fenólicos totais, flavonoides e a atividade antioxidante.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e na Central Analítica, localizados no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre.

3.1 Matéria prima

As tortas de girassol utilizadas nos experimentos foram fornecidas pela empresa Vital Âtman situada em Uchoa, São Paulo, Brasil. A empresa é produtora de óleos comestíveis e o processo de produção é constituído apenas pelas etapas de prensagem a frio e decantação dos sólidos. As tortas utilizadas no presente trabalho são provenientes da etapa de prensagem.

Os padrões de Epicatequina, de Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) e do ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato)) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e o ácido gálico da Vetec (São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Merck Millipore Brasil (São Paulo, Brasil) e o álcool etílico PA da Vetec (São Paulo, Brasil).

3.1.1 Preparo da amostra

Previamente às análises, um quilo de torta de girassol foi liofilizado por 12h (Liofilizador LS6000, Terroni, Brasil) e posteriormente o farelo foi homogeneizado passando em uma peneira de mesh 08 com abertura de malha de 2,38 mm. As amostras de farelo de girassol liofilizado foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas a temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

3.1.2 Determinação da umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, de acordo com metodologia (Aoac, 1990). Este método consiste em pesar, em balança analítica, com precisão de 0,0001 g (BOSH, modelo SAE 200, Alemanha), 5 g de amostra em uma cápsula de alumínio previamente seca e colocar em estufa (marca De Léo, modelo A3DGTEMP) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram deixadas durante a noite na estufa e pesadas após, aproximadamente, 15 h. A umidade foi calculada através da diferença de massa antes e após a secagem da amostra, utilizando a Equação 3.1 e o resultado obtido em porcentagem. Todas as análises de umidade deste trabalho foram realizadas em triplicata.

$$x^w = \frac{m_{au} - m_{as}}{m_{au}} \times 100 \quad (3.1)$$

Na Equação 3.1, x^w é a umidade em porcentagem, m_{au} é a massa de amostra úmida e m_{as} é a massa de amostra seca.

3.2 Extração dos compostos fenólicos

Os experimentos envolvendo a extração dos compostos fenólicos da torta de girassol foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa, foi realizada uma cinética de extração desses compostos fixando as demais variáveis que influenciam a extração, com o objetivo de determinar o tempo máximo de extração. Na segunda etapa, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com pontos axiais e seis repetições do ponto central totalizando 20 ensaios. Nesse planejamento foi avaliada a influência de três variáveis independentes: temperatura, razão sólidos/solvente e concentração de etanol.

Na primeira etapa, cada extração foi realizada em um *shaker* (Cientec, modelo CT-712RN, Brasil) na temperatura de 58 °C, sendo que a razão solvente/sólidos foi de 9:1 e os ciclos de extração foram 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos. Aproximadamente 1 g de amostra foi pesado em balança analítica (BOSH, modelo SAE 200, Alemanha), sendo o peso anotado para posterior correção, e diluídos em 9 mL de etanol 48%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Cientec, modelo CT 5000R, Brasil) por 20 min, a 6000 rpm e a temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi coletado em uma proveta de 10 mL e seu volume foi ajustado utilizando a solução extratora. O extrato contendo os compostos fenólicos foi, então, armazenado refrigerado até a realização das análises. As extrações foram realizadas em duplicata.

Na segunda etapa, os experimentos foram realizados em um aparato experimental de extração composto por um banho de aquecimento, um banho de resfriamento, um agitador magnético, uma célula de vidro encamisada e um condensador, conforme visualizado na Figura 3.1.

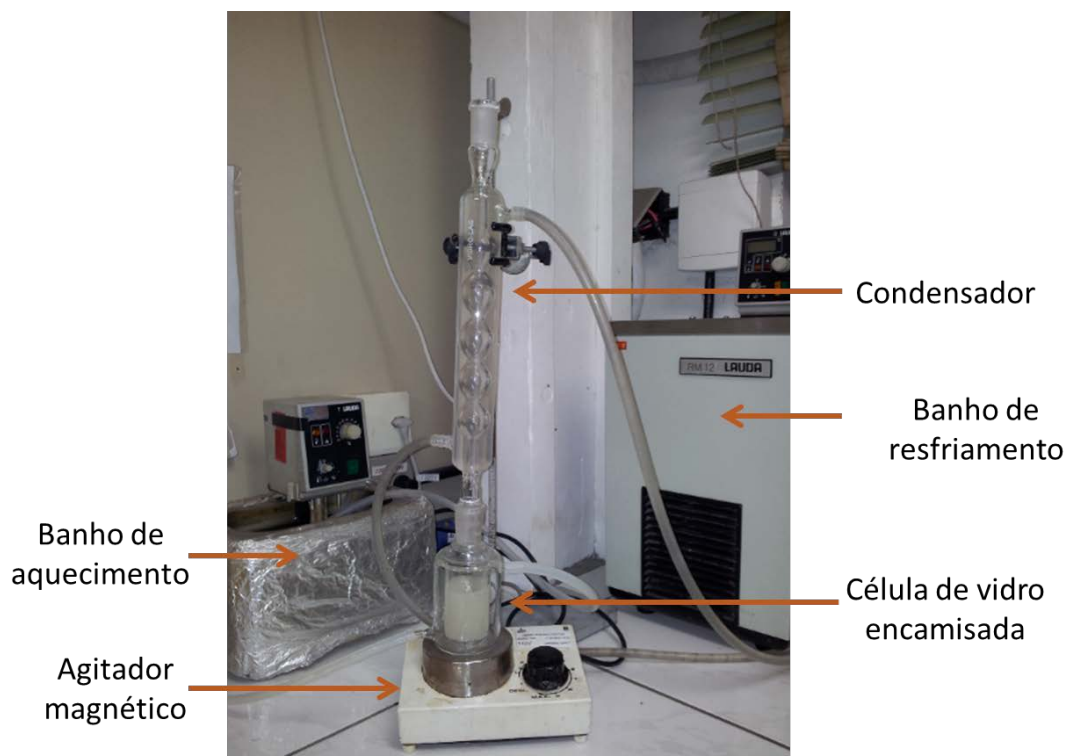


Figura 3.1 – Fotografia do aparato experimental de extração.

A célula de vidro encamisada apresenta 7,5 cm de diâmetro externo, uma altura de 10 cm e um encaixe superior de 5 cm. A célula foi colocada sobre um agitador magnético (Fisatorm, modelo 706 A) e conectada a um banho de aquecimento (Lauda, modelo T, Alemanha) no qual a temperatura foi mantida constante em cada extração. Para evitar a evaporação do solvente durante este período, a célula foi conectada por intermédio do encaixe superior, a um condensador, que por sua vez, está conectado a um banho de resfriamento (Lauda, modelo RM 12, Alemanha) mantido na temperatura de 5 °C.

Cada extração foi realizada no aparato experimental da Figura 3.1 utilizando um ciclo de 40 min na variável temperatura, concentração de etanol e razão solvente/sólidos de acordo com as condições estabelecidas no planejamento fatorial. Aproximadamente 1 g de amostra foi pesado em balança analítica (BOSH, modelo SAE 200, Alemanha), sendo o peso anotado para posterior correção e diluído na solução de extração. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Cientec, modelo CT 5000R, Brasil) por 20 min, a 6000 rpm e a temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi coletado em uma proveta e seu volume foi ajustado utilizando a solução extratora. O extrato contendo os compostos fenólicos foi, então, armazenado refrigerado até a realização das análises.

3.3 Determinação dos compostos fenólicos totais

A metodologia de avaliação dos compostos fenólicos utilizada neste trabalho foi adaptada de Waterhouse (2002). Para avaliação do teor de fenólicos totais nas amostras, 40 µL de extrato (ou padrão de ácido gálico, no caso da curva de calibração) foram adicionados de 3,2 mL de água destilada e 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu; a mistura foi levemente agitada e deixada no escuro por 5 min em um tubo Falcon de 15 mL. Após esse período, à solução foi adicionada de 600 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio, agitada em vortex (Phoenix Lufenco, modelo AP 56, Brasil) por alguns segundos e deixados no escuro, a temperatura ambiente por 1 h. Por fim, as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e foram realizadas as medidas de absorvância utilizando um espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV 1600, Brasil) e comprimento de onda (λ) igual a 765 nm. Os resultados são apresentados na forma de mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra seca.

O branco foi elaborado da mesma forma que as amostras para evitar a leitura de compostos interferentes, apenas substituindo o extrato por água destilada. O valor obtido para o branco foi subtraído das absorvâncias encontradas para as amostras.

Para quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado um padrão externo, preparado separadamente da amostra. A calibração foi realizada através da elaboração de uma curva de calibração, obtendo-se o sinal de resposta (absorvância) como função da concentração conhecida do analito. Para elaboração da curva padrão, primeiramente, foi elaborada uma solução padrão de ácido gálico. A solução consiste na diluição de 0,5 g de ácido gálico em 10 mL de álcool etílico PA em um balão volumétrico de 100 mL, no qual o volume é completado com água destilada (concentração final 5 g L⁻¹). Na obtenção das diferentes diluições da curva de calibração 0,1, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mL de solução foram diluídos em 100 mL de água destilada, a fim de se obter padrões com as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹, respectivamente.

Os teores de fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg EAG/g) sendo determinados pela equação da reta da curva de calibração ($R^2=0,9968$):

$$C_1 = 0,8314A - 0,0448 \quad (3.2)$$

Na Equação (3.2), A é a absorbância e C_1 a concentração de fenólicos totais (mg EAG/g).

3.4 Determinação de flavonoides

A metodologia de avaliação dos flavonoides utilizada neste trabalho foi adaptada de Yang, Liu *et al.* (2009). Para a avaliação da quantidade de flavonoides nas amostras, adicionou-se à 250 μ L de extrato (ou padrão de epicatequina, no caso da curva de calibração) 1,7 mL de água destilada e 75 μ L de solução de nitrito de sódio 5%, a mistura foi levemente agitada e deixada no escuro por 5 min em um tubo Falcon de 15 mL. Após esse período, à solução foi adicionada 150 μ L de solução de cloreto de alumínio 10% e novamente foi levemente agitada e deixada no escuro por 6 min. Em seguida, a solução foi adicionada de 0,5 mL de NaOH 1 mol/L e agitada em vortex (Phoenix Luferco, modelo AP 56, Brasil) por alguns segundos. Por fim, as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e foram realizadas as medidas de absorbância utilizando um espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV 1600, Brasil) e λ igual a 510 nm. Os resultados são apresentados na forma de mg de equivalentes de epicatequina por g de amostra seca.

O branco foi elaborado da mesma forma que as amostras para evitar a leitura de compostos interferentes, apenas substituindo o extrato por água destilada. O valor obtido para o branco foi diminuído das absorbâncias encontradas para as amostras.

Para quantificação dos flavonoides foi utilizado um padrão externo, preparado separadamente da amostra. A calibração foi realizada através da elaboração de uma curva de calibração, obtendo-se o sinal de resposta (absorbância) como função da concentração conhecida do analito. Para elaboração da curva padrão, primeiramente, foi elaborada uma solução padrão de epicatequina. A solução consiste na diluição de 0,1 g de epicatequina em 10 mL de metanol PA em um balão volumétrico de 100 mL, no qual o volume é completado com água destilada (concentração final 1 g L⁻¹). Na obtenção das diferentes diluições da curva de calibração 0,1, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mL de solução foram diluídos em 100 mL de água destilada, a fim de se obter padrões com as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹, respectivamente.

Os teores de flavonoides foram expressos em equivalente de epicatequina por grama de amostra em base seca (EE mg/g) sendo determinados pela equação da reta da curva de calibração ($R^2=0,9956$):

$$C_2 = 2,8522A - 0,0117 \quad (3.3)$$

Na Equação (3.3), A é a absorbância e C_2 a concentração de epicatequina (mg EE/g).

3.5 Determinação da capacidade antioxidante com o radical ABTS

Nesta análise foi utilizado o método de Re, Pellegrini *et al.* (1999). Inicialmente, o reagente ABTS foi dissolvido em 50 mL água, obtendo-se uma concentração de 7 mM. O cátion ABTS foi produzido reagindo essa solução com persulfato de potássio 140 mM e deixando esse mistura no escuro por 16 h antes do uso. Para o ensaio, a solução contendo o radical ABTS foi diluída em álcool etílico PA até que a absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) a 734 nm fosse atingida. Alíquotas de extrato de 30 μ L foram misturadas com 3 mL da solução de ABTS ($A_{734} = 0,70 \pm 0,05$) e a absorbância foi determinada após 6 min a 734 nm. Os extratos foram diluídos 1:3 de forma que as absorbâncias ficassem dentro da faixa obtida na curva de calibração.

Para elaboração da curva de calibração, primeiramente, foi elaborada uma solução padrão de Trolox 2 mM. A solução consiste na diluição de 25 mg de trolox em 10 mL de etanol PA em balão volumétrico de 50 mL, no qual o volume é completado com o mesmo solvente. Na obtenção das diferentes diluições da curva de calibração 0,5, 2,5, 5, 7,5 e 10 mL de solução foram diluídos em 10 mL de etanol, a fim de se obter padrões com as concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μ M, respectivamente.

A atividade antioxidante foi expressa em equivalente de Trolox por grama de amostra em base seca (μ M TE/g) sendo determinado pela equação da reta da curva de calibração ($R^2=0,9972$):

$$A_{734} = -0,0003C_3 + 0,6779 \quad (3.4)$$

Na Equação (3.4), A_{734} é a absorbância em 734 nm e C_3 a concentração de Trolox (μ M TE/g).

3.6 Planejamento Fatorial

Para analisar diferentes condições de extração de compostos fenólicos da torta de girassol, foi realizado um planejamento composto central, que consiste num fatorial 2^3 incluindo seis pontos axiais e seis repetições no ponto central (totalizando 20 ensaios).

As variáveis independentes, temperatura (x_1), razão sólidos/solvente (x_2) e concentração de etanol (x_3), foram avaliadas em cinco níveis. Os níveis de temperatura, razão sólidos/solventes e a concentração de etanol estão mostrados na Tabela 3.1. As respostas avaliadas estatisticamente foram o teor de fenólicos totais (y_1), o teor de flavonoides (y_2) e atividade antioxidante (y_3).

O modelo polinomial de segunda ordem foi estabelecido para a modelagem dos dados experimentais:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad (3.2)$$

Na Equação 3.2, β_n são os coeficientes de regressão; y_i a variável de resposta e x_1, x_2 e x_3 são as variáveis independentes. Ademais, foram avaliados modelos reduzidos desconsiderando as variáveis não significativas, com um grau de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Foi calculado o erro médio do modelo obtido através da equação:

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{exp} - y_{cal}|}{y_{exp}} \quad (3.5)$$

onde E é o erro médio, n é o número de dados experimentais, y_{exp} são os dados experimentais e o y_{cal} são os valores preditos pelo modelo.

Para a análise dos dados obtidos experimentalmente foi utilizada a metodologia de superfície de resposta através do *software* Statistica® versão 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa OK, USA).

Tabela 3.1 - Planejamento Fatorial Composto Central

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Temperatura (°C)	Razão sólidos/solvente	Concentração de etanol (%)
1	-1	-1	-1	38	1:26	32
2	1	-1	-1	77	1:26	32
3	-1	1	-1	38	1:11	32
4	1	1	-1	77	1:11	32
5	-1	-1	1	38	1:26	68
6	1	-1	1	77	1:26	68
7	-1	1	1	38	1:11	68
8	1	1	1	77	1:11	68
9	-1,68	0	0	25	1:15	50
10	1,68	0	0	90	1:15	50
11	0	-1,68	0	58	1:50	50
12	0	1,68	0	58	1:9	50
13	0	0	-1,68	58	1:15	20
14	0	0	1,68	58	1:15	80
15	0	0	0	58	1:15	50
16	0	0	0	58	1:15	50
17	0	0	0	58	1:15	50
18	0	0	0	58	1:15	50
19	0	0	0	58	1:15	50
20	0	0	0	58	1:15	50

X_i variáveis codificadas

4 Resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a obtenção de uma condição ótima de extração de compostos fenólicos da torta de girassol através da metodologia de superfície de resposta.

Este capítulo foi dividido em quatro seções. Inicialmente são apresentados os resultados da umidade da matéria-prima e do estudo da cinética de extração. Na sequência, são apresentados os resultados relativos às análises espectrofotométricas dos extratos referentes aos teores de fenólicos totais, os teores de flavonoides e a atividade antioxidante.

4.1 Umidade e estudo da cinética de extração

A análise da umidade foi determinada através do método gravimétrico descrito na seção 3.1.2 e a torta de girassol apresentou uma umidade de $3,7\% \pm 0,2$ após a liofilização. A análise antes do processo de liofilização era de $7,62\% \pm 0,04$. Esse pré-processo foi realizado para minimizar a umidade das amostras e, desta forma, retardar as reações de degradação do produto.

A Figura 4.1 mostra os resultados obtidos no estudo da cinética de extração dos compostos fenólicos, onde os valores de fenólicos totais estão plotados versus o tempo. A análise desta figura mostra que os teores de fenólicos totais permaneceram constantes após 25 minutos de extração para as condições descritas na seção 3.2. Portanto, foi estabelecido um tempo de extração de 40 min para a realização dos experimentos do planejamento fatorial descrito na seção 3.6.

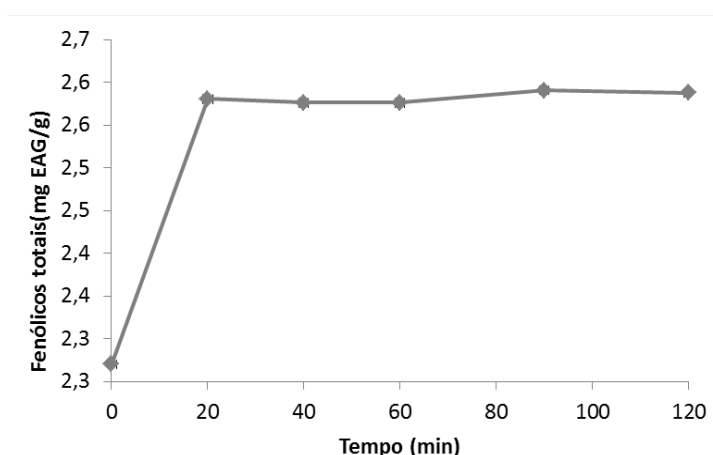


Figura 4.1 – Resultados da cinética de extração de compostos fenólicos da torta de girassol.

4.2 Fenólicos Totais

Os teores de fenólicos totais da torta de girassol foram determinados através da absorbância da reação utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.1, assim como o desvio padrão para as triplicatas das análises realizadas no espectrofotômetro.

Tabela 4.1 - Teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante na torta de girassol para as condições estabelecidas no planejamento composto central.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão sólidos/solvente	Concentração de etanol (%)	Fenólicos totais (mg AGE/g)	Flavonoides (mg EE/g)	ABTS ⁺ (mM TE/g)
1	38	26	32	14,1 ± 0,4	16,7 ± 0,5	77,9 ± 1,3
2	77	26	32	11,0 ± 0,1	22,4 ± 0,8	85,32 ± 1,95
3	38	11	32	8,8 ± 0,4	8,7 ± 0,2	55,3 ± 0,7
4	77	11	32	8,1 ± 0,2	11,1 ± 0,2	57,5 ± 1,2
5	38	26	68	11,32 ± 0,09	18,2 ± 0,4	79,09 ± 1,95
6	77	26	68	10,7 ± 0,4	15,7 ± 0,4	86,1 ± 2,1
7	38	11	68	11,0 ± 0,2	9,9 ± 0,1	56,7 ± 1,9
8	77	11	68	10,9 ± 0,3	7,5 ± 0,2	65,9 ± 2,5
9	25	15	50	12,1 ± 0,2	11,02 ± 0,09	64,2 ± 1,1
10	90	15	50	7,1 ± 0,2	9,0 ± 0,1	69,9 ± 1,2
11	58	50	50	10,2 ± 0,3	21,3 ± 0,3	155,0 ± 6,7
12	58	9	50	9,8 ± 0,4	8,43 ± 0,06	63,5 ± 1,6
13	58	15	20	12,3 ± 0,2	11,7 ± 0,1	74,0 ± 1,1
14	58	15	80	10,5 ± 0,2	9,79 ± 0,04	66,4 ± 0,2
15	58	15	50	13,6 ± 0,2	12,08 ± 0,07	74,7 ± 1,2
16	58	15	50	11,6 ± 0,2	10,6 ± 0,2	79,9 ± 0,7
17	58	15	50	11,4 ± 0,1	10,01 ± 0,07	99,9 ± 3,2
18	58	15	50	12,2 ± 0,2	10,99 ± 0,03	78,9 ± 0,5
19	58	15	50	11,6 ± 0,3	12,17 ± 0,09	70,2 ± 1,7
20	58	15	50	12,1 ± 0,3	10,4 ± 0,3	89,5 ± 1,8

Os resultados apresentados nessa tabela mostram que o teor de fenólicos totais ficou na faixa de 8,1 – 14,1 mg AGE/g de torta.

Através da metodologia de superfície de resposta foi avaliada a influência das três variáveis em estudo sobre os teores de fenólicos totais extraídos da torta de girassol. Foram calculados os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações, assim como o erro puro, o coeficiente *t* e a significância estatística (*p*), conforme a Tabela 4.2.

O valor do coeficiente p está relacionado com o nível de significância da variável independente sobre a variável de resposta em estudo. Normalmente, é escolhido como intervalo de confiança o valor de 95%, sendo assim, pode-se afirmar que para valores de p inferiores a 0,05 a variável é considerada estatisticamente significativa. Caso contrário, a variável é considerada não significativa. A Tabela 4.2 mostra que os fatores lineares (L) e quadráticos (Q) da temperatura (T) e da razão sólidos/solvente (R) bem como a interação entre a concentração de etanol (C_{etanol}) e a razão sólidos/solvente foram significativos para o nível de confiança de 95%.

Tabela 4.2 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre o teor de fenólicos totais

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t(5)	Coeficiente p
Média	11,94	0,27	44,15	0,00
T (L)	-1,89	0,42	-4,47	0,01
T (Q)	-1,52	0,41	-3,70	0,01
R (L)	-1,29	0,42	-3,05	0,03
R (Q)	-1,22	0,41	-2,98	0,03
R (L) x C_{etanol} (L)	2,05	0,55	3,71	0,01

L - efeito linear Q - efeito quadrático

T - temperatura R - razão sólidos/solvente C_{etanol} - concentração de etanol

Os valores dos efeitos estimados indicam quanto cada fator influencia a resposta estudada. Quanto maior o seu valor, maior é a sua influência. O valor de t indica a variável em relação ao seu desvio. Portanto, quanto maior o valor de t maior é a probabilidade de a variável ser estatisticamente significativa. Dentre os fatores significativos, a temperatura apresentou o menor valor p e o maior valor t , mostrando ser a variável que mais influencia no teor de fenólicos totais.

Mazza e Cacace (2003) apresentaram resultados semelhantes para os teores de fenólicos totais e antocianinas extraídas de groselhas pretas. Nesse estudo, eles verificaram que a temperatura e a razão sólidos/solvente exerceram efeitos lineares e quadráticos negativos. Isso significa que o aumento da temperatura e da razão sólidos/solvente provoca um decréscimo da variável de resposta.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo reduzido a um nível de confiança de 95%. Na Tabela 4.5 encontram-se os valores calculados e tabelados de F. O modelo apresentou regressão significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) e o coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo foi de 0,7270. A falta de ajuste não foi significativa.

Tabela 4.5 - Resultados da análise de variância do modelo reduzido para o teor de fenólicos totais.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	38,94	5	7,79	7,46	2,96
Resíduo	14,62	14	1,04		
Erro puro	11,57	9	1,29		
Falta de ajuste	3,05	5	0,61		
Total	53,55	19			

O modelo reduzido e codificado proposto para representar o teor de fenólicos totais (y_1) na torta de girassol é representado pela seguinte equação:

$$y_1 = 11,94 - 1,89x_1 - 1,52x_1^2 - 1,29x_2 - 1,22x_2^2 + 2,05x_2x_3 \quad (4.1)$$

O erro médio (calculado pela equação 3.3) foi de 6,74% indicando que o ajuste é adequado. De acordo com Neto, Scarminio e Bruns (1995), valores de erro médio abaixo de 10% indicam um ajuste adequado para propósitos práticos.

As superfícies de contorno do modelo reduzido são apresentadas na Figura 4.2. A Figura 4.2 (a) mostra a variação do teor de fenólicos totais em função da temperatura e da razão sólidos/solvente. Observa-se que o aumento da temperatura e da razão sólidos/solvente provoca uma diminuição do teor de fenólicos totais. A maior concentração de compostos fenólicos foi obtida na temperatura de 46 °C.

Na Figura 4.2 (b) é visualizada a superfície de contorno para as variáveis independentes concentrações de etanol e temperatura. Observa-se que o teor de fenólicos totais não é influenciado pela concentração de etanol. A variável de resposta atinge valores máximos para temperaturas na faixa entre 25 e 50°C em toda a faixa de concentração de etanol estudada.

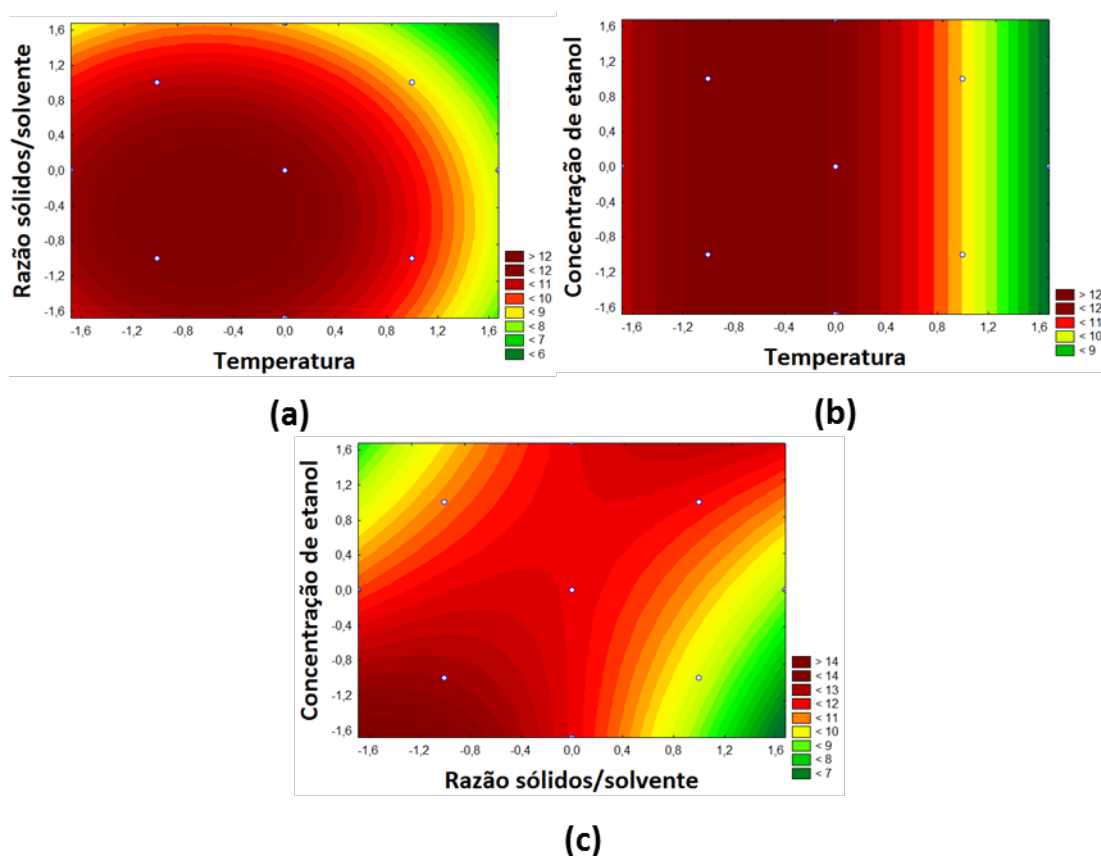


Figura 4.2 – Superfícies de contorno para o teor de fenólicos totais (a) da temperatura e razão sólidos/solvente, (b) da concentração de etanol e temperatura e (c) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol em valores codificados.

A Figura 4.2 (c) mostra a variação do teor de fenólicos totais em função da concentração de etanol e da razão sólidos/solvente. Nessa figura é possível observar que o teor de fenólicos totais é influenciado pela interação entre esses dois parâmetros. A maior concentração de compostos fenólicos foi obtida com maiores volumes de solvente e menores concentrações de etanol.

Durante o processo de extração, em temperaturas mais elevadas pode ocorrer o aumento da solubilidade dos compostos fenólicos, da taxa de difusão e da taxa de extração devido à redução da viscosidade e da tensão superficial do solvente (Ju & Howard, 2003). No entanto, o aumento da temperatura pode promover a degradação dos compostos fenólicos proporcionados pelas modificações na sua estrutura química (Fernandez *et al.*, 1997).

O aumento do rendimento total de compostos fenólicos com o decréscimo da razão sólidos/solvente é consistente com os princípios de transferência de massa. A força motriz da transferência de massa no interior do sólido é o gradiente de concentração. Em condições mais diluídas, o gradiente de concentração do sistema sólido-solvente é maior, portanto, uma maior quantidade de compostos fenólicos é difundida do interior do sólido para o solvente (Cacace e Mazza, 2003)

Prasad, Hassan *et al.*(2011) determinaram a condição ideal para a extração de compostos fenólicos totais de cascas de *Mangifera pajang* Kosterm através da metodologia de superfície de resposta. As variáveis estudadas foram a temperatura (30 - 65°C), razão sólidos/solvente (1:50 - 1:20) e a concentração de etanol (20 - 80%). A condição ótima de extração desses compostos foi uma temperatura de 55 °C, uma razão de sólidos/solvente de 1:32,7 e uma concentração de etanol de 68%.

4.3 Flavonoides

Os teores de flavonoides da torta de girassol foram determinados de acordo com a metodologia descrita na seção 3.4. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.1 assim como o desvio padrão para as três análises realizadas no espectrofotômetro. Nessa mesma tabela, verifica-se que a quantidade de flavonoides ficou na faixa de 7,5 – 22,4 mg EE/g de torta.

A Tabela 4.6 apresenta a avaliação estatística dos dados obtidos para o teor de flavonoides. Conforme pode ser observado nesta tabela, os efeitos significativos, para um nível de 95% de confiança, são os dos fatores lineares e quadráticos da razão sólidos/solvente, o fator linear da concentração de etanol e a interação deste com a temperatura.

Tabela 4.6 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre o teor de flavonoides da torta de girassol.

Fatores	Efeito Estimado	Erro puro	t(5)	Coefficiente p
Média	11,22	0,26	43,96	0,01
R (L)	-8,38	0,48	-17,35	0,00
R (Q)	3,43	0,47	7,34	0,00
C_{etanol} (L)	-1,60	0,48	-3,30	0,02
T (L) x C_{etanol} (L)	-3,28	0,63	-5,20	0,00

Gan e Latiff (2011) avaliaram os teores de flavonoides extraídos da vagem *Parkia speciosa* para diferentes razões de sólidos/solvente, temperaturas e tempo de extração. Nesse estudo, eles mostraram que apenas os fatores lineares e quadráticos da variável razão sólidos/solvente apresentaram significância a um nível de confiança de 95 %. Ademais, os maiores teores de flavonoides foram obtidos para a condição de amostras mais diluídas.

A Tabela 4.7 mostra a análise de variância (ANOVA) para a significância da regressão e a falta de ajuste do modelo reduzido a um nível de confiança de 95%. O modelo apresentou regressão significativa, pois o $F_{\text{calculado}}$ de 46,47 foi superior ao F_{tabelado} de 3,06. O modelo explicou 92,57% da variação dos dados observados ($R^2 = 0,9257$) e a falta de ajuste desse modelo não foi significativa.

Tabela 4.7 - Resultados da análise de variância do modelo reduzido para o teor de flavonoides.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	312,86	4	78,22	46,47	3,06
Resíduo	25,25	15	1,68		
Erro puro	21,26	10	2,13		
Falta de ajuste	3,98	5	0,80		
Total	338,11	19			

O modelo reduzido e codificado proposto para representar o teor de flavonoides (y_2) na torta de girassol é representado pela Equação 4.2 e o erro médio (calculado pela equação 3.3) foi de 7,24% indicando que o ajuste é adequado.

$$y_2 = 11,22 - 4,19x_2 - 1,71x_2^2 - 0,80x_3 - 1,64x_1x_3 \quad (4.2)$$

As superfícies de contorno do modelo reduzido são apresentadas na Figura 4.3. A Figura 4.3 (a) mostra a variação do teor de flavonoides em função da razão sólidos/solvente e da concentração de etanol. A Figura 4.3 (b) mostra a variação do teor de flavonoides em função da razão sólidos/solvente e temperatura; observa-se uma região de máximo da variável de resposta para menores razões sólidos/solvente em ambas as superfícies de contorno, o que também foi observado para fenólicos totais.

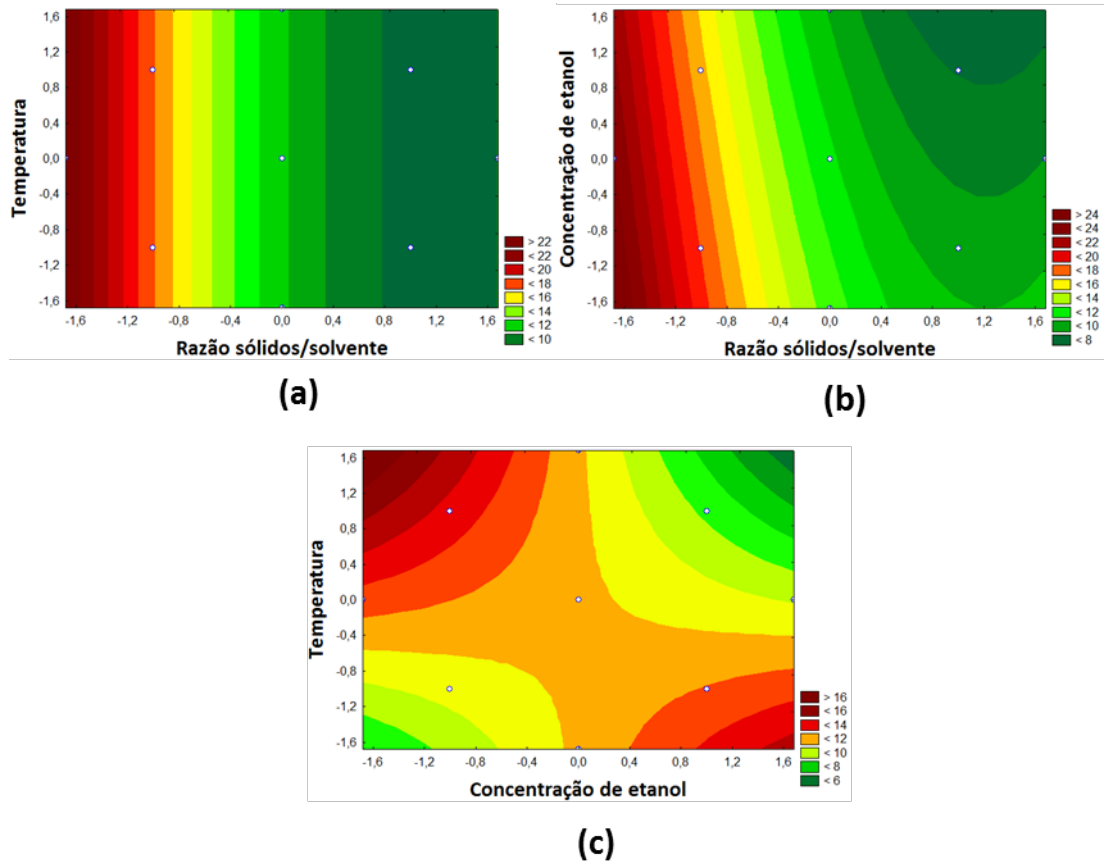


Figura 4.3 – Superfícies de contorno para o teor de flavonoides (a) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol, (b) da razão sólidos/solvente e temperatura e (c) da concentração de etanol e temperatura em valores codificados.

Na Figura 4.3 (c) é visualizada a superfície de contorno para as variáveis independentes concentrações de etanol e temperatura. Nessa figura é possível observar que para menores concentrações de etanol o aumento da temperatura aumenta o teor de flavonoides. Ademais, verifica-se que para temperaturas menores o aumento da concentração de etanol aumenta o teor de flavonoides totais.

Acredita-se que para a condição de menor concentração de etanol sejam extraídas substâncias com maior polaridade e para tanto é necessário maiores temperaturas. Já para a condição de maior concentração de etanol e baixas temperaturas sejam extraídos substâncias com menor polaridade. Entretanto, uma análise mais aprofundada desse comportamento precisa ser realizada para que o mecanismo de extração nessas condições seja melhor compreendido. As análises espectrofotométricas podem ser comprometidas pela presença de interferentes (como as proteínas, por exemplo) o que pode justificar comportamentos inesperados durante a extração dos compostos.

Borges, Vieira *et al.* (2011) avaliaram a influência dos parâmetros razão sólidos/solvente e tempo de extração sobre os teores de flavonoides extraídos da polpa da juçara (*Euterpe edulis*) utilizando o metanol como solvente extrator. Esses pesquisadores mostraram que maiores quantidades de flavonoides foram obtidas

utilizando menores razões sólidos/solvente, o que corrobora os resultados obtidos para essa variável no presente trabalho.

4.4 Atividade Antioxidante

Os valores de atividade antioxidante dos extratos são apresentados na Tabela 4.1, sendo que estes valores representam à média e o desvio padrão das três análises para cada ponto realizadas no espectrofotômetro. A partir desses resultados foi realizada uma análise estatística e conforme a Tabela 4.8, verifica-se que os efeitos significativos para um nível de confiança de 95 % são o fator quadrático da temperatura e o fator linear da razão sólidos/solvente. Os outros fatores apresentados na tabela, fatores quadráticos da razão sólidos/solvente e da concentração de etanol, foram mantidos no modelo por estarem muito próximos de serem estatisticamente significantes.

Tabela 4.8 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de torta de girassol.

Fatores	Efeito Estimado	Erro puro	t(5)	Coefficiente p
Média	82573,20	4406,67	18,74	0,00*
T (Q)	-15676,90	5701,81	-2,75	0,04*
R (L)	-36169,00	5850,45	-6,18	0,00*
R (Q)	14212,70	5701,81	2,49	0,05
C _{etanol} (Q)	-13435,10	5701,81	-2,36	0,07

* significativo (<0,05)

A Tabela 4.9 mostra a análise de variância (ANOVA) para a significância da regressão e a falta de ajuste do modelo reduzido a um nível de confiança de 95%. O modelo apresentou regressão significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$). O modelo explicou 77,59% da variação dos dados observados ($R^2 = 0,7759$) e a falta de ajuste desse modelo não foi significativa.

Tabela 4.9 - Resultados da análise de variância do modelo reduzido para a atividade antioxidante.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	6,89E+09	4	1,72E+09	12,99	3,06
Resíduo	1,99E+09	15	1,33E+08		
Erro puro	1,41E+09	10			
Falta de ajuste	5,84E+08	5			
Total	8,88E+09	19			

O modelo reduzido e codificado proposto para representar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos da torta de girassol é representado pela seguinte equação:

$$y_3 = 82573,2 - 7838,5x_1^2 - 18084,5x_2 + 7106,4x_2^2 - 6717,6x_3^2 \quad (4.3)$$

O erro médio (calculado pela equação 3.3) foi de 9,99% indicando que o ajuste é adequado.

A Figura 4.4 representa as curvas de contorno para a atividade antioxidante. A Figura 4.4 (a) mostra a variação da atividade antioxidante em função da temperatura e razão sólidos/solvente enquanto que a Figura 4.4 (b) mostra a atividade antioxidante em função da concentração de etanol e razão sólidos/solvente. Verifica-se que nesses dois casos, a atividade antioxidante é superior quando se utiliza uma menor razão sólidos/solvente.

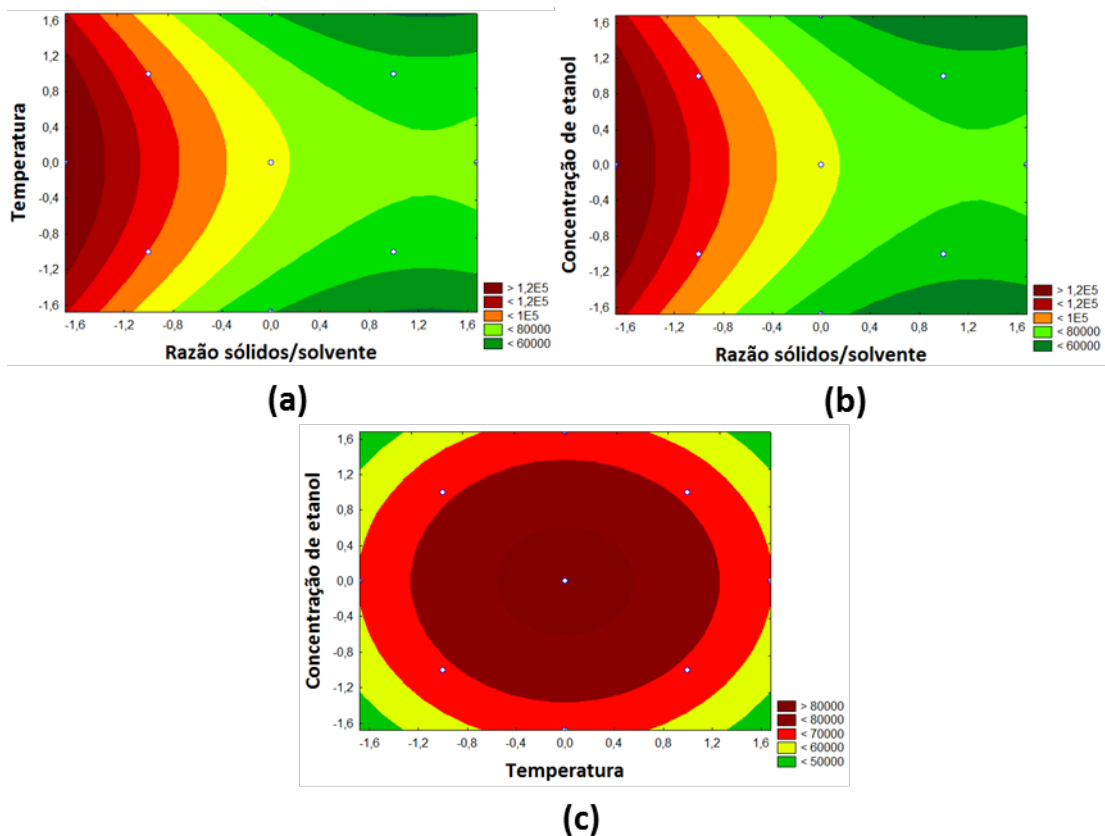


Figura 4.4 – Superfícies de contorno para a atividade antioxidante (a) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol, (b) da razão sólidos/solvente e temperatura e (c) da concentração de etanol e temperatura em valores codificados.

A Figura 4.4 (c) mostra a superfície de contorno para as variáveis independentes temperatura e concentração de etanol, sendo possível observar que existe uma região central máxima dentro dos limites de temperatura e concentração de etanol estabelecido pelos ensaios; as regiões em vermelho escuro correspondentes às maiores atividades antioxidantes.

Liyana-Pathirana e Shahidi (2005) analisaram os efeitos da variação da temperatura (30 – 70 °C), do tempo de extração (45 – 75 min) e da concentração de etanol (40 – 80%) sobre a atividade antioxidante de semente e do farelo de trigo através da metodologia de superfície de resposta. Nesse estudo, a maior atividade antioxidante para a semente de trigo foi obtida na temperatura de 61 °C, tempo de extração de 64 min e concentração de etanol de 54%. Enquanto, que para o farelo a maior atividade antioxidante foi obtida na temperatura de 64 °C, tempo de extração de 60 min e concentração de etanol de 49%.

Inglett, Chen e Lee (2011) mostraram que as atividades antioxidantes de extratos fenólicos de sementes de trigo foram maiores para a condição de extração realizada na temperatura de 50 °C, concentração de etanol de 50% e razão sólidos/solvente de 1:100.

Prasad, Hassan *et al.* (2011) analisaram os efeitos da variação da temperatura (30 - 65°C), da razão sólidos/solvente (1:50 - 1:20) e da concentração de etanol (20 - 80%) sobre a atividade antioxidante de cascas de *Mangifera pajang* Kosterm através da metodologia de superfície de resposta. Nesse estudo, a maior atividade antioxidante foi obtida para uma temperatura de 56 °C, uma razão sólidos/solvente de 1:31,8 e uma concentração de etanol de 68%.

Esses resultados são similares aos obtidos nesse trabalho no qual as condições para a obtenção do extrato com maior atividade antioxidante foram temperatura igual a 58 °C, concentração de etanol de 50% e razão sólidos/solvente de 1:50.

5 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como objetivo determinar a melhor condição de extração de compostos fenólicos da torta de girassol através da metodologia de superfície de resposta. O processo foi otimizado com relação à temperatura (25 – 90 °C), a razão sólidos/solvente (1:9 – 1:50) e a concentração de etanol (20 – 80%). Os teores de fenólicos totais, de flavonoides e a atividade antioxidante foram as variáveis de resposta para um planejamento composto central 2³. Os modelos desenvolvidos por todas as respostas apresentaram uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa para um nível de confiança de 95%.

Os teores de fenólicos totais ficaram na faixa de 8,1 – 14,1 mg EAG/g de torta. De acordo com a análise estatística realizada, apenas a temperatura, a razão sólidos/solvente e a interação deste com a concentração de etanol foram significativas; essa análise apresentou um coeficiente de determinação de 0,7270 e o erro médio foi de 6,74%.

Os teores de flavonoides ficaram na faixa de 7,5 – 22,4 mg EE/g de torta. A análise estatística mostrou que apenas a razão sólidos/solvente e a interação da temperatura com a concentração de etanol foram significativas. O modelo apresentou um coeficiente de determinação de 0,9257 e um erro médio de 7,24%.

Os extratos fenólicos da torta de girassol apresentaram uma variação de atividade antioxidante de 55,3 – 155,0 mM TE/g. De acordo com a análise estatística realizada, apenas a temperatura e a razão sólidos/solvente foram significativos. O modelo apresentou um coeficiente de determinação de 0,7759 e um erro médio de 9,99%.

Como sugestões de trabalhos futuros propõe-se uma comparação entre duas extrações utilizando a condição ótima de temperatura e razão sólidos/solvente; empregando a água e etanol 20% com o objetivo de determinar se existe um aumento significativo na extração de compostos fenólicos quando o etanol é empregado, justificando o uso desse solvente.

Sugere-se também uma cinética de extração na condição ótima de temperatura, razão sólidos/solvente e concentração de etanol com o intuito de obter o melhor tempo de extração dos compostos fenólicos nessas condições.

Finalmente, outra análise que pode ser feita é a utilização de outras tecnologias de extração assistida (ultrassom e aquecimento ôhmico) empregando a condição ótima de temperatura, razão sólidos/solvente e concentração de etanol com o objetivo de aumentar ainda mais a extração.

6 Referências

ABASTECIMENTO, C. N. D. **Acompanhamento da safra brasileira: décimo segundo levantamento**. Brasília: Conab Setembro, 2009.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP: Consultoria & Comércio: 497 p. 2009.

AOAC, A. O. O. C. **Official method of analysis of aoac**. Allentown, Washington D. C. 1990.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, // 2006. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605006242> >.

BOCCO, A. et al. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2123-2129, 1998/06/01 1998. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf9709562> >. Acesso em: 2012/12/21.

BORGES, G. D. S. C. et al. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 708-715, 4// 2011. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910004953> >.

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, 2002/10/01 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf025614x> >. Acesso em: 2012/12/22.

_____. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 4, p. 379-389, 10// 2003. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877402004971> >.

CASTRO, C. D. et al. **A cultura do girassol**. Londrina: EMBRAPA - CNPSO, 1997.

CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 509-512, 12// 2001. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814601002345> >.

DE LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V.; DI ROCCO, A. Oxidative stabilization of cold-pressed sunflower oil using phenolic compounds of the same seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 6, p. 523-528, 2003. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1376> >.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 241-248, 6// 1998. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224498000454> >.

GAN, C.-Y.; LATIFF, A. A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1277-1283, 2/1/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610009271> >.

GÁMEZ-MEZA, N. **Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse.** . Journal of the American Oil Chemists Society: Chicago. 76: 1445-1447 p. 1999.

HAMINIUK, W. I. C. et al. **Phenolic compounds in fruits – an overview:** Journal Food Science and Technology. 27: 2023-2044 p. 2012.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 193-202, 9// 2005. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604005497> >.

KAMMERER, D. R. et al. **Colour stability of canned strawberries using black carrot and elderberry juice concentrates as natural colourants.:** European Food Research & Technology. 224: 667-679 p. 2007.

KUBICKA, E.; JEDRYCHOWSKI, L.; AMAROWICZ, R. **Effect of phenolic compounds extracted from sunflower seeds on native lipoxygenase activity.:** Grasas y Aceites. 50: 127-130 p. 1999.

KUROSUMI, A. et al. Novel extraction method of antioxidant compounds from *Sasa palmata* (Bean) Nakai using steam explosion. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1449-

1453, 10// 2007. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511307001626> >.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47-56, 11// 2005. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604006910> >.

LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030993973&partnerID=40&md5=e8588556d347cb064f629db39fefbd96> >.

LU, Y.; YEAP FOO, L. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 1-8, 1999. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0344075992&partnerID=40&md5=627fa4411694cb990cfba0ef3c27947b> >.

LUGASI, A. et al. **Antioxidant properties of a mixture of Lamiaceae plants intended to use as a food additive.** : Acta Alimentaria. 35 2006.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 245-248, 3// 1997. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814696002233> >.

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, 2002/06/01 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf011440s> >. Acesso em: 2012/12/21.

MEIRELES, M. A. A. **Extracting bioactive compounds for food products.** CRC Press, 2009.

MIKOLAJCZAK, K. L.; SMITH, J. 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, 1970/01/01 1970. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf60167a026> >. Acesso em: 2012/12/21.

MILIC, B.; STOJANOVIC, S.; M, V. N. T. **Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal.**: Journal of the Science of Food and Agriculture. 19: 108-112 p. 1968.

MOHSEN, S. M.; AMMAR, A. S. M. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 595-598, 2/1/ 2009. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608007097> >.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2// 2001. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600002235> >.

MUKHOPADHYAY, S., LUTHRIA, D. L. E ROBBINS, R. J. **Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (cimicifuga racemosa) by pressurized liquid extraction.**: Journal of the Science of Food and Agriculture. 86: 156-162 p. 2006.

MURGA, R. et al. **Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol.** . Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 3408-3412 p. 2000.

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, 8/28/ 2006. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506003062> >.

NAKATANI, N. et al. **Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune**

(Prunus domestica L). Journal of the Science of Food and Agriculture. 48: 5512-5516 p. 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Ed. Unicamp, 1995. 299.

OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V. **Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa.** Londrina: Embrapa-CNpSo 2004.

PORTAS, A. A. **O girassol na alimentação animal.** Campinas: CATI/D SM 2001.

PORTER, W. L. et al. **Modification of Maillard browning in a microwaved glucose/glycine model system by water soluble natural antioxidants and foods containing them.** . Journal of the American Oil Chemists Society. 83: 697-705 p. 2006.

PRASAD, K. N. et al. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1121-1127, 10/15/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611005061> >.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 2000-2009, 7// 2007. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406003981> >.

RAMARATHNAM, N. et al. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 316-319, 1989/03/01 1989. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf00086a009> >. Acesso em: 2012/12/21.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 5// 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153> >.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; 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, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402000122> >.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Florida: Boca Raton 2004.

SHAHIDI, F. et al. Insensitivity of the amino acids of canola and rapeseed to methanol-ammonia extraction and commercial processing. **Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 283-285, // 1992. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814692900513> >.

SHEABAR, F. Z.; NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 6, p. 990-993, 1988. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-51249177053&partnerID=40&md5=1c2d0d20b55c892e26839667eb21a323> >.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, n. 3, p. 381-387, 7/1/ 2007. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586607000512> >.

SUBRAMANIAN, R.; SHAMANTHAKA SASTRY, M. C.; VENKATESHMURTHY, K. Impact dehulling of sunflower seeds: Effect of operating conditions and seed characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 12, n. 2, p. 83-94, // 1990. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026087749090021Y> >.

SUN, T.; HO, C.-T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 743-749, 5// 2005. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604003905> >.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T. Antioxidant Constituents of Almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] Hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 496-501, 2003/01/01 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf020660i> >. Acesso em: 2012/12/21.

TSUZUKI, M. **Effect of salinity on survival, growth, and oxygen consumption of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis***. PÉREZ-FARFANTE. New York: J. Shellfish Res. 22: 555-559 p. 2003.

USDA, N. D. F. S. R. **Research Service**. U.S: Department of Agriculture 2009.

WATANABE, M.; OHSHITA, Y.; TSUSHIDA, T. Antioxidant Compounds from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) Hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1039-1044, 1997/04/01 1997. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf9605557> >. Acesso em: 2012/12/21.

WATERHOUSE, A. L. **Determination of total phenolics**. Current protocols in food analytical chemistry. WROLSTAD, R. E. New York. Supplement 6: 1-8 p. 2002.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 758-765, 7/15/ 2009. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608015367> >.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. **Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals**. : Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 1801–1812 p. 1999.

YANG, J.; LIU, R. H.; HALIM, L. **Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds**. : *LWT - Food Science and Technology*. 42: 1-8 p. 2009.

ZHAO, J. et al. Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7453-7475, 10/21/ 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311008533> >.