

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Extração de compostos fenólicos das tortas de canola e girassol e avaliação da aplicação *in vitro* do extrato obtido

-Tese de Doutorado-

Ivanor Zardo

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Extração de compostos fenólicos das tortas de canola e girassol
e avaliação da aplicação *in vitro* do extrato obtido

Ivanor Zardo

Tese de Doutorado apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e
Operações Unitárias

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Prof.^a Dr.^a Julia Sarkis

Porto Alegre

2018

Agradecimentos

Aos meus orientadores Prof.^a Dr.^a Lúgia Damasceno Ferreira Marczack e Prof.^a Dr.^a Julia Sarkis pelo acompanhamento e motivação durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos.

Aos bolsistas e alunos de graduação pelo auxílio na execução dos experimentos.

A todos os professores que me impulsionaram na vida acadêmica e ao Departamento de Engenharia Química pela utilização da estrutura física dos laboratórios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS, ao CNPq, a FAPERGS e a Capes pelo suporte contínuo.

Aos colegas de Pós-Graduação pela convivência e amizade durante todo o curso.

A toda minha família, em especial aos meus pais Hylario e Celita, pelos valores a mim passados desde criança, pelo apoio e incentivo em minhas escolhas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Extração de compostos fenólicos das tortas de canola e girassol e avaliação da aplicação in vitro do extrato obtido*, elaborada por Ivanor Zardo, como requisito parcial para obter título de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Helen Treichel

Prof^a. Dr^a. Simone Hickmann Flores

Pesquisadora Dr^a. Patrícia Benelli

Resumo

As tortas de semente de girassol e canola são subprodutos da extração de óleo que podem ser reaproveitadas como fonte proteica para alimentação animal. Essas tortas possuem quantidades consideráveis de compostos fenólicos, os quais podem afetar significativamente a qualidade de suas proteínas, reduzindo o seu valor nutricional e alterando suas propriedades organolépticas. A aplicação de uma técnica eficaz de remoção e separação desses compostos fenólicos é de grande importância para valorização desses subprodutos. Este trabalho tem como objetivo maximizar a extração de compostos fenólicos através da otimização de diferentes parâmetros de extração, utilizando a metodologia de planejamento de experimentos, identificar e quantificar os compostos presentes e avaliar a aplicação *in vitro* do extrato fenólico obtido. A extração assistida por ultrassom foi investigada como auxiliar de extração dos compostos fenólicos totais, visando aumentar o rendimento e diminuir o tempo e a temperatura de extração. Para a extração dos compostos fenólicos da torta de girassol foram avaliadas a temperatura, a concentração de etanol e a potência de ultrassom; para a torta de canola, por sua vez, avaliou-se a temperatura, a concentração de etanol e a razão sólido/solvente. Os extratos obtidos após a extração foram analisados quanto à concentração de compostos fenólicos totais; para o extrato da torta de girassol, analisou-se a concentração de ácido clorogênico e para o extrato da torta de canola analisou-se seu perfil qualitativo e quantitativo. Para as duas tortas, a concentração de solvente e a temperatura foram os fatores que mais afetaram a extração dos compostos fenólicos totais. A utilização do ultrassom na torta de girassol apresentou um efeito menor, porém significativo ($p < 0,05$), contribuindo para a diminuição do tempo e da temperatura de extração do processo. O extrato de girassol foi testado quanto à capacidade de prevenir a oxidação lipídica em óleo de soja e de inibir a germinação e o crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *A. flavus*. O extrato fenólico obtido da torta de semente de girassol demonstrou ser eficiente para as duas aplicações, tanto reduzindo a oxidação lipídica em óleos, como inibindo a germinação dos esporos de ambos os fungos testados. Com os resultados deste estudo, pode-se constatar que os compostos fenólicos são facilmente extraíveis de ambas as tortas, resultando em um concentrado proteico com maior valor nutricional e de mercado e em um extrato rico em compostos antioxidantes que podem ser utilizados como fonte de antioxidantes e antifúngicos naturais.

Palavra-chave: Otimização, superfície de resposta, resíduos, valor nutricional, poder antioxidante e antifúngico.

Abstract

Sunflower and canola seed cakes are byproducts of the oil extraction industry that can be reused as a protein source for animal feed. These cakes contain considerable amounts of phenolic compounds, which can significantly affect the quality of proteins, reducing their nutritional value and altering their organoleptic properties. The application of an efficient technique of removal and separation of these phenolic compounds is important for the valorization of these byproducts. This work aims to maximize the phenolic compounds extraction through the optimization of the different extraction parameters using the experimental design methodology, to identify and quantify the present compounds and to evaluate the *in vitro* application of the phenolic extract obtained. Ultrasound-assisted extraction was investigated as a pre-treatment in order to increase yield and decrease extraction time and temperature. For the sunflower seed cake phenolic compounds extraction, temperature, ethanol concentration and ultrasound power were evaluated. For the canola seed cake, temperature, ethanol concentration and solid/solvent ratio were evaluated. The extracts obtained were analyzed in terms of total phenolic content; for sunflower seed cake extract, the chlorogenic acid concentration was analyzed and for the canola seed cake extract its qualitative and quantitative profile was analyzed. For the two cakes, the solvent concentration and the temperature were the factors that most affected the total phenolic compounds extraction. The use of ultrasound in the sunflower seed cake presented a smaller but significant effect ($p < 0,05$), contributing to the extraction time and temperature decrease of the process. Sunflower extract was tested for its ability to prevent lipid oxidation in soybean oil and to inhibit the germination and growth of fungi *Aspergillus niger* and *A. flavus*. The phenolic extract obtained from the sunflower seed cake proved to be efficient for both applications, reducing the lipid oxidation in oils and inhibiting the germination of the spores of both fungi tested. The results of this study demonstrate that the phenolic compounds are easily extractable from both cakes, resulting in a protein concentrate with higher nutritional and commercial value, and in an extract rich in antioxidant compounds with possible use as source of natural antioxidants and antifungals.

Keywords: Optimization, response surface, residues, nutritional value, antioxidant and antifungal power.

Lista de Figuras

Figura 2.1 Planta e semente da canola	8
Figura 2.2 Planta e semente de girassol.	8
Figura 2.3 Estrutura básica dos a) flavonoides; b) ácidos hidroxibenzoicos e c) ácidos hidroxicinâmicos.	15
Figura 2.4 Principais compostos fenólicos presentes na semente de girassol.	18
Figura 2.6 Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes na canola.	20
Figura 2.7 Espectro de separação dos compostos fenólicos presentes no extrato de canola obtido por HPLC-DAD: (1) sinapol, (2) sinapina, (3) ácido sinápico, (4, 5 e 6) derivados do ácido sinápico não identificados.....	21
Figura 2.8 Formação e colapso das bolhas provocados pelas ondas ultrassônicas.	27
Figura 2.9 Configurações de aparelhos ultrasônicos: (a, b) banhos de ultrassom indireto, (c) sonda, (d) banho de ultrassom direto em fluxo contínuo.....	29
Figura 2.10 Fluxograma do processo de extração de óleo de sementes oleaginosa adicionado da etapa de extração de compostos fenólicos.....	31
Figura 2.11 Estrutura molecular dos triglicerídeos (a) formato diapasão (b) formato cadeira; R', R'', R''' – cadeias saturadas ou insaturadas	32
Figura 2.12 Alterações físico-químicas em óleos submetidos a elevadas temperaturas.	34
Figura 2.13 Rearranjo para formar dienos conjugados	38
Figura 3.1 Tortas de canola e girassol utilizadas neste trabalho. Fonte: Autor.	40
Figura 3.2 Aparato experimental para extração de compostos fenólicos da torta de semente de girassol e canola.	43
Figure 4.1 HPLC chromatogram of the sunflower seed cake extract obtained at 30 °C, without ultrasound application and after 10 min of extraction time, monitored at 325 nm.....	60
Figure 4.2 Total phenolic compounds (TPC) extraction under different conditions: preliminary results.....	61
Figure 4.3 TPC (A) and CGA (B) concentration analysis of the average results of the central points and of the results of the axial points as a function of extraction time.	64

Figure 4.4 Response surface plots of the total phenolic contents of sunflower seed cake extract as affected by ethanol concentration (EtOH), temperature and ultrasound amplitude (UA). (A) EtOH and temperature (UA 40 μ m); (B) EtOH and UA (temperature 45 $^{\circ}$ C); (C) temperature and UA (EtOH 43 %).	65
Figure 4.5 Response surface plots of the Chlorogenic Acid concentration of sunflower cake extract as affected by ethanol concentration (EtOH), temperature and ultrasound amplitude (UA). (A) EtOH and temperature (UA 40 μ m); (B) EtOH and UA (temperature 45 $^{\circ}$ C); (C) temperature and UA (EtOH 43 %).	66
Figure 4.6 Sunflower seed cake protein content under different extraction conditions.	69
Figure 4.7 Chromatogram of phenolic compounds from canola seed cake obtained by HPLC-DAD at 325 nm. Compound identification is detailed in Table 4.5.	77
Figure 4.8 Kinetics of the total phenolic compounds (TPC) extracted from canola seed cake at different temperatures with and without ultrasound.	84
Figure 4.9 Response surface of the TPC extracted from the canola seed cake after 3 min: (A) EtOH and Temperature (Ratio 12.5); (B) EtOH and Ratio (Temperature 45 $^{\circ}$ C); (C) Temperature and Ratio (EtOH 43 %).	86
Figure 4.10 Response surface of the TPC extracted from the canola seed cake after 12 min: (A) EtOH and Temperature (Ratio 12.5); (B) EtOH and Ratio (Temperature 45 $^{\circ}$ C); (C) Temperature and Ratio (EtOH 43 %).	87
Figure 4.11 Concentration of the different phenolic compounds groups after each consecutive extractions using the same solvent on new samples of canola seed cake.	89
Supplementary Figure A1. UV spectra of the main phenolic compounds groups identified in canola seed cake. Legend: (A): <i>trans</i> -sinapic acid; (B): sinapic acid glycosilated derivatives (disinapoylgentibiose); (C): kaempferol derivatives (kaempferol-3- <i>O</i> -sinapoylsophoroside-7- <i>O</i> -glucoside); (D): sinapoyl choline derivatives (sinapine); (E): cyclyc spermidine conjugate.	90
Figure 4.12 Accelerated storage test: A) Peroxide value, B) p-anisidine value, C) Conjugated dienes, and D) Conjugated trienes, measured in soybean oil during storage time at 65 $^{\circ}$ C.	96
Figure 4.13 Thermo-oxidation test results: A) Peroxide value, B) p-anisidine value, C) Conjugated dienes, and D) Conjugated trienes measured in oil during storage time at 180 $^{\circ}$ C.	98
Figure 4.14 Sunflower extract effect on spore germination of <i>Aspergillus niger</i> (A) and <i>A. flavus</i> (B) after 36 hours of incubation in YES broth at 25 $^{\circ}$ C and TPC concentration of 15 μ g/ μ L. Images	

on the right side correspond to the inoculated samples without the extract (control). Observation under optical microscope (increase of 40X)..... 99

Figura 4.14 Teste de estabilidade do óleo de soja em temperatura ambiente: A) Índice de peróxidos, B) Índice de p-anisidina, C) Dienos conjugados, e D) Trienos conjugados medidos durante estocagem a 25 °C. 101

Figura 4.15 Avaliação do crescimento do fungo *Aspergillus niger* durante 6 dias de cultivo a 25 °C em meio BDA na presença das diferentes concentrações de compostos fenólicos totais (5 e 25 mg/mL)..... 103

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Teor percentual médio de ácidos graxos presentes nos diferentes óleos vegetais.	12
Tabela 2.2. Composição percentual média de algumas tortas de diferentes oleaginosas.	14
Tabela 2.3 Solventes usados para extração de diferentes compostos bioativos.	24
Tabela 3.1. Valores codificados e originais das variáveis de estudo, concentração de etanol, temperatura e amplitude de ultrassom.	45
Tabela 3.2 Valores codificados e originais das variáveis de estudo, concentração de etanol, temperatura e ratio.	49
Table 4.1 Variables and their coded of the experimental design.	58
Table 4.2 Experimental Design (uncoded) arrangement for extraction and the responses of Total Phenolic Compounds (TPC) and Chlorogenic Acid (CGA) after extraction times of 1,3, 15 min	62
Table 4.3 Estimated coded coefficients of the fitted second order polynomial model of the Total Phenolic Compounds (TPC) and Chlorogenic Acid (CGA) results obtained after 1 min of extraction time.	63
Table 4.4 Coded and natural values of the experimental design.	75
Table 4.5 Chromatographic and spectroscopic characteristics and phenolic compounds content of canola seed cake, obtained by HPLC-DAD-MS/MS.	78
Table 4.6 Experimental design factors used in canola seed cake extraction and the total phenolic compounds content after 3 and 12 minutes of extraction.	85
Table 4.7 Estimated coded coefficients adjusted to the second-order polynomial model and the p-values for 3 and 12 min.	86

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
2.1 VALORIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS	4
2.2 HISTÓRICO DA CANOLA E DO GIRASSOL	6
2.2.1 <i>Classificação botânica e morfologia da planta</i>	7
2.2.2 <i>Cultivo no mundo e no Brasil</i>	9
2.2.3 <i>Composição e valor nutricional das sementes</i>	10
2.2.4 <i>Produtos derivados das sementes</i>	11
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	15
2.3.1 <i>Análise dos compostos fenólicos</i>	16
2.3.2 <i>Atividade antioxidante</i>	17
2.3.3 <i>Compostos fenólicos presentes no girassol</i>	18
2.3.4 <i>Compostos fenólicos presentes na canola</i>	19
2.4 PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E ANTINUTRICIONAIS DAS TORTAS DE CANOLA E GIRASSOL	21
2.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	23
2.5.1 <i>Extração sólido-líquido convencional</i>	23
2.5.2 <i>Processos alternativos de extração</i>	26
2.6 LIPÍDEOS	31
2.6.1 <i>Oxidações lipídicas</i>	32
2.6.2 <i>Estabilização lipídica</i>	35
2.6.3 <i>Avaliação do grau de oxidação lipídica</i>	36
2.7 AÇÃO ANTIMICROBIANA	39
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 PREPARO DA AMOSTRA DAS TORTAS PARA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .	40
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS TORTAS	41
3.2.1 <i>Teor de umidade e substâncias voláteis</i>	41
3.2.2 <i>Teor de óleo</i>	41
3.2.3 <i>Teor de proteína bruta</i>	42
3.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (EAU) DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	43

3.4	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO GIRASSOL	44
3.4.1	<i>Experimentos preliminares</i>	44
3.4.2	<i>Extração exaustiva</i>	44
3.4.3	<i>Planejamento experimental e análise estatística</i>	44
3.4.4	<i>Determinação dos compostos fenólicos totais</i>	46
3.5	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA CANOLA.....	47
3.5.1	<i>Preparação da amostra</i>	47
3.5.2	<i>Extração de compostos fenólicos</i>	47
3.5.3	<i>Determinação dos compostos fenólicos totais</i>	48
3.5.4	<i>Análise qualitativa e quantitativa do extrato fenólico da canola</i>	48
3.5.5	<i>Planejamento experimental e análise estatística</i>	48
3.6	APLICAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO COMO ANTIOXIDANTE EM ÓLEO VEGETAL ...	49
3.6.1	<i>Obtenção do extrato fenólico</i>	50
3.6.2	<i>Teste de estocagem acelerada</i>	50
3.6.3	<i>Teste de termoxidação</i>	50
3.6.4	<i>Estocagem em temperatura ambiente</i>	51
3.6.5	<i>Índice de peróxidos</i>	51
3.6.6	<i>Índice de p-anisidina</i>	51
3.6.7	<i>Índice de dienos e trienos conjugados</i>	52
3.7	APLICAÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO COMO ANTIFÚNGICO	52
3.7.1	<i>Obtenção do extrato fenólico</i>	52
3.7.2	<i>Capacidade inibidora de germinação de esporos fúngicos</i>	52
3.7.3	<i>Efeito do extrato fenólico sobre o crescimento micelial do fungo Aspergillus niger</i>	53
	CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	ARTIGO 1 - OPTIMIZATION OF ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM SUNFLOWER SEED CAKE USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY	54
4.1.1	<i>Introduction</i>	55
4.1.2	<i>Material and methods</i>	56
4.1.3	<i>Results and discussion</i>	60
4.1.4	<i>Conclusion</i>	69
4.2	ARTIGO 2 - EXTRACTION OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM CANOLA SEED CAKE AND THEIR IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRY	71

4.2.1	<i>Introduction</i>	71
4.2.2	<i>Material and methods</i>	73
4.2.3	<i>Results and discussion</i>	76
4.2.4	<i>Conclusion</i>	89
4.3	ARTIGO 3 – APPLICATION OF SUNFLOWER (<i>HELIANTHUS ANNUUS</i>) SEED CAKE EXTRACT AS ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL	91
4.3.1	<i>Introduction</i>	91
4.3.2	<i>Material and methods</i>	93
4.3.3	<i>Results and discussion</i>	95
4.3.4	<i>Conclusion</i>	100
4.4	RESULTADOS ADICIONAIS	101
4.4.1	<i>Teste de estabilidade do óleo de soja em temperatura ambiente</i>	101
4.4.2	<i>Avaliação do efeito do extrato fenólico de torta de girassol sobre crescimento micelial dos fungos Aspergillus niger</i>	103
	CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	107
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

Capítulo 1. Introdução

O reaproveitamento de resíduos da agroindústria tem recebido atenção redobrada nos últimos anos por conta da escassez cada vez maior de recursos naturais e pela necessidade de proteção do meio ambiente (Boussetta *et al.*, 2014). O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, conseqüentemente é um grande produtor de resíduos agroindustriais. Desta forma, o aproveitamento destes subprodutos assume um papel economicamente importante, devido ao grande volume disponível e à versatilidade de sua utilização.

Sementes de oleaginosas e suas tortas (subprodutos resultantes da extração de óleo por prensagem) possuem um grande potencial de utilização na alimentação de ruminantes em função de seu alto valor nutricional. Porém, cada cultura tem suas particularidades no que diz respeito a cuidados antes de serem fornecidas aos animais, devido à presença de alguns componentes considerados tóxicos ou antinutricionais. Em sua composição, as tortas de canola e girassol possuem quantidades consideráveis de compostos fenólicos, os quais são responsáveis pela redução da digestibilidade proteica e alteração das propriedades organolépticas e funcionais do farelo oferecido em dietas para animais.

Por outro lado, diversos estudos mostram que compostos fenólicos presentes em sementes de oleaginosas como tocoferóis, carotenoides, flavonoides, lignanas, ligninas, ácidos fenólicos e taninos apresentam elevada atividade antioxidante, estando associados à prevenção de doenças causadas pelo estresse oxidativo. Ainda, a obtenção de compostos fenólicos naturais, extraídos de subprodutos do processamento de alimentos, está sendo sugerida como uma alternativa sustentável aos antioxidantes sintéticos. Adicionados aos alimentos, os compostos fenólicos podem prevenir a oxidação lipídica e controlar o escurecimento enzimático. Além da indústria alimentícia, esses compostos ainda apresentam potencial aplicação na indústria farmacêutica e de cosméticos. Dentre as funções desempenhadas pelos compostos fenólicos sintetizados pelas plantas destaca-se sua própria proteção contra o ataque de agentes patogênicos, sendo foco, recentemente, de um grande número de estudos envolvendo sua ação antimicrobiana.

De forma a produzir um concentrado proteico mais nutritivo para formulação de rações para alimentação animal e com conseqüente maior valor de mercado, assim como obter um extrato rico em compostos fenólicos, é de grande importância o desenvolvimento de uma metodologia eficaz de remoção e separação desses compostos das tortas. As técnicas tradicionais de extração normalmente requerem tempos longos, altas temperaturas e quantidades elevadas de solvente, o que torna o processo dispendioso, além de provocar uma possível degradação térmica dos compostos fitoquímicos. Buscando melhorar a eficiência do processo de extração, tecnologias alternativas

estão sendo utilizadas como substitutas ou auxiliares dos métodos convencionais de extração. O uso dessas tecnologias pode diminuir o uso de solventes orgânicos e, também, o tempo e a temperatura de extração e, nesse contexto, diminuir custos e aumentar a eficiência do processo de extração. Dentre essas tecnologias, este trabalho propõe avaliar a aplicação da extração assistida por ultrassom. Essa tecnologia está sendo amplamente utilizada como auxiliar de extração de compostos vegetais intracelulares, apresentando resultados bastante satisfatórios na extração de compostos fenólicos de materiais vegetais.

Como objetivos desse estudo têm-se:

- buscar a máxima extração dos compostos fenólicos das tortas de canola e girassol, avaliando as técnicas de extração convencional e assistida por ultrassom. Para tal, foram analisados diferentes parâmetros de processo como tempo de extração, temperatura, razão sólido/solvente e solvente utilizado, e condições relacionadas à aplicação do ultrassom como potência aplicada e tempo de pré-tratamento;
- testar a aplicação *in vitro* do extrato fenólico da torta de semente de girassol como alternativa natural aos produtos sintéticos para as finalidades de estabilização oxidativa do óleo de soja e de inibição do crescimento de fungos.

O presente trabalho está estruturado da forma descrita a seguir. No Capítulo 2 está apresentada uma revisão sobre a importância ambiental e econômica do reaproveitamento dos resíduos provenientes da indústria de alimentos, em especial dos subprodutos oriundos do processamento das sementes de canola e girassol para extração de óleos. Para uma maior contextualização deste estudo, neste capítulo serão descritas as culturas da canola e girassol no que diz respeito às suas origens, classificação botânica, cultivo no Brasil e no mundo, produtos e subprodutos do seu processamento, bem como suas destinações e aspectos relacionados ao valor nutricional dos óleos e das tortas dessas oleaginosas. Serão descritos também, mais profundamente, os compostos fenólicos presentes em cada cultura, bem como seus efeitos antioxidantes ou antinutricionais, dependendo de sua aplicação. Serão expostas também as técnicas convencional e assistida por ultrassom de extração dos compostos fenólicos das tortas de canola e girassol e os fatores que influenciam o rendimento da extração. Por fim, a aplicação *in vitro* do extrato fenólico como antioxidante em óleos e como agente antimicrobiano serão descritos através de uma breve revisão sobre a composição dos lipídeos, fatores que influenciam a oxidação e estabilização lipídica, bem como seus métodos de medição e a capacidade e mecanismo de ação antimicrobiana dos compostos fenólicos.

O Capítulo 3 apresenta os materiais e métodos utilizados para realização deste trabalho, onde são descritos os métodos de análise e a metodologia experimental adotada. No Capítulo 4 estão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho, sendo este capítulo dividido em três artigos: o primeiro apresenta os dados obtidos para a extração dos compostos fenólicos da torta de semente de girassol, o segundo os dados obtidos para a extração e identificação dos compostos fenólicos da torta de semente de canola e o terceiro os resultados referentes aos testes de aplicação dos compostos fenólicos da torta de girassol. Finalmente, no Capítulo 5, estão apresentadas as conclusões referentes aos resultados obtidos e as sugestões de trabalhos futuros.

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos

Neste capítulo serão apresentadas a revisão bibliográfica e a fundamentação teórica necessária para uma maior compreensão dos objetivos deste trabalho. Nos diferentes tópicos estarão descritas: a importância do reaproveitamento de resíduos da indústria alimentícia sob o ponto de vista econômico, nutricional e ambiental; as culturas estudadas (girassol e canola) contendo desde sua origem, classificação botânica, cultivo e utilização dos produtos e subprodutos do seu processamento; os compostos fenólicos presentes em cada cultura, bem como seus efeitos antioxidantes e antinutricionais, dependendo de sua aplicação; as técnicas convencional e assistida por ultrassom de extração dos compostos fenólicos das tortas de canola e girassol e os fatores que influenciam o rendimento da extração. Para melhor compreender a aplicação *in vitro* do extrato fenólico como antioxidante em óleos serão descritos mais detalhadamente a composição química dos lipídeos, o mecanismo das reações de oxidação lipídica, a utilização de antioxidantes naturais e sintéticos para estabilização lipídica e os diferentes métodos de avaliação do grau de oxidação lipídica. Por fim, serão descritas, brevemente, as propriedades e a capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos.

2.1 Valorização dos subprodutos da indústria de extração de óleos

Cada vez mais os conceitos de ecologia industrial, tais como “cradle to cradle” (berço ao berço) e economia circular, são considerados o princípio de base para aecoinovação, com o objetivo de “economia do desperdício zero” na qual os resíduos são utilizados como matéria-prima para novos produtos e aplicações (Mirabella *et al.*, 2014). A grande quantidade de resíduos produzidos pela indústria de alimentos, além de apresentarem uma grande perda de compostos valiosos, também remete a sérios problemas de gestão, tanto do ponto de vista econômico como ambiental. Muitos destes resíduos, no entanto, têm o potencial para serem reutilizados em outros sistemas de produção, sendo cada vez mais reconhecidos e valorizados como matéria-prima para produção de novos produtos (Antolovich *et al.*, 2000; Mirabella *et al.*, 2014).

O aproveitamento racional dos subprodutos agroindustriais para alimentação animal tem se mostrado uma alternativa de grande valia na redução dos custos da alimentação e manutenção dos níveis de produção de carne e leite (Abdalla *et al.*, 2008). Além do elevado teor de proteínas presente nas tortas oriundas da produção de óleo vegetal, a introdução de tortas com elevado teor de gordura nas dietas de ruminantes pode auxiliar na mitigação de metano entérico, o que contribui para redução da emissão de gases do efeito estufa (Grainger, 2008). Desta forma, a utilização de subprodutos da agroindústria em dietas de bovinos, tem importância sob o ponto de vista econômico, nutricional e ambiental.

Resíduos agrícolas e industriais do processamento de frutas, vegetais, nozes, sementes e ervas são importantes fontes naturais de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos (Moure *et al.*, 2001; Balasundram *et al.*, 2006). O grande interesse por substituir antioxidantes alimentares sintéticos por naturais tem intensificado os estudos sobre o reaproveitamento de resíduos do processamento de alimentos para obtenção de compostos fenólicos. Devido à sua importante atividade fisiológica, além da indústria de alimentos, os compostos antioxidantes naturais têm conquistado a atenção da indústria de cosméticos e de fármacos (Antolovich *et al.*, 2000).

Moure *et al.* (2001) publicaram um estudo de revisão abordando a extração de compostos antioxidantes (principalmente polifenóis) de resíduos industriais e agrícolas. Neste estudo encontra-se uma descrição bastante completa dos compostos antioxidantes presentes em diversos vegetais, bem como os fatores que influenciam a atividade antioxidante e estabilidade desses compostos.

Diversos estudos foram realizados sobre o reaproveitamento de resíduos da indústria alimentícia como fonte de compostos fenólicos com função antioxidante, sendo que, entre esses resíduos, pode-se citar: sementes e bagaço de uva (Fontana *et al.*, 2013; Krishnaswamy *et al.*, 2013; González-Centeno *et al.*, 2014), casca de batata (Amado *et al.*, 2014), folhas de oliveira (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013), bagaço de carambola (Saikia *et al.*, 2015), bagaço de maçã (Reis *et al.*, 2012), tortas de oleaginosas (Sarkis, Júlia R. *et al.*, 2014; Teh e Birch, 2014; Sarkis *et al.*, 2015), entre outros. O conteúdo de compostos fenólicos nas cascas das frutas são geralmente superiores aos encontrados nas frutas descascadas. Gorinstein *et al.* (2001) verificaram que o teor de compostos fenólicos totais presentes nas cascas de limões, laranjas e toranjas foram 15 % superiores que nos frutos descascados.

Uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos são os subprodutos da produção de vinhos e sucos, os quais são normalmente destinados à alimentação animal ou compostagem (Lee e Wrolstad, 2004; Lapornik *et al.*, 2005; Sacchi *et al.*, 2005). Ao extrair compostos fenólicos do bagaço de uvas gerado no processo de produção de vinhos, Negro *et al.* (2003) concluíram que é possível se obter substâncias fenólicas com atividade antioxidante comparada ao antioxidante sintético butil-hidroxi-tolueno (BHT).

Atualmente, a grande motivação para a produção de óleo de girassol e canola no país é para produção de biodiesel. O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), através da criação da lei nº 11.097/2005, determinava a adição obrigatória de 5 % de biodiesel ao óleo diesel consumido no Brasil a partir de 2013. A mais recente Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, estabelece que em até 12, 24 e 36 meses após a promulgação desta lei fossem adicionados, respectivamente, 8, 9 e 10 % de biodiesel ao óleo diesel, podendo chegar a 15% após este período. Em função desta lei que obriga a adição de biodiesel na matriz energética nacional, surgiu uma excelente oportunidade para as culturas do girassol e da canola como fornecedores dessa matéria-prima, apresentando viabilidade técnico-ambiental na produção de biocombustíveis.

Além dos fatores relacionados ao manejo do solo, que contribuem para o cultivo das culturas de verão (soja, milho, sorgo, etc.), tanto a canola como o girassol possuem um balanço energético positivo para produção de biodiesel. O balanço energético é o parâmetro mais adequado para definir a viabilidade técnica e a sustentabilidade de um programa de agroenergia. Este balanço estabelece uma relação entre o total de energia investida em todo o processo e a quantidade de energia contida no biocombustível e demais derivados de uma matéria-prima (Gazzoni *et al.*, 2009). O balanço energético da canola é de 1:2,9 (Gazzoni *et al.*, 2009), da soja de 1:3,38 (Felici *et al.*, 2006) e do girassol de 1:2,69 (Felici *et al.*, 2006). Isso significa que, para cada unidade de energia gasta para processamento da canola, da soja e do girassol, são gerados 2,9, 3,38 e 2,69 unidades de energia, respectivamente.

2.2 Histórico da canola e do girassol

A canola (*Brassica napus L.* var. oleífera) e o girassol (*Heliantus annus L.*) são oleaginosas pertencentes à família das crucíferas e das compostas, respectivamente. Essas culturas constituem excelentes opções de cultivo de inverno na região Sul, apresentando a possibilidade de rotação de culturas e contribuindo, com isso, para a redução de problemas fitossanitários de leguminosas como a soja e o feijão, e das gramíneas como o milho, trigo e outros cereais. Neste contexto, as culturas de canola e girassol podem reduzir o uso de produtos fitossanitários e aumentar a produtividade, a qualidade e a lucratividade da produção de grãos (Tomm e Leite, 2014).

A origem da canola está ligada ao cultivo das sementes oleaginosas conhecidas como sementes de colza. Civilizações antigas da Ásia e da Europa usavam o óleo de colza há cerca de 1500 anos, inicialmente, em suas lamparinas e, mais tarde, como óleo para cozinhar (Richter *et al.*, 2010). O grande progresso do cultivo da colza está profundamente ligado à indústria da construção naval durante a segunda Guerra Mundial como fonte de lubrificantes. O óleo de colza aderiu muito melhor nas superfícies metálicas banhadas por água ou vapor do que qualquer outro óleo vegetal (San José Alonso *et al.*, 2006).

O nome canola foi inicialmente registrado em 1979 pela *Western Canadian Oilseed Crushers Association*, sendo uma marca industrial registrada para **Canadian Oil Low Acid**. A canola foi desenvolvida a partir do melhoramento genético da colza realizado no Canadá para diminuir os fatores antinutricionais, pois os grãos apresentavam elevados teores de ácido erúico e de glucosinolatos. Em 1986, o nome canola tornou-se um termo genérico internacional, cuja descrição oficial é: “Semente do gênero *Brassica* (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ou *Brassica juncea*) que contém um óleo com menos de 2 % de ácido erúico do total de ácidos graxos e menos de 30 micromoles de glucosinolatos por grama de matéria seca desengordurada da semente” (Canola Council of Canada, 2016).

As pesquisas e o cultivo de *Brassica napus L.* no Brasil tiveram início em 1974 pela COTRIJUÍ, no noroeste do Rio Grande do Sul, com a cultura da colza, alcançando o Paraná na década de 1980.

Somente em 2001 ocorreu uma expansão da área de cultivo comercial de canola, sobretudo nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná (Tomm, 2007).

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma dicotiledônea anual e originária da América do Norte e Central. Evidências arqueológicas indicam o início do cultivo do girassol há aproximadamente 4.300 anos por povos indígenas americanos, que utilizavam a semente do girassol como fonte de alimento e para fins medicinais, assim como para enfeitar seus corpos em cerimoniais (Crites, 1993; Fernández-Martínez *et al.*, 2009). No século XVI, o girassol foi levado para a Europa e Ásia, onde foi cultivado como hortaliça e planta ornamental e passou a ser utilizado como cultura oleaginosa a partir do século XVIII, mais precisamente na Inglaterra (Mandarino, 1997; Dall'agnol *et al.*, 2005).

O cultivo do girassol no Brasil iniciou no século XIX, na região Sul, provavelmente trazida por colonizadores europeus que consumiam suas sementes torradas e fabricavam uma espécie de chá rico em cafeína. O seu cultivo comercial no Brasil data de 1902, em São Paulo, porém, somente no fim da década de 1970 é que seu cultivo foi incentivado em decorrência do Programa de Mobilização Energética do Governo Federal, que visava à substituição do petróleo pelos óleos vegetais. Tal iniciativa não prosperou e, somente a partir da década de 1990, seu cultivo tornou-se expressivo, principalmente na região Centro-Oeste do país (Dall'agnol *et al.*, 2005; Lira *et al.*, 2011; Gazzola *et al.*, 2012).

O nome “girassol” foi inspirado no movimento característico de girar sua inflorescência em direção ao sol (heliotropismo). Além de seu cultivo em larga escala para produção de grãos e óleos, o girassol (*Helianthus annuus L.*) é também utilizado na ornamentação de jardins e em arranjos para decoração. Possui a característica de se adaptar bem a diversas condições edafoclimáticas e ser relativamente tolerante à seca, podendo ser cultivada em todas as regiões produtoras de grãos do país e durante todo o ano, sendo seu rendimento pouco influenciado pela latitude e altitude, assim como pelo fotoperíodo (De Castro *et al.*, 1996; Zobiolo *et al.*, 2010).

Tanto a canola quanto o girassol adaptam-se bem à rotação e sucessão de cultivos, como da soja e do milho, e são consideradas ideais para a fabricação de óleo para consumo humano, produção de biodiesel e, ainda, para obtenção de farelo com alto valor proteico usado na formulação de ração animal. Com essas características positivas, tanto a canola como o girassol têm se tornado uma ótima opção econômica para o agricultor brasileiro (Leite *et al.*, 2005; Tomm, 2007).

2.2.1 Classificação botânica e morfologia da planta

A canola pertence à família das Brassicaceae, gênero *Brassica* (Fig. 2.1), sendo duas as espécies atualmente cultivadas: *Brassica napus L.* e *Brassica campestris L.*; é uma planta herbácea anual, com raiz pivotante e grande número de raízes secundárias fasciculadas. A haste é ereta, ascendente e ramificada, possuindo em sua extremidade numerosas flores de pétalas amarelas. Pode alcançar

altura superior a 1,5 m na espécie *Brassica napus L.* e até 1 m na espécie *Brassica campestris* (Tomm, 2007).

Figura 2.1 Planta e semente da canola



Os órgãos reprodutores são formados de um pistilo e quatro estames longos e dois curtos, sendo estes últimos estéreis. A planta produz flores com coloração que varia do amarelo pálido ao brilhante com diâmetro entre 11-15 mm, desenvolvendo vagens contendo uma única linha de sementes. Cada vagem pode conter de 20 a 40 pequenas sementes com formato esférico (1 a 2 mm de diâmetro) e coloração do marrom escuro ao preto (Tomm, 2007).

A semente da canola pode ser dividida em três componentes: casca da semente (pericarpo) e aleurone, endosperma e embrião. A casca apresenta grande quantidade de fibras e pouco óleo e representa de 12 a 16 % da massa total da semente. A camada de aleurona está logo abaixo da casca e é rica em proteínas. O endosperma se encontra em pequena quantidade recobrimdo o embrião. A maioria dos embriões consiste em dois cotilédones com 30 a 50 % de óleo (Edwards *et al.*, 2011). A canola trata-se de uma cultura anual, cujo ciclo vegetativo pode levar de 106 a 107 dias de cultivo desde o plantio até a maturação dos grãos, dependendo das características do híbrido (Maia *et al.*, 1999).

O girassol (*Helianthus annuus L.*) (Fig. 2.2) pertence à família das Compositae (Asteraceae). *Helianthus* é derivado das palavras gregas “helios” que significa sol, e “anthus” que significa flor. O gênero *Helianthus* possui 14 espécies annual e 38 perennial. A espécie *H. annuus* é a mais importante e mais largamente cultivada (Seiler *et al.*; Kaya *et al.*, 2012; Kaya, 2014).

Figura 2.2 Planta e semente de girassol.



A planta possui estatura que varia entre 108 e 144 cm de altura, sendo encontradas também espécies anãs de 40 cm. Caracterizam-se por serem plantas de caule grosso e robusto com coloração esverdeada, possuem folhas ovais, opostas, pecioladas, com nervuras visíveis e ásperas. O sistema de raízes é pivotante e pode atingir profundidades de 1,5 a 2,07 m, reciclando boa qualidade de nutrientes para as culturas sucessoras (Amorim *et al.*, 2008; Lira *et al.*, 2011).

O órgão da planta de maior interesse econômico é o fruto. O fruto do girassol, também chamado aquênio e popularmente considerado semente, é do tipo seco, constituído pelo pericarpo (casca) e pela semente propriamente dita (polpa ou amêndoa). Conforme o cultivar, o fruto é variável quanto ao tamanho, cor e teor de óleo. De acordo com sua utilização, as sementes de girassol são classificadas em oleosas e não oleosas. As sementes não oleosas são maiores, com casca grossa (40 a 45 % do peso das sementes) facilmente removível, possuem de 25 a 30 % de óleo e representam 5 % dos genótipos de girassol. As sementes não oleosas são torradas, embaladas para consumo humano ou como ração para pássaros (Carrão-Panizzi e Mandarino, 1994).

As sementes oleosas são menores com casca bem aderidas, representando de 20 a 30 % em peso da semente. As sementes oleosas são economicamente mais importantes e, a partir delas, são produzidos o farelo de girassol e seus derivados, após a extração do óleo (Carrão-Panizzi e Mandarino, 1994). O conteúdo de óleo nos aquênios das variedades mais comercializadas varia de 38 a 48 % (Mourad, 2006).

O desenvolvimento da planta ocorre em duas fases: fase vegetativa e fase reprodutiva. A primeira fase corresponde à etapa de germinação até o início da formação do broto floral e a segunda fase abrange as etapas de crescimento, floração, enchimento dos aquênios e maturação. A colheita do girassol deve ser realizada quando a umidade dos aquênios estiver entre 14 e 18 %, resultando num ciclo vegetativo de 100 e 120 dias para as variedades precoces e tardias, respectivamente (De Castro *et al.*, 1996).

2.2.2 Cultivo no mundo e no Brasil

A canola apresenta uma produção mundial superior a 70 milhões de toneladas, sendo a terceira oleaginosa em produção no mundo. O Canadá é o maior produtor mundial, com aproximadamente 15,5 milhões de toneladas, seguido da China, com 11,6 milhões de toneladas (Faostat, 2014).

O cultivo comercial de canola no mundo encontra-se em regiões de clima temperado com latitudes entre 35 e 55° pois é uma planta adaptada a regiões frias (Tomm, 2007). No Brasil, essas condições térmicas são encontradas na região Sul, sendo a espécie *Brassica napus L.* a principal espécie cultivada. No entanto, estudos relatam seu potencial cultivo em regiões de clima mais quente (Panozzo, 2012). Estima-se que o Brasil apresenta uma área plantada de 43,1 mil hectares com uma produção de 61,4 mil toneladas. Toda produção se encontra na região Sul com 12,4 mil toneladas sendo produzidas no Paraná e 49 mil toneladas no Rio Grande do Sul (dados da safra 2015/2016) (Conab, 2015). No Brasil, a canola ainda é pouco cultivada, porém, é uma cultura com

grande potencial de expansão do agronegócio brasileiro, por possuir grande valor sócio-econômico, possibilitando a produção de óleos vegetais no inverno e contribuindo para a otimização dos meios de produção (terra e equipamentos) (Tomm, 2007).

Atualmente, o cultivo de girassol abrange todos os continentes, resultando numa produção de 41,3 milhões de toneladas e destaca-se como a quarta oleaginosa em produção no mundo. Segundo dados de 2014 da FAO (Faostat, 2014), a Ucrânia é a maior produtora de girassol do mundo, com aproximadamente 10,1 milhões de toneladas, seguida da Rússia, com 9 milhões de toneladas. Na América do Sul, destaca-se a Argentina que produz 2 milhões de toneladas, e está na quinta colocação mundial, bem próxima do terceiro e quarto colocados.

O Brasil ainda é considerado um pequeno produtor de girassol, com uma área cultivada de 109,5 mil hectares, produção de 175 mil toneladas e produtividade de 1.598 kg/ha (dados da safra 2015/2016). A região Centro-Oeste é a maior produtora, com 151,7 mil toneladas, seguida da região Sudeste, com 21,2 mil toneladas e da região Sul, com 2,1 mil toneladas. O Rio Grande do Sul é responsável por toda a produção de girassol da região Sul (Conab, 2015).

Considerando que o girassol é uma cultura de segunda safra (ou safrinha) no Brasil, baseado nas produtividades alcançadas, estima-se que o país poderá vir a ser um dos protagonistas na cultura, não só em produtividade, como também em área cultivada (Embrapa, 2016a).

2.2.3 Composição e valor nutricional das sementes

Os grãos de canola produzidos no Brasil possuem em torno de 20 a 27 % de proteínas e de 34 a 45 % de óleo. O óleo de canola é considerado um alimento saudável por apresentar uma elevada quantidade de ômega-3, vitamina E (antioxidante que reduz radicais livres), gorduras insaturadas saudáveis (93 %) e o menor teor de gorduras saturadas (7 %) de todos os óleos vegetais. Esta composição ajuda a reduzir o risco de cardiopatias vasculares, com redução do colesterol total do sangue e da lipoproteína de baixa densidade (mau colesterol) (Tomm *et al.*, 2009; Embrapa, 2016b). De acordo com Edwards *et al.* (2011), a semente da canola é composta basicamente por óleo (42 %), proteínas (21 %), carboidratos solúveis (17 %), umidade (8 %), fibras (7 %) e cinzas (5 %). Sua composição em minerais apresenta: 70 % de P, N, Zn e Mg; 30 a 35 % de CU, Mg, S, Ca e K; menos que 20 % de Na e Cl (Edwards *et al.*, 2011).

Um dos fatores de grande interesse mundial pela cultura do girassol é a excelente qualidade de seu óleo, que é rico em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido linoleico (68 %) – essencial à saúde humana (Mandarino, 1997). O óleo de girassol também pode auxiliar no desempenho de funções importantes no organismo humano.

A composição química das sementes de qualquer genótipo de girassol varia amplamente com o local de produção, clima, fertilizantes e até mesmo com a posição em que a semente se encontra no capítulo. Em sua composição, o girassol apresenta em torno de 4,8 % de água, 24 % de proteína, 47,3 % de óleos, 19,9 % de carboidratos e 4 % de resíduo mineral. A fibra bruta que compõem os

carboidratos totais representa 3,8 g/100 g de semente. Dentre os minerais presentes, 100 g de semente de girassol apresenta uma composição média de 120 mg de cálcio, 837 mg de fósforo, 7,1 mg de ferro, 30 mg de sódio e 920 mg de potássio. Em relação ao teor de vitaminas, a semente apresenta: Vitamina A (50 UI), tiamina (1,96 mg/100g), riboflavina (0,23 mg/100 g) e niacina (5,4 mg/100 g) (Carrão-Panizzi e Mandarino, 1994; Leite *et al.*, 2005).

2.2.4 Produtos derivados das sementes

O girassol apresenta características muito especiais no que diz respeito ao seu potencial de aproveitamento econômico. O óleo é o principal produto obtido da semente de girassol, seguido de sua utilização em formulações para ração animal, além de ser amplamente utilizada na alimentação humana na forma de farinhas, concentrados e isolados proteicos (Carrão-Panizzi e Mandarino, 1994). Segundo De Castro *et al.* (1996), para cada tonelada de sementes de girassol são produzidos 400 kg de óleo, 250 kg de casca e 350 kg de torta, sendo que esta última contém de 45 a 50 % de proteína.

A canola possui um potencial de aproveitamento similar ao descrito para o girassol. Ela é vista como um produto muito similar à soja pois, além de originar produtos como óleo comestível, óleo para produção de biodiesel e proteína para produção de rações, ainda possui um valor de mercado equiparado com o preço pago pela soja nos contratos de venda. Segundo Tomm (2003), a cada tonelada de grãos produzidos, são obtidos 400 kg de óleo e 600 kg de torta.

2.2.4.1 Extração do óleo e sua composição

O método mais antigo de extração de óleo consiste na aplicação de pressão através da prensagem mecânica. O óleo está presente nas células oleaginosas da planta na forma de glóbulos, juntamente com outros constituintes, circundado por uma membrana e uma parede celular. A prensagem consiste em aplicar uma alta pressão (4 a 35 MPa), que provoca a ruptura da parede celular, permitindo que os glóbulos de óleo escoem para fora da semente (Singh e Bargale, 2000).

As prensas são recomendadas para a operação com grãos ricos em óleos. Grãos de algodão, canola, girassol e coco seco (copra) podem ser pré-prensados, como uma etapa que antecede a extração por solvente (Woerfel, 1995). Do processo de prensagem resulta a torta que, dependendo do grau de extração de óleo obtido, ainda passa por um extrator com solvente para extração do óleo residual. O solvente universalmente adotado na indústria de extração de óleos é o hexano. Os óleos migram das sementes para o solvente por terem maior afinidade com este e, em seguida, é feita a recuperação do solvente, que pode ser reutilizado novamente no processo. Nos processos mistos, o óleo bruto obtido da prensagem é misturado ao óleo residual que provém da extração por solvente (Mandarino e Roessing, 2001).

Segundo a resolução n° 482, de 23 de setembro de 1999 da ANVISA, os óleos de girassol e canola são definidos como óleos comestíveis obtidos das sementes de *Helianthus annuus L.*

(girassol) e *Brassica campestris L.* ou *Brassica napus L.* (canola), respectivamente, através de processos tecnológicos adequados, sendo classificados da forma descrita a seguir.

- Refinado: óleo obtido pelos processos de extração e refino.
- Semi-refinado: óleo obtido pelos processos de extração e neutralização.
- Bruto: óleo obtido pelo processo de extração.
- Virgem: óleo obtido por processo de prensagem a frio que não tenha sido submetido a outro tratamento que não a lavagem, decantação, centrifugação e filtração.

O óleo de canola caracteriza-se por possuir um nível muito baixo de ácidos graxos saturados, sendo constituído por 60 % de ácido oleico, um ácido monoinsaturado. O óleo de canola contém um nível moderado de ácido linoleico (20 %) e uma quantidade significativa de ácido alfa linoleico, que são ácidos poli-insaturados e essenciais para o organismo humano (Tabela 2.1). O conteúdo de óleo da semente de canola varia de 35 a 45 %, sendo que, geralmente, este conteúdo é referente a uma semente com aproximadamente 8 % de umidade (Edwards *et al.*, 2011).

Tabela 2.1 Teor percentual médio de ácidos graxos presentes nos diferentes óleos vegetais.

Oleaginosas	Principais ácidos graxos componentes (%)					Ácido graxos saturados (%)	Ácidos graxos insaturados (%)	
	Láurico	Oleico	Linoleico	Linolênico	Erúico		Mono-insaturados	Poli-insaturados
Açafrão		72,8	19,2	0,8		7,0	73,1	20,0
Algodão		13,7	56,5	0,1		26,8	14,4	56,6
Amendoim		40,7	33,9	0,1		21,3	17,1	34,0
Canola		60,3	20,1	9,5	0,7	6,3	62,8	29,6
Gergelim		41,6	42,3	0,3		15,1	42,2	42,6
Girassol		23,1	65,1	0,2		11,6	23,1	65,3
Linhaça		19,9	15,9	52,7		9,5	19,9	68,6
Oliva		64,0	15,9	0,1		18,0	66,0	16,0
Palma	44,7	17,1	2,9	0,1		76,5	17,1	3,0
Soja		24,8	52,4	7,7		15,2	24,8	60,0

Fonte: Oliveira e Vieira (2004).

O óleo de girassol é rico em ácidos graxos essenciais, ou seja, aqueles que não podem ser produzidos pelo organismo humano e devem ser ingeridos através da alimentação. Dentre os óleos vegetais comestíveis, o óleo de girassol é o que apresenta um dos maiores percentuais de ácidos graxos poli-insaturados, apresentando uma alta relação de ácidos graxos poli-insaturados/saturados (65,3 %/11,6 %) (Tabela 2.1). O ácido linoleico representa cerca de 65 % do total dos ácidos graxos poli-insaturados presentes no óleo de girassol (De Castro *et al.*, 1996). O conteúdo de óleo nos aquênios das variedades mais comercializadas varia de 38 a 48 % (Mourad, 2006).

A qualidade de um óleo é dada pela sua composição de ácidos graxos. Dependendo de sua composição, o óleo será utilizado de diferentes maneiras pela indústria. Os óleos para fritura, por exemplo, devem possuir alto grau de estabilidade oxidativa em temperaturas elevadas. Estes devem apresentar em sua composição elevado teor de ácido oleico como o óleo de oliva, ou então devem sofrer um processo de hidrogenação após a etapa de refino para reduzir suas insaturações (Mandarino, 1992; Fernández-Martínez *et al.*, 2009).

Além da fração saponificável de um óleo (ácido linoleico, ácido oleico, etc) existem compostos (fração insaponificável) presentes em pequenas quantidades, que também são importantes do ponto de vista da qualidade e estabilidade dos óleos vegetais. Dentre esses, destacam-se os tocoferóis ou vitamina E, os esteróis, os fosfolípidos (lecitinas) e os β -carotenos. Os tocoferóis e os fosfolípidos atuam como antioxidantes naturais. Os β -carotenos aumentam a estabilidade dos óleos à luz. O óleo de girassol possui maior estabilidade do que o óleo de soja quando exposto à luz, devido ao seu maior conteúdo em β -carotenos (Foundations, 1994; Oliveira e Vieira, 2004). O óleo ao sair da prensa possui teor de tocoferóis (vitamina E) superior àquele extraído por processos em que se aplicam solventes orgânicos, que o protegem da deterioração e estendem sua vida de prateleira (Oliveira e Vieira, 2004).

Os óleos brutos obtidos por prensagem ou solvente trazem consigo quantidades variáveis de substâncias não-glicéridicas, as quais afetam a cor, a estabilidade, o aroma e o sabor do óleo. Para tornar os óleos brutos em comestíveis o óleo ainda passa por um conjunto de processos definido refino. As principais etapas do refino são: a degomagem, que consiste em remover fosfatídeos ou fosfolípidos (gomas), proteínas e substâncias coloidais; a neutralização que tem objetivo de retirar os ácidos graxos livres existentes originalmente no óleo; a clarificação que visa eliminar as matérias que conferem coloração aos óleos vegetais e a desodorização que é uma operação de acabamento dos óleos onde são removidos compostos voláteis que atribuem sabor e odor aos óleos (Correia, 2009).

2.2.4.2 Produção de torta e farelo

O processamento dos grãos oleaginosos para extração de óleo vegetal gera tortas ou farelos como subprodutos. Segundo Abdalla *et al.* (2008), a produção de tortas a partir de oleaginosas destinadas à produção de biodiesel no ano de 2008 no Brasil foi estimada em 3,7 milhões de toneladas. Esses subprodutos são compostos, principalmente, por proteínas, fibras (material lignocelulósico) e minerais. Com teor de proteínas que pode variar de 15 a 50 %, essas tortas ou farelos apresentam grande potencial de utilização na alimentação animal e na produção de concentrados ou isolados proteicos de alto valor nutricional, sendo fundamentais para a geração de renda adicional na cadeia de produção do óleo. Denomina-se torta se a extração do óleo for física (prensagem) e farelo, quando o material for submetido à extração química (com solventes), como etapa única ou após o processo de extração física (Bomfim *et al.*, 2009).

A composição das tortas ou farelos de oleaginosas depende da variedade, das cultivares, das condições de cultivo e dos métodos de extração do óleo. Devido às sementes de girassol possuírem casca que representa em torno de 20 a 30 % de sua massa total (Carrão-Panizzi e Mandarino, 1994), a composição do farelo de girassol depende do grau de descascamento dos grãos, assim como do tipo de processamento. A semente da canola é processada normalmente inteira. Na Tabela 2.2 têm-se um comparativo entre as composições das tortas de diferentes oleaginosas.

Tabela 2.2. Composição percentual média de algumas tortas de diferentes oleaginosas.

Oleaginosas	Composição (%)					
	Proteína Bruta		Extrato Etéreo		Fibras Bruta	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Amendoim	41	45	8	9	10	15
Algodão	42	47	3	3	10	11
Canola	32	36	22	24	7	8
Girassol	20	22	20	22	21	23
Soja	42	47	3	4	7	8

Fonte: Abdalla *et al.* (2008)

Visto que um dos principais gastos na criação animal é com sua alimentação, é de grande importância o conhecimento das características qualitativas dos alimentos para balancear uma ração com todos os nutrientes necessários e com custo mínimo. A utilização de farelos ou tortas de oleaginosas em quantidades certas podem apresentar diversos benefícios para nutrição animal como: aumento da concentração energética das rações, fonte de ácidos graxos essenciais, melhora da absorção de substâncias lipossolúveis como vitaminas A, D e xantofilas, entre outros. No entanto, quando empregadas em quantidades elevadas, podem trazer prejuízo à qualidade da ração devido, principalmente, à presença de compostos fenólicos que possuem ação antinutricional (Tonissi *et al.*, 2013).

Tanto o farelo de canola como o de girassol apresentam particularidades no que diz respeito a cuidados antes de serem destinados à alimentação animal devido ao caráter tóxico ou antinutricional de alguns componentes presentes em sua composição, principalmente, quando combinados com proteínas. Entre esses componentes estão: compostos fenólicos, glucosinolatos, isotiocianatos de alila, fitatos agentes goitrogênicos e saponinas (Weisz *et al.*, 2009a; Das Purkayastha *et al.*, 2014). Por outro lado, a elevada capacidade antioxidante desses componentes, referente principalmente aos compostos fenólicos, faz com que o extrato resultante da remoção desses compostos tenha potencial aplicação como ingrediente funcional, suplemento alimentar e como inibidor de reações de oxidação lipídica em alimentos (Sarkis, 2014).

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são estruturas químicas compostas por, pelo menos, uma hidroxila ligada a um anel aromático, podendo ser encontradas na forma de moléculas simples ou com alto grau de polimerização. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas (Bravo, 1998; Balasundram *et al.*, 2006).

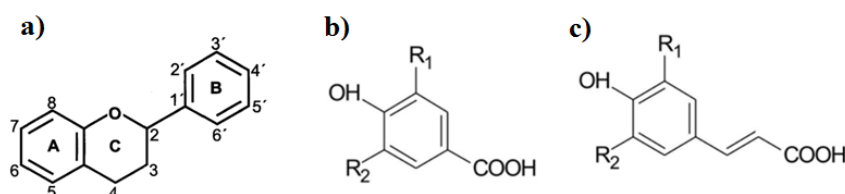
Na natureza, os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo sintetizados durante o desenvolvimento normal ou em resposta a condições de estresse (Naczk e Shahidi, 2004) apresentam grande importância fisiológica e morfológica em plantas, contribuindo para proteção contra patógenos e predadores (Bravo, 1998; Naczk e Shahidi, 2004), além de determinar as características sensoriais e nutricionais de frutas, legumes e outras plantas (Tomás-Barberan *et al.*, 2000; Lapornik *et al.*, 2005). Esses compostos são onipresentes em plantas e apresentam um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina (Naczk e Shahidi, 2004).

Compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de substâncias do reino vegetal, com mais de 8.000 diferentes compostos fenólicos na natureza (Bravo, 1998). Dentre os compostos fenólicos presentes em plantas e alimentos destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, coumarinas, fenilpropanoides, derivados do ácido benzoico, suberinas, cutinas, estilbenos, taninos, ligninas, lignanas, tocoferóis e tocotrienóis (Shahidi e Naczk, 2003).

Em plantas oleaginosas os principais compostos fenólicos presentes são derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, assim como das coumarinas, flavonoides e ligninas (Kozłowska *et al.*, 1990). Os efeitos antinutricionais dos compostos presentes nas tortas de canola e girassol serão abordados posteriormente na presente revisão.

Segundo King e Young (1999), os três mais importantes grupos de fenólicos são os flavonóis, ácidos fenólicos e polifenóis. Os flavonoides são o maior e mais estudado grupo de fenólicos em plantas, sendo os flavonóis (quercetina, caempferol e miricetina), as flavonas (apigenina, luteonina, diosmina) e seus glicosídeos, os mais comumente encontrados (Bravo, 1998). Além desses grupos podem se destacar também as flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianinas (Hollman e Katan, 1999). Os flavonoides têm como estrutura básica (C₆-C₃-C₆) que consiste em dois anéis aromáticos unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico conforme demonstrado na Figura 2.3.

Figura 2.3 Estrutura básica dos a) flavonoides; b) ácidos hidroxibenzoicos e c) ácidos hidroxicinâmicos. Fonte: Bravo (1998) e Jia *et al.* (2016).



Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzoico e do ácido hidroxicinâmico (King e Young, 1999) (Figura 2.3). Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm como estrutura comum (C₆-C₁). Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), constituídos pelos ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sináptico dentre os mais comuns (Bravo, 1998). O ácido clorogênico é originado da combinação dos ácidos cafeico e quínico, o qual é amplamente distribuído em frutas e vegetais, mas encontrado em maior concentração em sementes, incluindo café, grãos e sementes de girassol (Sondheimer, 1958).

Os taninos fazem parte da classe dos polifenóis e possuem massa molar relativamente alta e, segundo sua estrutura química, são classificados em taninos condensáveis e hidrolisáveis. Os taninos condensáveis, denominados proantocianidinas são oligômeros e polímeros de flavan-3-óis (catequina, epicatequina, por exemplo). Os taninos condensáveis são encontrados principalmente em frutas, grãos e legumes, sendo comumente acumulados nas camadas mais externas das plantas (King e Young, 1999). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados. Como seu próprio nome diz, esses taninos são facilmente hidrolisados em meios ácidos, alcalinos e por água quente ou por ação enzimática. O tanino hidrolisável mais conhecido é o ácido tânico (Bravo, 1998; Shahidi e Naczk, 2003; Ignat *et al.*, 2011).

Os taninos se ligam fortemente com os grupos -NH dos peptídeos e proteínas evitando sua hidrólise e digestão no estômago e, por isso, eles são conhecidos como compostos antinutricionais (Shahidi e Naczk, 2003). Substâncias tânicas são facilmente perceptíveis na boca por reagirem com proteínas causando uma sensação gustativa chamada adstringência (King e Young, 1999).

2.3.1 *Análise dos compostos fenólicos*

Muitos estudos têm sido realizados na separação, identificação, quantificação e aplicação de compostos fenólicos em alimentos, uma vez que ainda não existe uma metodologia satisfatória para extração de todos os compostos fenólicos, sendo necessário a elaboração e otimização de processos para cada classe de compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2007). Os métodos de análise utilizados podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou um grupo ou classe de compostos fenólicos (Naczk e Shahidi, 2004).

Devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes, um aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente (Macheix e Fleuriet, 1990).

Um grande número de métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos para quantificação de compostos fenólicos em materiais vegetais, baseando-se em diferentes princípios de acordo com os grupos estruturais presentes nos compostos fenólicos (Ignat *et al.*, 2011). Cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são amplamente usadas para separação e

quantificação de compostos fenólicos. A elucidação da estrutura presente nos compostos a analisar é geralmente conseguida usando a combinação das técnicas de CG e CLAE com análise de espectrometria de massas, bem como outras técnicas relevantes (Naczk e Shahidi, 2004).

2.3.2 *Atividade antioxidante*

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias bloqueadoras dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres e espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007). Antioxidantes são substâncias que podem agir diminuindo a concentração de oxigênio, evitando a fase de iniciação da oxidação, quelando íons metálicos e decompondo produtos primários a compostos que não são radicais (Shahidi, 1997).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está associada à sua capacidade de sequestrar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons e quelar cátions de metais. Seu potencial antioxidante depende da sua estrutura, mais especificamente do número e posição dos grupos hidroxilas e da natureza dos substitutos no anel aromático (Balasundram *et al.*, 2006). Os ácidos hidroxicinâmicos exibem atividade antioxidante maior do que os ácidos hidroxibenzoicos (Andreasen *et al.*, 2001). A maior atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos é relativo ao grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, o qual assegura maior capacidade doadora de átomos H para estabilização de radicais do que os grupos $-\text{COOH}$ dos ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Diariamente vivenciamos hábitos e condições ambientais consideradas inapropriadas para a boa saúde de nosso corpo, assim como estresses emocionais provocados pelo envelhecimento e estados psicológicos ou, até, patologias crônicas e degenerativas. Esses fatores estão associados ao estresse oxidativo, que é comumente definido como um desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras, e sua retirada insuficiente pelo sistema de defesa antioxidante do organismo. Esses radicais presentes em excesso em nosso corpo interagem com estruturas celulares, causando alterações de composição e função (Engers *et al.*, 2013; Sies, 2013).

Os compostos fenólicos estão presentes em quase todos os alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes e bebidas, sendo as principais fontes destes compostos na dieta humana (Hertog *et al.*, 1993). Numerosos estudos clínicos sugerem que antioxidantes ingeridos através do consumo de frutas, vegetais, chás e vinho tinto são os principais fatores responsáveis pela redução da incidência de doenças crônicas, incluindo doenças do coração e alguns tipos de câncer (Morton *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002; Liu, 2004).

Antioxidantes naturais estão sendo amplamente aplicados para prevenção de oxidações lipídicas em óleos, gorduras e alimentos, principalmente em substituição aos antioxidantes sintéticos. Diversos trabalhos foram publicados com sua aplicação para estabilidade oxidativa de óleos vegetais (Wanasundara e Shahidi, 1994; Mohdaly *et al.*, 2011; Betalleluz-Pallardel *et al.*, 2012) e em produtos a base de carne (Karre *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014). Entre os antioxidantes

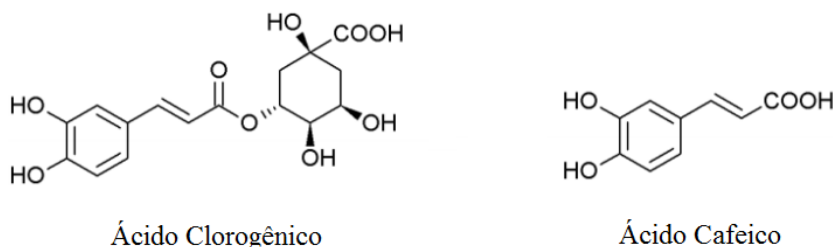
naturais mais utilizados podem ser citados os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas. O tocoferol é largamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação de ácidos graxos insaturados (Evans *et al.*, 2002). Ainda, alguns compostos fenólicos tem sua função antioxidante amplificada quando se encontra em misturas com outros compostos, ou seja, apresentam um efeito sinérgico (Gava *et al.*, 2009).

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). No entanto, esses compostos estão sendo associados a efeitos colaterais e considerados tóxicos e carcinogênicos quando ingeridos em doses elevadas, porém as quantidades limites são de difícil estimação (Kahl e Kappus, 1993). Em alguns países seu uso é proibido enquanto que, no Brasil, de acordo com a RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007, limitou seus usos para 200 mg/kg de BHA e TBHQ e 100 mg/kg de BHT (Anvisa, 2007; Inanç e Maskan, 2012).

2.3.3 Compostos fenólicos presentes no girassol

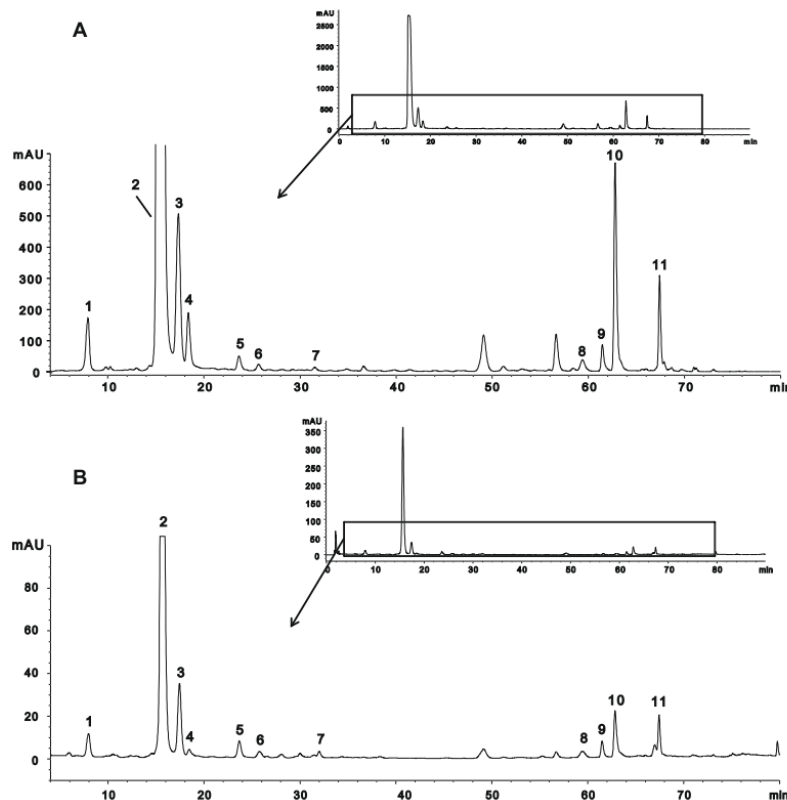
A semente de girassol é rica em compostos fenólicos, totalizando de 10 a 42 g/kg de semente. O óleo de girassol extraído por prensagem a frio contém quantidades bastante baixas de compostos fenólicos. Estes se encontram, quase em sua totalidade, no farelo ou torta proveniente da extração do óleo. O conteúdo de compostos fenólicos pode variar de acordo com a forma de processamento, o grau de descascamento da semente, variedade ou região de cultivo do girassol (Weisz *et al.*, 2009b; a). Matthäus (2002) ao extrair compostos fenólicos da torta desengordurada do girassol com diferentes solventes, obteve teores de fenólicos totais entre 270 e 3880 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra. O principal composto fenólico presente na semente de girassol é o ácido clorogênico (ácido 5-o-cafeoilquínico), seguido de pequenas quantidades de ácido cafeico, cinâmico, cumárico, ferúlico, sinápico, hidroxicinâmicos e traços de ácido vanílico, siríngico e hidroxibenzoico (Pedrosa *et al.*, 2000). Na Figura 2.4 estão apresentadas as estruturas moleculares do ácido clorogênico e cafeico.

Figura 2.4 Principais compostos fenólicos presentes na semente de girassol. Fonte: Weisz *et al.* (2009a).



Na Figura 2.5 pode-se observar um espectro dos compostos fenólicos presentes no miolo e na casca do girassol.

Figura 2.5 Espectro de separação dos compostos fenólicos presentes no miolo (A) e na casca (B) do girassol obtido por HPLC-DAD (320 nm). Identificação dos picos: (1) ácido 3-O-cafeoilquínico, (2) ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico), (3) ácido 4-O-cafeoilquínico, (4) ácido cafeico, (5) ácido cafeoilquínico, (6) ácido 5-O-p-cumaroilquínico, (7) ácido 5-O-feruloilquínico, (8) ácido ferúlico, (9) ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, (10) ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, e (11) ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico. Fonte: Weisz *et al.* (2009a).



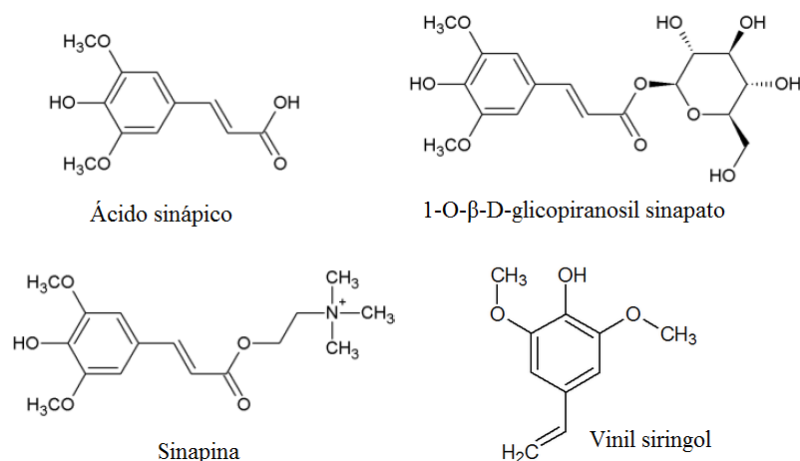
2.3.4 Compostos fenólicos presentes na canola

O farelo de canola contém uma quantidade de compostos fenólicos 30 vezes superior ao farelo de soja e normalmente superior a qualquer outra oleaginosa (Shahidi, 1990; Shahidi e Nacz, 1992). Os compostos fenólicos presentes na canola incluem ácidos fenólicos esterificados, ácidos fenólicos livres e ácidos fenólicos insolúveis ligados (Krygier *et al.*, 1982). Os compostos fenólicos mais significativos presentes na canola são os derivados do ácido sinápico. O ácido sinápico constitui mais de 73 % dos ácidos fenólicos livres enquanto a sinapina, o éster de colina do ácido sinápico, é o principal éster fenólico da semente de canola (em torno de 80 % dos compostos fenólicos totais) (Kozłowska *et al.*, 1990). A sinapina encontra-se principalmente no miolo da semente de canola, estando presente em baixas concentrações nas cascas. O composto antioxidante com maior atividade da canola é um derivado do ácido sinápico identificado como 1-O- β -D-glicopiranosil sinapato (Figura 2.6) (Wanasundara *et al.*, 1994). As quantidades de derivados do ácido sinápico presentes no farelo de canola varia de 6,39 a 18,37 mg/g, dependendo da variedade e do método de processamento da canola. Outros compostos fenólicos presentes em menor quantidade na canola

incluem os ácidos p-hidroxibenzóico, vanílico, gentísico, protocatecuico, siríngico, p-cumarico, ferúlico, cafeico e clorogênico e taninos, os quais se encontram principalmente nas cascas (Krygier *et al.*, 1982). O principal composto responsável pela atividade antioxidante na fração polar do óleo de canola é o vinil siringol (Figura 2.6), ou também chamado de canolol, com concentração de 0,25 a 0,70 mg/g (Koski *et al.*, 2003).

Estudos referentes à capacidade de capturar radicais livres do ácido sinápico e da sinapina indicaram que a sinapina tem atividade significante, porém menor que o ácido sinápico. A sinapina não foi capaz de inibir a formação de hidroperóxidos, comparado ao ácido sinápico, indicando que extratos ricos em ácido sinápico são mais eficientes em inibir oxidações lipídicas em meios líquidos do que extratos ricos em sinapinas (Thiyam *et al.*, 2006).

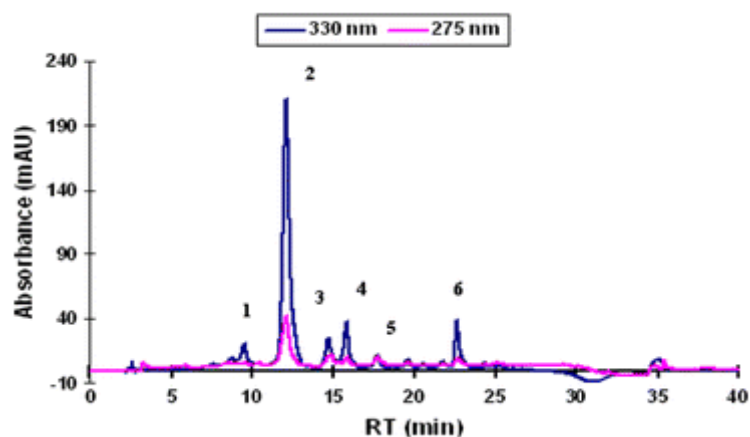
Figura 2.6 Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes na canola. Fonte: Khattab *et al.* (2010).



Segundo Khattab *et al.* (2010), as quantidades de compostos fenólicos totais presentes na semente desengordurada, na torta e no farelo de canola, determinados pelo método de *Folin Cioclteau*, foram 16,16 – 22,54, 17,73 – 19,71 e 14,56 – 16,66 mg/g, respectivamente. Valores menores foram obtidos quando somados os ácidos fenólicos determinados por HPLC-DAD, correspondendo a 11,95 - 16,3, 13,10 – 15,00 e 9,16 – 14,55 mg/g, respectivamente.

Na Figura 2.7 está representado o cromatograma do extrato de semente de canola obtido por Khattab *et al.* (2010) nos comprimentos de onda de 275 e 330 nm, com seus respectivos picos identificados. O componente sinapina (o éster de colina do ácido sinápico) foi o composto fenólico encontrado em maior quantidade no extrato de canola, representando de 69,76 a 87,5 % da área total do cromatograma, quantificando 8,65-11,89, 9,9-11,31 e 6,11-10,11 mg/g de semente, torta e farelo de canola desengordurados, respectivamente. O ácido sinápico representa de 0,86 a 3,76 % dos ácidos fenólicos totais, resultando em 0,09 a 0,59 mg/g de semente de canola desengordurada.

Figura 2.7 Espectro de separação dos compostos fenólicos presentes no extrato de canola obtido por HPLC-DAD: (1) sinapol, (2) sinapina, (3) ácido sinápico, (4, 5 e 6) derivados do ácido sinápico não identificados. Fonte: Khattab *et al.* (2010)



2.4 Propriedades nutricionais e antinutricionais das tortas de canola e girassol

A presença de compostos fenólicos nas tortas ou farelos de oleaginosas pode afetar a qualidade de suas proteínas de diferentes formas, tais como, reduzir sua digestibilidade, alterar suas propriedades organolépticas e funcionais quando oferecida em dietas para animais, bem como diminuir o seu tempo de armazenamento (Salgado *et al.*, 2012).

O ácido clorogênico, que é o composto fenólico encontrado em maior concentração no farelo de girassol, quando ingerido por animais misturado ao farelo, prejudica o aproveitamento de alguns nutrientes devido à inibição da ação das enzimas tripsina e lipase. O ácido clorogênico também pode sofrer oxidações provocadas pela ação de polifenoloxidasas, reagindo com proteínas, e com isso, reduzindo a quantidade de aminoácidos essenciais, a digestibilidade e a qualidade nutricional do alimento, além de alterar a funcionalidade e aceitabilidade das proteínas (Pedrosa *et al.*, 2000; Martinez e Duvnjak, 2006). O ácido clorogênico provoca uma redução significativa na viabilidade e digestibilidade das proteínas do girassol, mas, ao mesmo tempo, o ácido clorogênico é um importante componente dos hidroxicinamatos que são ubíquos em plantas e têm uma atividade biológica interessante, incluindo propriedades antioxidantes (Clifford, 2000).

A adição de antioxidantes em óleos e gorduras evitam sua degradação oxidativa e, conseqüente, formação de sabores e odores rançosos, prevenindo o óleo contra a formação de compostos secundários potencialmente tóxicos e mantendo sua qualidade nutricional (Moure *et al.*, 2001). Em estudo sobre a utilização de extrato fenólico do girassol aplicado ao seu óleo para aumentar sua estabilidade oxidativa, constatou-se que o ácido clorogênico retardou a oxidação do óleo de girassol em 11 % e 41 % nas temperaturas de 30 e 110 °C, respectivamente, quando comparado a um controle (De Leonardis *et al.*, 2003). O ácido cafeico, produzido a partir da hidrólise alcalina do

extrato metanólico do ácido clorogênico, apresentou a mesma eficiência antioxidante do que o extrato original em baixas temperaturas, porém na temperatura de 110 °C foi significativamente mais eficiente (118 % quando comparado ao controle) (De Leonardis *et al.*, 2003).

Tocoferóis (vitamina E), que constituem uma outra classe de compostos fenólicos, são os mais poderosos antioxidantes lipossolúveis. Eles existem em quatro isômeros homólogos: α (5,7,8-trimetiltocol), β (5,8-dimetiltocol), γ (7,8-dimetiltocol), e δ (8-metiltocol), os quais diferem entre si pelo número ou posição do grupo metil na molécula. Os tocoferóis também diferem entre si em sua atividade biológica e habilidade de proteger gorduras e óleos da oxidação rançosa. O α -tocoferol representa 90 % dos tocoferóis presentes na semente do girassol, sendo o tocoferol que apresenta as mais elevadas propriedades de vitamina em sistemas biológicos, mas as mais baixas propriedades antioxidantes em óleos e alimentos que os contêm. O γ -tocoferol é o maior antioxidante *in vitro*, porém *in vivo* sua atividade é baixa. O β e δ -tocoferol apresentam propriedades intermediárias (Demurin *et al.*, 1996; Žilić *et al.*, 2010).

A presença de altas concentrações de compostos fenólicos, especialmente dos taninos, presentes em concentrações entre 0,2 % e 3 % no farelo de canola, ou a presença de produtos de suas oxidações, contribuem para o escurecimento da cor, sabor amargo e adstringente dos farelos, diminuindo sua palatabilidade e valor nutricional em dietas para ruminantes (Das Purkayastha *et al.*, 2013). Glicosinolatos e taninos presentes no farelo de canola inibem as funções digestivas interferindo na ação de enzimas (por complexação), afetando principalmente a hidrólise de proteínas e amidos (Bell, 1993). Os glicosinolatos são decompostos em metabólitos tóxicos, tais como isotiocianatos, agliconas, tiocianatos e nitrilos, no aparelho digestivo dos animais causando doenças como hipotireoidismo e doenças do fígado.

Além dos compostos fenólicos, os fitatos também têm propriedades antinutricionais por se associarem fortemente com proteínas, amidos e fibras, reduzindo sua digestibilidade e a biodisponibilidade de minerais aos animais (Das Purkayastha *et al.*, 2013). A remoção desses componentes da torta de canola foi efetuada por Das Purkayastha *et al.* (2013), que sugeriram a aplicação do extrato obtido na estabilização do biodiesel produzido através de resíduos de óleos de cozinha. A pesquisa realizada verificou um aumento no tempo necessário para a formação de compostos oxidativos, ou seja, um elevado poder antioxidante desse extrato. Além disso, foi observada uma notável redução na contaminação microbiana do biodiesel após determinado tempo de estocagem. Com esse estudo foi possível valorizar a torta, que ficou com baixo índice de antinutrientes, e utilizar o extrato como potencial substituinte de antioxidantes sintéticos.

Os princípios bioativos da canola como o ácido sinápico, a sinapina e o canolol têm potencial aplicação como agentes terapêuticos para manter e melhorar a saúde e bem-estar humano. Estes componentes minoritários com elevado poder antioxidante, após extraídos, podem ser incorporados a diversos produtos alimentares, farmacêuticos ou cosméticos (Thiyam-Holländer *et al.*, 2012).

2.5 Extração de compostos fenólicos

A escolha do método de extração de compostos fenólicos deve levar em conta a posterior aplicação do extrato e da torta; é importante que seja um método simples, de baixo custo e que empregue solventes extratores de baixa ou sem toxicidade.

2.5.1 Extração sólido-líquido convencional

A extração é um importante passo para a separação, identificação e utilização de compostos bioativos de materiais vegetais. Existem diversas técnicas de extração clássicas para extração de compostos bioativos de materiais vegetais, sendo que a maioria destas técnicas são baseadas no poder de extração de diferentes solventes usados juntamente com a aplicação de calor e/ou agitação (Ignat *et al.*, 2011). A extração sólido-líquido pode ser definida como um fenômeno de transporte de massa no qual componentes contidos numa matriz sólida migram para o solvente na qual está imersa (Ignat *et al.*, 2011). A eficiência da recuperação de compostos fenólicos de materiais vegetais é dependente de diversos fatores como: natureza química da amostra, tamanho de partícula da amostra, tempo e temperatura de extração, número de extrações sucessivas da mesma amostra, relação solvente:amostra e composição do solvente, entre outros (Robbins, 2003; Naczk e Shahidi, 2004).

A solubilidade dos compostos fenólicos é governada pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenólicos, assim como pela interação dos fenólicos com outros constituintes da amostra e formação de complexos insolúveis. Portanto, dificilmente haverá um procedimento adequado e totalmente satisfatório para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe de fenólicos específicas presentes no material vegetal (Naczk e Shahidi, 2004). A seguir serão abordados alguns parâmetros de processo importantes.

2.5.1.1 Solvente

A eficiência da extração em qualquer método convencional de extração depende principalmente da escolha do solvente (Cowan, 1999). O fator mais importante na escolha do solvente é a polaridade dos compostos alvo a extrair. A afinidade molecular entre o solvente e o soluto, a transferência de massa, o uso de cossolvente, a preservação do meio ambiente, a toxicidade e a viabilidade financeira são fatores que também devem ser considerados para a escolha do solvente na extração de compostos bioativos (Azmir *et al.*, 2013).

Metanol, etanol, acetona, água, etil acetato e, em menor grau, propanol, dimetilformamida, e suas combinações são frequentemente usadas para extração de compostos fenólicos (Antolovich *et al.*, 2000). Alguns exemplos de solventes utilizados para extração de determinados compostos bioativos estão apresentados na Tabela 2.3. Para garantir a qualidade alimentar dos produtos extraídos, a US Food and Drug Administration, recomenda a utilização de solventes orgânicos

ambientalmente seguros e de grau não tóxico como etanol, n-butanol ou iso-propanol (Bartnick *et al.*, 2004).

Tabela 2.3 Solventes usados para extração de diferentes compostos bioativos.

Água	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Dicloro- metanol	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonóis
Taninos	Polifenóis	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoides	
Saponinas	Flavonóis	Sapononinas				
Terpenoides	Terpenoides	Taninos				
	Alcaloides	Flavonas				
		Polifenóis				

Fonte: Cowan (1999).

Matthäus (2002) utilizou o resíduo desengordurado proveniente do processamento de extração de óleo de oito diferentes oleaginosas para extração de compostos fenólicos com diferentes solventes (70 % metanol, 70 % acetona, água e etil-acetato) concluindo que a natureza da amostra de resíduo e o solvente afetaram fortemente a extração dos compostos fenólicos.

A utilização de água e etanol, assim como suas misturas são os solventes mais comumente empregados para extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais. A preferência pela utilização desses solventes está ligada, principalmente, à sua ampla disponibilidade em relação aos demais solventes e por dissolverem facilmente diversos compostos fenólicos (Alothman *et al.*, 2009); assim como pela sua baixa toxicidade e recomendação para utilização em operações de extração em alimentos (Chen *et al.*, 2015). Devido à diferença de polaridade entre a água (polaridade maior) e o etanol (polaridade menor), a combinação desses dois solventes possibilita o controle adequado da polaridade para extração dos compostos fenólicos (Dahmoune *et al.*, 2015). Além da manutenção da constante dielétrica do solvente (polaridade), o aumentando da taxa de transferência mássica percebido com a utilização da mistura desses dois solventes está relacionado com os efeitos em separado de cada solvente. A água promove o inchamento do material vegetal, o que contribui para o aumento da superfície de contato entre solvente e material vegetal, facilitando, com isso, a penetração do solvente orgânico na matriz vegetal e aumentando a transferência mássica através da difusão molecular (Cacace e Mazza, 2003; Barizão *et al.*, 2013). O etanol auxilia na extração quebrando as ligações entre os compostos fenólicos e a matriz vegetal e interagindo nas ligações não covalentes entre flavonoides, promovendo uma dissolução mais rápida no solvente (Singh *et al.*, 2012; Arruda *et al.*, 2016).

2.5.1.2 *Tempo e Temperatura*

O tempo e a temperatura de extração dos compostos fenólicos são dois importantes parâmetros a serem otimizados, inclusive para minimizar o gasto energético do processo. Temperaturas mais altas aumentam a solubilidade e a taxa de difusão dos compostos para o solvente, favorecendo sua extração, no entanto, temperaturas de extração elevadas combinadas com tempos prolongados contribuem para degradação dos compostos fenólicos (Dai *et al.*, 2009; Davidov-Pardo *et al.*, 2011). Nacz *et al.* (2005) em seus experimentos demonstraram que o tempo e a temperatura ótima de extração de compostos fenólicos da torta de canola foi de 2 minutos na temperatura ambiente.

A degradação de compostos fenólicos e perda da capacidade antioxidante de amostras expostas a altas temperaturas são frequentemente relatadas em estudos. Os compostos fenólicos podem apresentar-se mais ou menos estáveis termicamente, dependendo de sua estrutura química, sendo que as perdas por degradação térmica dos compostos fenólicos de uma determinada amostra tratada dependerá de sua composição (Thoo *et al.*, 2010).

Em extrações convencionais costuma-se deixar a amostra sólida em contato com o solvente por prolongados tempos em temperatura ambiente para que ocorra a extração dos compostos desejados, denominando esse procedimento de maceração, podendo esse período de tempo se estender de algumas horas a até alguns dias (Chesson, 1980). Spigno *et al.* (2007) observaram que a elevação da temperatura de extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva de 45 para 60 °C possibilitou a redução do tempo de extração e, que sob o ponto de vista econômico para aplicação industrial, trabalhar em temperaturas mais elevadas e em tempos mais curtos seria mais conveniente e energeticamente viável.

A temperatura impacta fortemente o rendimento da extração, tendo como principais efeitos: a) o amolecimento e inchamento dos tecidos vegetais, tornando as células mais permeáveis; b) o enfraquecimento das interações entre compostos fenólicos e as proteínas e polissacarídeos, contribuindo para o aumento da taxa de difusão; c) aumento da solubilidade dos compostos a serem extraídos e diminuição da viscosidade do solvente (Arruda *et al.*, 2016).

2.5.1.3 *Outros fatores que influenciam extração de compostos fenólicos*

A relação amostra:solvente e o número de extrações repetidas numa mesma amostra também afetam o rendimento da recuperação de compostos fenólicos. Um aumento na relação de amostra:solvente provoca um aumento do gradiente de concentração, aumentando com isso, a taxa de difusão dos compostos da amostra para o solvente, favorecendo a extração dos compostos fenólicos (Cacace e Mazza, 2003). A otimização deste parâmetro é muito importante para um maior aproveitamento do solvente, de forma a minimizar sua utilização e maximizar a extração dos compostos de interesse (Khoddami *et al.*, 2013).

A estrutura da amostra e o tamanho de partícula também influenciam fortemente a extração de compostos fenólicos de materiais vegetais. A área superficial é diretamente proporcional à taxa de transferência de massa. Além disso, diminuindo o tamanho da partícula, diminui-se a distância que o soluto tem que percorrer até a superfície da amostra, reduzindo-se com isso o tempo de extração (Cacace e Mazza, 2003). Entretanto, em alguns casos, partículas com diâmetros muito reduzidos podem sofrer o bloqueio dos poros pelo solvente, dificultando sua penetração na amostra (Ibarz e Barbosa-Canovas, 2002).

Os compostos fenólicos podem estar ligados a outros elementos como carboidratos ou proteínas, o que os torna difíceis de serem extraídos. Para promover a liberação desses compostos ligados, essas ligações podem ser hidrolisadas através da adição de enzimas ou através de hidrólise ácida ou alcalina (Khoddami *et al.*, 2013).

2.5.2 Processos alternativos de extração

Além das metodologias tradicionais de extração sólido-líquido, tais como maceração, infusão, decocção e ebulição sobre refluxo, tecnologias alternativas estão sendo utilizadas como substitutas ou auxiliares dos métodos convencionais de extração buscando melhorar sua eficiência. As técnicas de extração convencionais são trabalhosas, demoradas e, normalmente, requerem um grande volume de solventes orgânicos (Wang e Weller, 2006). Além disso, atualmente, a utilização de solventes menos tóxicos, como misturas de água e álcool somente, são recomendados para a extração de compostos bioativos de materiais vegetais. O uso desses solventes, todavia, pode tornar o processo de extração mais custoso e menos eficiente. Por esses motivos tem-se um grande interesse em se desenvolver métodos eficientes de extração desses compostos (Esclapez *et al.*, 2011).

O uso de tecnologias de extração não convencionais pode diminuir o uso de solventes orgânicos e também o tempo e a temperatura de extração e, nesse contexto, diminuir custos e aumentar a eficiência do processo de extração. Dentre as técnicas estudadas recentemente estão a extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado e as tecnologias elétricas de campo elétrico pulsado, campo elétrico moderado e descargas elétricas de alta tensão (Brusotti *et al.*, 2014).

A seguir será abordado de forma mais aprofundada o processo de extração assistida por ultrassom que foi a tecnologia alternativa estudada no presente trabalho.

2.5.2.1 Extração assistida por ultrassom

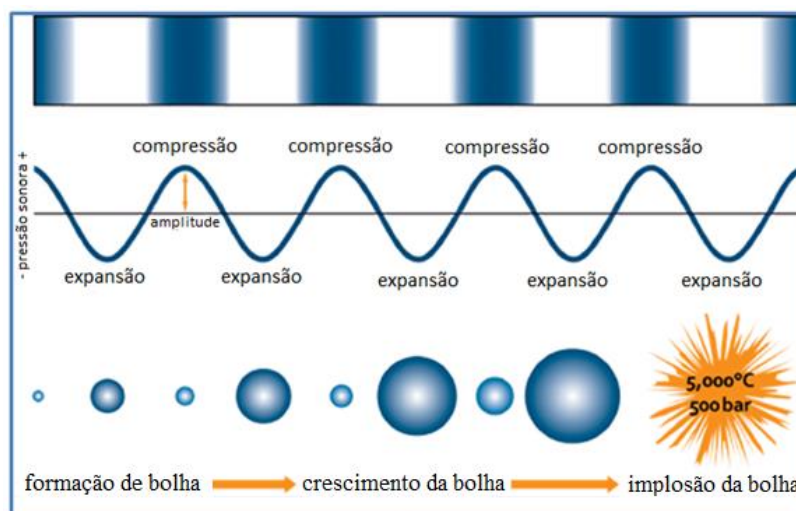
O ultrassom tem se apresentado como uma promissora técnica na área de ciência e tecnologia de alimentos, demonstrando resultados bastante satisfatórios quando aplicado no processo de extração de compostos bioativos, entre outros. Entre as diversas metodologias que vêm sendo estudadas, a extração assistida por ultrassom (EAU) apresenta-se como uma técnica relativamente

fácil de usar, versátil e flexível, de baixo custo e uma alternativa eficiente à extração convencional (Wang *et al.*, 2008; Tiwari, 2015).

O ultrassom é um tipo especial de onda sonora com frequências superiores às audíveis por humanos (>20 kHz). As ondas ultrassônicas quando se propagam em um meio promovem a formação de regiões de compressão e expansão (Azmir *et al.*, 2013). Este processo produz um fenômeno chamado de cavitação, que consiste na formação e colapso de microbolhas de gás no interior do líquido, gerando microturbulências e colisões entre partículas que produzem jatos de solvente com alta velocidade. Com o colapso das microbolhas, regiões com alta energia acumulada são criadas, podendo gerar pontos com temperatura e pressão bastante elevados (5000 K e 1000 atm) (Ji *et al.*, 2006; Soria e Villamiel, 2010a). Somente meios líquidos ou líquidos contendo sólidos podem sofrer esse fenômeno de cavitação (Azmir *et al.*, 2013). A Figura 2.8 ilustra o processo de formação e colapso das bolhas, durante as fases de expansão e compressão da passagem da onda de ultrassom.

Figura 2.8 Formação e colapso das bolhas provocados pelas ondas ultrassônicas.

Fonte: Kennedy (2005).



Os efeitos provocados pelo ultrassom são responsáveis por diversos fenômenos físicos e químicos incluindo agitação, vibração, pressão, ondas de choque, forças de cisalhamento, microjatos, compressão e rarefação, fluxo acústico, cavitação e formação de radicais (Tiwari, 2015).

No tecido vegetal, os efeitos mecânicos do ultrassom provocam o inchamento das células ou ruptura das paredes celulares, promovendo, num primeiro caso, altas taxas de difusão através das paredes celulares, seguido de uma lixiviação dos compostos constituintes, assim como um aumento da área de contato entre as fases sólida e líquida (Mason *et al.*, 1996; Vinatoru, 2001). Quando o fenômeno de cavitação ocorre na superfície dos tecidos ou no interior dos microporos das partículas da matriz vegetal, causa a ruptura da parede celular e a consequente migração de substâncias do meio intracelular para o solvente (Ji *et al.*, 2006; Corrales *et al.*, 2008a; Chemat *et al.*, 2011). Dessa

forma, em comparação com a extração convencional, o ultrassom facilita a difusão dos componentes intracelulares para o solvente em razão do seu efeito de ruptura da célula e alargamento dos poros (Li *et al.*, 2004; Hromádková *et al.*, 2008).

Além dos fatores que influenciam a extração, como o solvente, temperatura e pressão, uma melhor recuperação dos compostos intracelulares pode ser obtido através da otimização dos fatores relacionados ao ultrassom como frequência, potência e tempo, assim como a distribuição das ondas ultrassônicas (Wang e Weller, 2006). Otimizações da EAU tem sido descritas recentemente para extrair compostos fenólicos da casca da laranja (*Citrus sinensis L.*) (Khan *et al.*, 2010), da farinha de trigo (Wang *et al.*, 2008) e de folhas de oliveiras (Şahin e Şamlı, 2013), entre vários outros materiais. A intensidade do som é atenuada à medida que a onda sonora atravessa o meio. A perda de energia, ou atenuação, da intensidade acústica reaparece no meio como calor (Da Luz, 1998).

Os efeitos dos parâmetros de processamento são:

- frequência: a frequência das ondas ultrassônicas é inversamente proporcional ao tamanho das microbolhas de cavitação, ou seja, altas frequências formam curtos ciclos de compressão e rarefação, os quais não são suficientes para separar as moléculas do líquido para formar as microbolhas e, portanto, não irão produzir cavitação. Para que as ondas ultrassônicas possuam alta energia, baixas frequências devem ser utilizadas e é, por este motivo, que os equipamentos industriais de ultrassom operam preferencialmente na faixa de frequência de 20 a 100 kHz, garantindo que ocorra cavitação (Sehgal e Wang, 1981; Mason *et al.*, 1996);

- intensidade: é a medida do fluxo de energia acústica através de uma unidade de área do meio por unidade de tempo ($J/s.cm^2$). A intensidade de ultrassom é determinada pela amplitude da onda. A intensidade de ultrassom dissipada num meio aumenta com o aumento da amplitude das vibrações ultrassônicas (Raso *et al.*, 1999). Como as ondas sonoras passam através de qualquer meio real, a intensidade do sinal diminui com a distância da propagação devido ao espalhamento das ondas sonoras e absorção de parte da energia sonora pelo material (Torley e Bhandari, 2004). Embora seja necessária uma intensidade mínima para a ocorrência de cavitação, nem sempre um aumento na amplitude resulta num melhor efeito ultrassônico sobre o material a tratar (Mohideen, 2011);

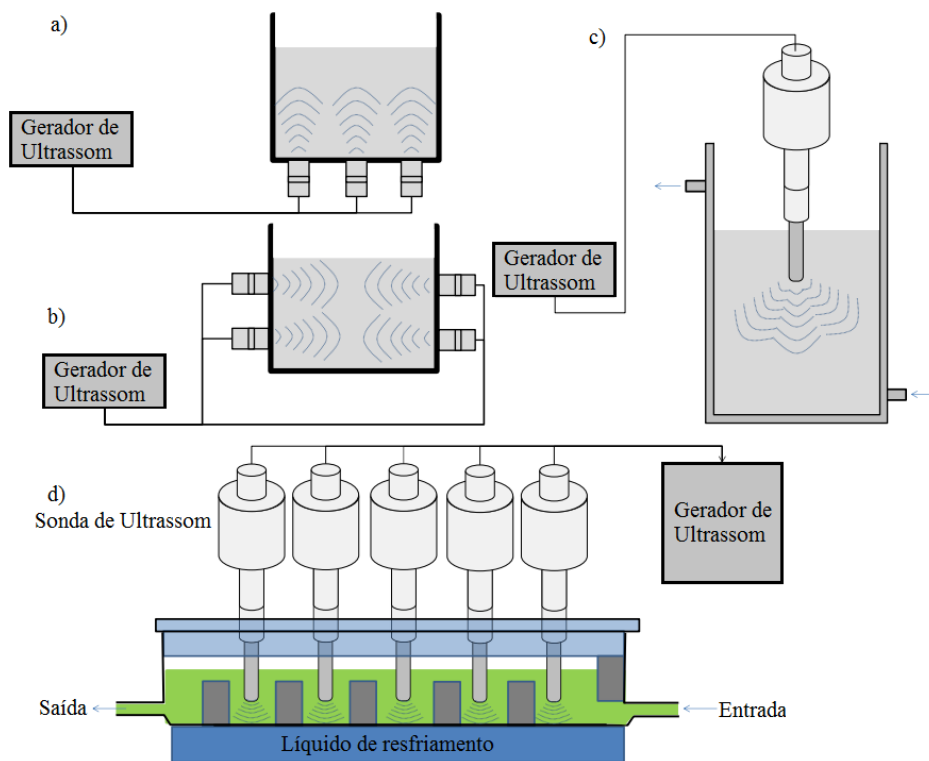
- temperatura: embora um aumento na temperatura leve a um aumento do número de microbolhas de cavitação, o seu colapso é prejudicado pelo aumento da pressão de vapor. A cavitação é mais efetiva em baixas temperaturas. Uma relação entre temperatura e cavitação deve ser encontrada de forma a otimizar o processo (Muthukumaran *et al.*, 2006).

Ao se tratar da escolha do solvente a utilizar em extrações assistidas por ultrassom, além da afinidade entre solvente e a amostra, os fatores relacionados à cavitação, como pressão de vapor ou tensão superficial do solvente, devem ser considerados (Li *et al.*, 2004). Pressões de vapor mais elevadas fazem com que o solvente penetre mais facilmente nas bolhas de cavitação, amortecendo o seu colapso e, com isso, amenizando seu efeito. Neste contexto, os solventes mais comuns, tais

como misturas de água, poderiam funcionar melhor do que os solventes puros mais voláteis tradicionalmente utilizados em extrações convencionais (Mason e Cintas, 2002; Esclapez *et al.*, 2011).

A aplicação do ultrassom pode ser realizada por meio de diferentes configurações de equipamentos. Nos primeiros estudos de extração com a aplicação de ultrassom, os experimentos eram realizados em frascos abertos imersos em banho de limpeza ultrassônica, onde verificou-se o quão importante era a geometria do banho para a reprodução dos resultados. Com o aprimoramento desta tecnologia, desenvolveu-se um equipamento capaz de transmitir as ondas acústicas diretamente no meio através de uma sonda, permitindo que uma maior energia fosse transmitida para o meio (Mason e Cintas, 2002; Esclapez *et al.*, 2011). Hoje em dia, os sistemas de extração assistidos por ultrassom mais amplamente utilizados em escala de bancada são por banho de ultrassom ou sondas operando em batelada ou fluxo contínuo (Figura 2.9).

Figura 2.9 Configurações de aparelhos ultrasônicos: (a, b) banhos de ultrassom indireto, (c) sonda, (d) banho de ultrassom direto em fluxo contínuo. Fonte: González-García *et al.* (2010).



Um dos aspectos importantes a se determinar na extração assistida por ultrassom é a quantidade apropriada de energia a ser aplicada no sistema. A determinação da energia consumida no processo de extração é de difícil mensuração, pois a energia ultrassônica pode ser absorvida, refletida ou utilizada no fenômeno cavitação (Tiwari, 2015). Para o cálculo da potência real requerida para o processo de extração, não se pode considerar a potência nominal lida no equipamento (Vinatoru, 2015). Como toda a energia ultrassônica transferida para o líquido é eventualmente convertida em calor (Berlan e Mason, 1992), o método mais comum para determinação da energia transferida de

fato para amostra é por calorimetria (Vinatoru, 2015). Este método se baseia na medição do calor gerado no volume de líquido contido num calorímetro (recipiente teoricamente isolado termicamente) através da medição da variação de temperatura com o tempo de aplicação do ultrassom, estabelecendo com isso uma estimativa grosseira da energia transferida para o sistema de extração (Raso *et al.*, 1999; Tiwari, 2015).

A energia transferida para o sistema pode ser expressa como intensidade de ultrassom (IU; em W/cm^2) ou densidade de energia acústica (DEA; em W/cm^3 ou W/mL), sendo determinada pela amplitude da onda gerada pelo equipamento em uma determinada frequência. IU é a quantidade de energia transmitida para a amostra através da área superficial do transdutor (sonda). DEA é a quantidade de energia ultrassônica por unidade de volume de amostra e pode ser usada como parâmetro para escalonamento do sistema de extração. Para a determinação da IU e da DEA é necessária a determinação da potência de ultrassom transmitida para o meio (Tiwari, 2015). A potência de ultrassom dissipada no meio (P), a intensidade de ultrassom (IU) e a densidade de energia acústica (DEA) podem ser determinadas através das Equações (2.1) – (2.3).

$$P = mc_p \left[\frac{dT}{dt} \right]_{t=0} \quad (2.1)$$

$$IU = \frac{P}{A} \quad (2.2)$$

$$DEA = \frac{P}{V} \quad (2.3)$$

sendo P a potência de ultrassom (W), m a massa do meio (kg), c_p o calor específico do meio ($kJ.kg^{-1}.^{\circ}C^{-1}$), (dT/dt) a declividade inicial da curva obtida da diferença de temperatura pelo tempo ($^{\circ}C.s^{-1}$), A a área superficial da sonda de raio r (πr^2) e V o volume do meio (mL).

Entre as vantagens da EAU pode-se citar a possibilidade de redução do tempo de extração, da energia utilizada e da utilização de solvente. Além disso, os fatores envolvidos na EAU contribuem promovendo uma agitação mais eficiente do meio, acelerando a transferência de energia, reduzindo os gradientes térmicos e a temperatura de extração, reduzindo o tamanho dos equipamentos, aumentando a produção e eliminando etapas do processo (Chemat *et al.*, 2011).

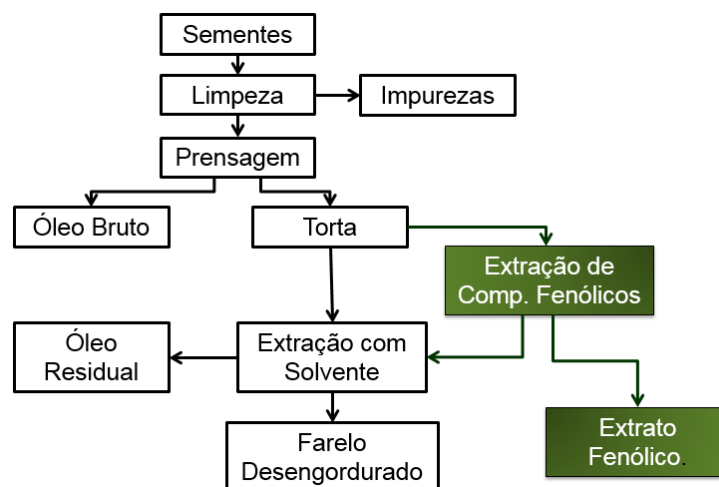
Entre as diversas aplicações do ultrassom na indústria alimentícia, segundo Soria e Villamiel (2010b), a extração assistida por ultrassom é a que apresenta maior viabilidade e rentabilidade econômica quando aplicada em larga escala. Além disso, é de fácil instalação, tem custo energético competitivo e devido à ausência de peças móveis requer pouca manutenção. Para o caso de escalonamento desse processo, é bastante importante que se faça uma otimização de todas as variáveis envolvida em escala de bancada previamente para então se obter os parâmetros a serem utilizados em escala maior (Esclapez *et al.*, 2011; Tiwari, 2015). Devido ao sigilo mantido pelas empresas, poucos relatos são encontrados referentes à sua aplicação industrial. Patist e Bates (2008)

citam em seu trabalho de revisão um caso em que uma empresa recuperou seu investimento de 700 mil dólares em apenas 4 meses, representando um ganho de 2 milhões de dólares por ano, somente pelo aumento proporcionado no rendimento da extração de produtos naturais. Outro relato de uma empresa Australiana cita a recuperação do investimento em apenas 2 anos ao implementar a extração assistida por ultrassom para extrair cor e aromas do mosto de uva, não somente aumentando o rendimento em 30 %, mas também a qualidade das propriedades organolépticas do produto final (Esclapez *et al.*, 2011).

Este estudo teve como motivação a busca pela valorização de um subproduto do processo de extração de óleo do girassol e canola (farelo/torta), de forma a torná-lo mais rentável economicamente para a indústria. Para isso, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a utilização da técnica de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos das tortas de girassol e canola, bem como aplicar o extrato fenólico obtido.

Como proposta para satisfazer a demanda comercial deste mercado, uma nova etapa de extração de compostos fenólicos por ultrassom seria adicionada ao processo de extração do óleo de canola e girassol, como apresentado no fluxograma da Figura 2.10.

Figura 2.10 Fluxograma do processo de extração de óleo de sementes oleaginosas adicionado da etapa de extração de compostos fenólicos

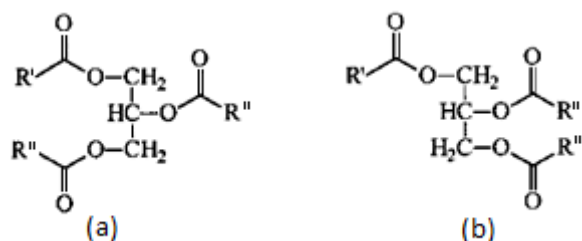


2.6 Lipídeos

Lipídeos são moléculas orgânicas formadas a partir da associação de ácidos graxos e álcool que desempenham importantes funções no organismo dos seres vivos. Os lipídeos são os principais depósitos de energia celular, destacando-se como as moléculas de reserva energética mais eficientes, pois cada molécula carrega grande quantidade de energia por unidade de peso. São solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes polares, apresentando natureza hidrofóbica (Damodaran *et al.*, 2009; Frankel, 2014).

Quimicamente, os lipídeos são sintetizados pela união de três ácidos graxos e uma molécula de glicerol, formando um triéster. São chamados de triglicerídeos, triglicérides ou mais corretamente triacilgliceróis. Os triglicerídeos mistos de ácidos graxos insaturados ou saturados de cadeia longa, contendo um número par de átomos de carbono, são os principais componentes das gorduras naturais comestíveis, podendo existir na forma de diapasão (a) e/ou de cadeira (b) conforme representado na Figura 2.11.

Figura 2.11 Estrutura molecular dos triglicerídeos (a) formato diapasão (b) formato cadeira; R', R'', R''' – cadeias saturadas ou insaturadas



Em geral, os lipídeos podem ser classificados em óleos (líquidos) ou gorduras (sólidos), correspondendo ao seu estado físico em temperatura ambiente. O conteúdo de lipídeos nos alimentos desempenha um papel importante na qualidade dos alimentos, pois contribuem com atributos como textura, sabor, nutrição e densidade calórica (Damodaran *et al.*, 2009). Fisiologicamente, as gorduras têm três funções básicas nos alimentos: agem como fonte de ácidos graxos essenciais (ácidos linolênico e linoleico); agem como portadores de vitaminas solúveis em gordura (A, D, E e K); e são fonte importante de energia (Frankel, 2014).

A manipulação de lipídeos tem tido ênfase especial na pesquisa e no desenvolvimento de alimentos nas últimas décadas. Dentre os diversos estudos realizados acerca das possíveis alterações e aplicações dos lipídeos, destaca-se a busca por tornar os lipídeos mais estáveis diante da oxidação (Damodaran *et al.*, 2009).

2.6.1 Oxidações lipídicas

“Oxidação lipídica” é o termo geral utilizado para descrever uma sequência complexa de alterações químicas resultantes da interação de lipídeos com oxigênio (Min e Boff, 2002). Durante reações de oxidação de lipídeos, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídeos decompõem-se, formando moléculas pequenas e voláteis (ácidos graxos livres) que produzem os aromas indesejados conhecidos como rancidez oxidativa (Damodaran *et al.*, 2009). Os produtos da oxidação lipídica afetam diversas propriedades nos alimentos como sua qualidade sensorial, valor nutricional e funcionalidade, assim como, podem ser tóxicos quando apresentados na forma de radicais livres, causando a depreciação ou rejeição do produto (Silva *et al.*, 1999).

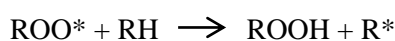
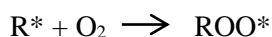
As reações de oxidação podem ser provocadas pela auto-oxidação, foto-oxidação, oxidação enzimática e oxidação lipídica, sendo que a auto-oxidação é o principal mecanismo que leva à

deterioração oxidativa dos lipídeos (Hamilton, 1995). Esta reação ocorre naturalmente entre o oxigênio molecular e as insaturações presentes nos ácidos graxos, resultando na formação de radicais livres de gordura, radicais livres de peróxido e hidroperóxidos (Asnaashari *et al.*, 2015). O mecanismo de autooxidação de lipídeos ocorre da mesma forma que em muitos outros compostos orgânicos, através do mecanismo de reação em cadeia provocada por radicais livres, incluindo as etapas de iniciação, propagação e terminação (Frankel, 2014).

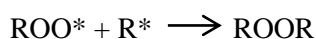
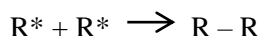
Iniciação:



Propagação



Terminação:



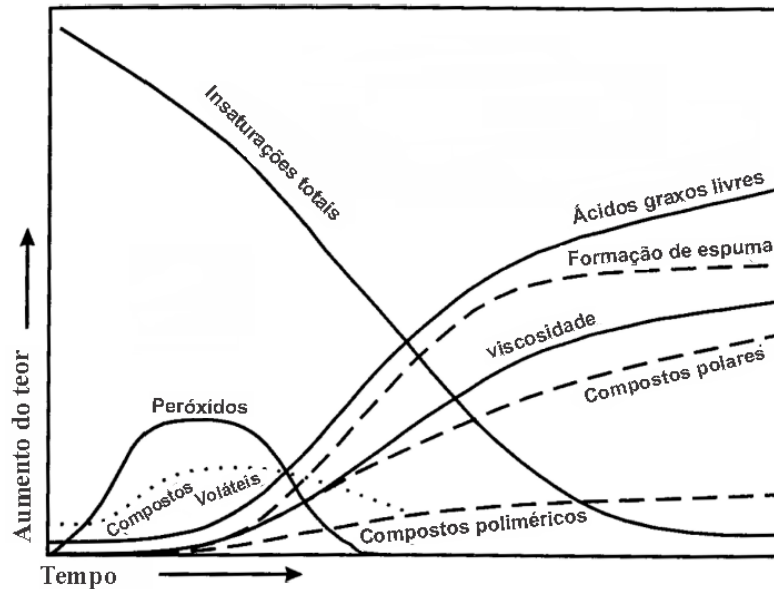
A etapa de iniciação gera radicais livres através do sequestro do hidrogênio do ácido graxo insaturado. Uma vez iniciada, a reação em cadeia termina somente quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e o oxigênio (Kirk, 1984). O processo de iniciação mais provável é a decomposição catalisada por um metal, sendo favorecida pelos fatores luz e calor (Choe e Min, 2006). Na propagação, o radical alquila (R^*), formado através do ácido graxo insaturado, reage rapidamente com o oxigênio molecular, formando radicais peroxila (ROO^*). Nas condições normais de temperatura e pressão, a velocidade de reação do radical alquila (R^*) com o oxigênio é muito maior do que da sua formação e, por isso, a concentração de radicais alquila é muito menor do que a de radicais peroxila. Estes radicais peroxila podem subtrair o hidrogênio de outro ácido graxo insaturado (RH), produzindo hidroperóxidos (ROOH) e um novo radical livre (R^*). A taxa de formação dos radicais alquila e de hidroperóxidos depende somente da disponibilidade de oxigênio e da temperatura. A terminação ocorre quando os radicais livres reagem entre eles, formando espécies não radicalares (Velasco *et al.*, 2004; Choe e Min, 2006).

Apesar de os hidroperóxidos serem relativamente estáveis, na presença de metais ou em temperaturas elevadas, eles são facilmente decompostos em radicais peroxila (ROO^*) e alcóxila (LO^*), levando, assim, à formação de produtos secundários da oxidação como, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos e lactonas (Oetterer *et al.*, 2006). Temperaturas elevadas, como em condições de fritura, diminuem as insaturações dos ácidos graxos presentes nos óleos aumentando a formação de espuma, viscosidade, densidade, calor específico e alterando o conteúdo de ácidos graxos,

compostos polares e poliméricos (Choe e Min, 2007). Na Figura 2.12 está demonstrado as mudanças físico-químicas do óleo submetido a elevadas temperaturas.

Figura 2.12 Alterações físico-químicas em óleos submetidos a elevadas temperaturas.

Fonte: Choe e Min (2007).



Além de provocar alterações de odor, sabor, cor, viscosidade e composição dos lipídeos, a oxidação lipídica pode causar diversas consequências nutricionais como: destruição parcial dos ácidos graxos insaturados essenciais linoleico e linolênico; destruição parcial de outros lipídios insaturados como as vitaminas A, carotenóides e tocoferóis; destruição parcial da vitamina C (co-oxidação); formação de produtos secundários da oxidação lipídica (malonaldeído e outros compostos) e compostos de Maillard, capazes de reagir com biomoléculas (especialmente proteínas), diminuindo a absorção destas; irritação da mucosa intestinal por peróxidos, que provoca diarreia e diminuição da capacidade de absorção; e formação de lipídios oxidados que são antagonistas de diversos nutrientes, como tiamina, pantotenato de cálcio, riboflavina, ácido ascórbico, vitamina B12, tocoferóis, vitamina A, proteínas, lisina e aminoácidos sulfurados (Kanner, 1994; Ferrari, 1998).

Os óleos que contêm uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados, especialmente poli-insaturados, são os mais susceptíveis à oxidação (Abd-Elghany *et al.*, 2010). Conforme o grau de insaturações aumenta, ambas as taxas de formação e a quantidade de compostos oxidativos formados no final do período indutivo aumentam (Choe e Min, 2006). Outro fator que afeta a estabilidade oxidativa dos óleos é o método e o grau de processamento deste óleo. Segundo Jung *et al.* (1989), ao fazerem um teste de estocagem em ambiente escuro durante 6 dias a 55 °C com o óleo de soja retirado de diferentes etapas de seu processamento, verificaram que o óleo bruto apresentou maior estabilidade à oxidação, seguido do desodorizado, degomado, refinado e branqueado.

A oxidação lipídica em óleos vegetais pode ser minimizada basicamente com refrigeração, condicionamento e armazenamento corretos, embora as reações não cheguem a cessar-se por completo, pois requerem uma energia de ativação reduzida (Oetterer *et al.*, 2006).

2.6.2 Estabilização lipídica

A adição de antioxidantes, tanto de origem sintética como natural, pode retardar o desenvolvimento da oxidação lipídica. Os antioxidantes podem atuar diminuindo a concentração de oxigênio, interceptando o oxigênio singlete, sequestrando os radicais livres responsáveis pela iniciação da reação em cadeia como os radicais hidroxila, ligando-se a íons metálicos, decompondo produtos primários a compostos não radicalares e quebrando cadeias prevenindo a abstração continuada de hidrogênio do substrato (Shahidi, 1997). Os sequestrantes de radicais livres (SRLs) inibem a oxidação de lipídeos por reagirem mais rapidamente com os radicais livres, em comparação aos ácidos graxos insaturados. A eficiência do antioxidante depende da capacidade dos SRLs em doar hidrogênio para um radical livre. Como a energia de ligação do hidrogênio no SRL diminui, a transferência do hidrogênio para o radical livre é energeticamente mais favorável e, portanto, mais rápida (Damodaran *et al.*, 2009).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação como primários, secundários ou, quando exibem mais de um mecanismo de ação, de múltipla função (Akoh, 2017).

Os antioxidantes primários interrompem a cadeia de reações cedendo um hidrogênio a um radical lipídico livre, apresentando como consequência a diminuição do número de radicais livres, a redução da velocidade de oxidação e um retardo no período de indução (Simic e Jovanovic, 1994). Dentre estes antioxidantes os utilizados com mais frequência são os ésteres do ácido gálico (galato de propila), flavonoides, ácidos fenólicos, tocorofenóis e os sintéticos BHA, TBHT e BHT (Hraš *et al.*, 2000). Os antioxidantes secundários atuam como quelantes de íons metálicos catalisadores, decompõem hidroperóxidos a espécies não-radicalares, desativam o oxigênio singlete, absorvem radiação ultravioleta e agem como removedores de oxigênio. O ácido ascórbico é um exemplo de antioxidante secundário e reage com o oxigênio removendo-o do sistema fechado na situação em que o oxigênio se encontra em quantidade limitada. Os antioxidantes secundários podem ainda atuar como regeneradores dos antioxidantes primários (Wanasundara e Shahidi, 2005).

2.6.2.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um hidrogênio a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. A doação de um hidrogênio resulta na formação de um radical fenólico de baixa energia, estabilizado por

ressonância que tende a reagir em reações de terminação radical-radical (Damodaran *et al.*, 2009). Entretanto, sua utilização vem sendo questionada pois estudos têm revelado que estes compostos estão associados a diversos riscos à saúde, sendo considerados tóxicos e carcinogênicos (Abd-Elghany *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Em alguns países, os antioxidantes sintéticos têm sido proibidos devido à sua toxidez, sendo o BHT removido da lista de compostos geralmente reconhecidos como seguros - GRAS (*generally recognized as safe*) (Asnaashari *et al.*, 2015).

2.6.2.2 Antioxidantes naturais

A utilização de antioxidantes naturais como estabilizantes de óleos vegetais está sendo sugerida como uma alternativa sustentável aos antioxidantes sintéticos. Antioxidantes naturais podem ser encontrados em uma variedade de plantas, distribuídos em seus frutos, folhas, sementes e óleos, na forma de flavonoides, taninos, cumarinas, ligninas, curcumanoides, xantonas, terpenoides e compostos fenólicos (Abdelazim *et al.*, 2013). Em busca de possíveis fontes abundantes e de baixo custo para obtenção de antioxidantes naturais, o reaproveitamento de resíduos da indústria de processamento de alimentos, em especial dos que contenham compostos fenólicos, surgiu como uma alternativa em potencial (Poiana, 2012). A capacidade dos compostos fenólicos de sequestrar radicais livres é influenciada pela posição e grau de hidroxilação, polaridade, solubilidade, potencial de redução, estabilidade do fenólico a operações de processamento do alimento e estabilidade do radical fenólico (Damodaran *et al.*, 2009). A revisão bibliográfica sobre antioxidantes naturais está contida na Seção 2.3.2.

2.6.3 Avaliação do grau de oxidação lipídica

A estabilidade oxidativa dos lipídeos pode ser avaliada através de testes em condições normais de armazenamento (tempo real, temperatura e pressão ambientes), e por testes preditivos, os quais promovem um envelhecimento acelerado (oxigenação intensiva, tratamento térmico e iniciação forçada). Uma vez que os fenômenos naturais de oxidação são processos lentos, os testes de estabilidade em tempo real tornam-se, por vezes, incompatíveis com o controle de qualidade a nível industrial. Em contrapartida, os testes de estabilidade acelerados permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa ou a eficácia teórica de um antioxidante, apresentando-se, portanto, mais apropriados para a rotina analítica industrial (Silva *et al.*, 1999). Outro teste bastante utilizado para avaliação da estabilidade de óleos é o teste de termoxidação. Neste teste o óleo é submetido a elevadas temperaturas (aproximadamente 180 °C) por algumas horas, com o objetivo de simular condições de fritura, porém, sem a presença de alimento (Tyagi e Vasishtha, 1996).

A avaliação do grau de oxidação de óleos e gorduras é de grande importância para a indústria visto que é um meio de controlar e garantir a qualidade das matérias-primas adquiridas, bem como dos produtos comercializados. Normalmente, os métodos estão baseados na medida de um ou mais

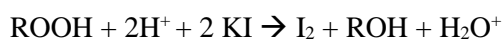
produtos da oxidação primária e secundária, ou propriedades físicas ou químicas resultantes destas modificações. Como os alimentos lipídicos contêm muitos ácidos graxos insaturados diferentes, podendo ser expostos a diferentes pró-oxidantes, muitos produtos de decomposição podem ser formados, tornando complexa a análise de oxidação de lipídeos (Silva *et al.*, 1999; Damodaran *et al.*, 2009). Diversos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar o grau de oxidação lipídica, porém cada método fornece informações sobre um estado particular de desenvolvimento do processo oxidativo. Portanto, é conveniente que se correlacione os resultados obtidos através de diferentes métodos de análise, assim como com as propriedades sensoriais dos óleos e gorduras (Warner e Eskin, 1995; Barriuso *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas de análise do grau de oxidação lipídica, destacam-se os métodos cromatográficos, espectrofotométricos, por condutimetria e polarografia. Nesta revisão serão descritos alguns métodos tradicionais de determinação tanto de produtos primários como secundários da oxidação lipídica.

2.6.3.1 *Índice de peróxidos*

A análise do índice de peróxidos é uma metodologia para determinação dos produtos de oxidação primária em óleos e gorduras. Os hidroperóxidos, geralmente referidos como peróxidos, são os produtos iniciais da oxidação lipídica, mas que têm natureza transitória devido a sua instabilidade e tendem a se desintegrar e formar os verdadeiros produtos de rancidez (Aragao *et al.*, 2008). A variação do nível de peróxidos ao longo do tempo ocorre de uma forma gaussiana, de forma que um nível baixo de peróxidos não garante boa estabilidade oxidativa, podendo, pelo contrário, indicar um nível de oxidação elevado (Silva *et al.*, 1999).

O método mais comumente utilizado para determinação do índice de peróxidos é o método titulométrico, que se baseia na medição do iodo produzido a partir da decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos presentes. O iodeto (I_2) liberado é titulado com uma solução de tiosulfato de sódio, utilizando-se o amido como indicador. As reações envolvidas estão apresentadas a seguir (Shahidi e Zhong, 2005). O resultado é expresso em miliequivalentes de oxigênio por kg de lipídeo (meq/kg) (Gray, 1978).

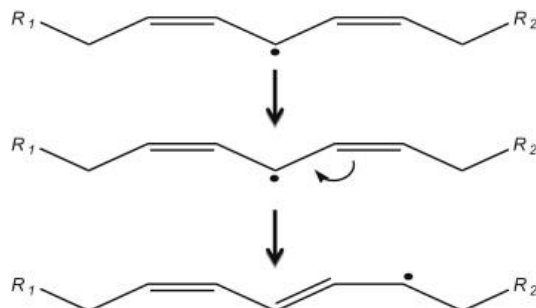


2.6.3.2 *Dienos e trienos conjugados*

A formação de hidroperóxidos a partir de ácidos graxos insaturados é geralmente acompanhada pela formação de dienos e trienos conjugados através do rearranjo das duplas ligações (Barriuso *et al.*, 2013). Grupos metileno adjacentes a duplas ligações se apresentam mais susceptíveis a perderem um hidrogênio, deixando um elétron não pareado neste átomo de carbono. Esta molécula

tende a atingir sua forma mais estável se rearranjando e formando dienos conjugados conforme mostra a Figura 2.13 (Pingret *et al.*, 2013).

Figura 2.13 Rearranjo para formar dienos conjugados



Os dienos conjugados apresentam intensa absorção de radiação no comprimento de onda de 232 nm e os trienos, que são produtos secundários de oxidação, absorvem em 270 nm. A relação $A_{270\text{nm}}/A_{232\text{nm}}$ permite diferenciar estados de evolução oxidativa: quanto maior o valor da absorbância a 232, mais elevado será o conteúdo em peróxidos, correspondendo, portanto, ao início do processo de oxidação; pelo contrário, quanto maior for o valor de absorbância a 270 nm, maior será o teor de produtos secundários presentes. A detecção de dienos e trienos conjugados é bastante simples e rápida, não requer reagentes químicos, apenas uma pequena quantidade de amostra (Silva *et al.*, 1999; Barriuso *et al.*, 2013).

2.6.3.3 Índice de p-anisidina

O método de análise do índice de p-anisidina é uma medida dos produtos secundários de oxidação, onde é medido o conteúdo de aldeídos gerados durante a decomposição dos hidroperóxidos (principalmente 2-alquenais e 2,4 alcadienais) (Shahidi e Zhong, 2005). A reação entre o reagente p-anisidina e os aldeídos presentes no óleo, em condições ácidas, gera produtos que absorvem no comprimento de onda de 350 nm. A intensidade de absorção deste comprimento de onda é convertida em índice de p-anisidina. Este teste é mais sensível para aldeídos insaturados do que para saturados, pois os aldeídos insaturados geram produtos com maior absorção neste comprimento de onda. Alguns autores não indicam a comparação deste índice entre óleos de diferentes fontes, visto que podem apresentar valores diferentes (Pokorny *et al.*, 2001). Óleos com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados podem apresentar alto índice de p-anisidina mesmo quando não oxidados (Warner e Eskin, 1995). O índice de p-anisidina é considerado um indicador confiável da rancidez oxidativa de óleos e gorduras (Shahidi e Zhong, 2005). Um óleo considerado bom deve apresentar um índice de p-anisidina inferior a 10 (Hamilton, 1983).

2.7 Ação antimicrobiana

Dentre as funções desempenhadas pelos compostos fenólicos sintetizados pelas plantas destaca-se sua própria proteção contra o ataque de agentes patogênicos (Cushnie e Lamb, 2005). Recentemente, compostos fenólicos têm sido foco de um grande número de estudos envolvendo sua ação antimicrobiana conforme documentado por Zuk *et al.* (2014), Bajko *et al.* (2016), Martínez *et al.* (2017), entre outros autores.

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é determinada pela sua estrutura química, em particular pelo número e posição dos substituintes no anel benzênico, e do comprimento da cadeia saturada (Sanchez-Maldonado, 2014). Oligômeros apresentam maior atividade do que os seus monômeros de ácido fenólicos correspondentes, sendo que quanto maior o comprimento da cadeia alquila maior é a atividade antimicrobiana (Merkl *et al.*, 2010).

Os grupos hidroxilas (-OH) presentes nos compostos fenólicos são vistos como os principais responsáveis pela ação antimicrobiana. Grupos ativos (-OH) podem interagir com a membrana celular, rompendo suas estruturas e causando o vazamento do material intracelular (Gyawali e Ibrahim, 2014).

O mecanismo de ação antimicrobiano dos compostos fenólicos está associado, principalmente, à capacidade de inibir a atividade de enzimas proteolíticas, interromper a síntese do ácido nucleico e aumentar a permeabilidade da parede celular às substância exógenas (Cushnie e Lamb, 2005).

Martínez *et al.* (2017) demonstraram através de testes de viabilidade e coloração com corantes vitais que o ácido clorogênico induz à *lise* celular fúngica, além de induzir uma permeabilização precoce da membrana dos esporos e ocasionar a perda de sua viabilidade. Através dos resultados que comprovam a atividade antifúngica do ácido clorogênico contra fungos fitopatogênicos relevantes em horticultura e agricultura, Martínez *et al.* (2017) destacam o potencial que os resíduos e subprodutos agrícolas ricos em ácido clorogênico apresentam para serem usados como fonte de biofungicidas.

De acordo com o exposto neste capítulo de revisão bibliográfica e fundamentação teórica, este trabalho visa estudar o desenvolvimento de técnicas eficazes para o reaproveitamento de resíduos e valorização dos subprodutos da indústria de alimentos. Este estudo apresenta destacada relevância na diminuição de desperdícios da indústria de alimentos e desenvolvimento de produtos cada vez mais naturais, saudáveis e sustentáveis.

Capítulo 3. Materiais e Métodos

Neste capítulo será apresentada a metodologia utilizada para preparo da amostra e extração dos compostos fenólicos das tortas de semente de canola e girassol, a aplicação deste extrato como antioxidante em óleos e como agente antifúngico, bem como os equipamentos e métodos de análises utilizados. Os experimentos e as análises foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) do Departamento de Engenharia Química da UFRGS e no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS.

3.1 Preparo da amostra das tortas para extração dos compostos fenólicos

As tortas de canola (*Brassica napus L.*) e girassol (*Helianthus annuus*) utilizadas neste trabalho (Figura 3.1) foram fornecidas pelas empresas Sementes Giovelli, localizada no município de Rolador, e Pazze Indústria de Alimentos Ltda, localizada no município de Panambi, respectivamente. As duas empresas são brasileiras e situadas no estado do Rio Grande do Sul. As empresas geram essas tortas como subproduto da extração de óleo das sementes destas culturas. Segundo informações fornecidas pelas empresas, previamente à extração de óleo, as sementes de girassol foram parcialmente descascadas e moídas e as sementes de canola apenas moídas. O processo de extração de óleo para obtenção dessas tortas foi somente por prensagem a frio.

Figura 3.1 Tortas de canola e girassol utilizadas neste trabalho. Fonte: Autor.



Canola



Girassol

Devido à alta pressão aplicada para extração do óleo, essas tortas se encontravam na forma de aglomerados rígidos. Para homogeneização da granulometria dessas amostras, a torta de girassol foi moída em moinho (MF 10, IKA®, Werke, Staufen, Alemanha) e peneirada em malha de 20 mesh (0,85 mm), enquanto os aglomerados da torta de canola foram manualmente fragmentados

e peneirados em malha de 20 mesh (0,85 mm). Após preparadas, as amostras foram armazenadas a -18 °C até posterior uso.

3.2 Caracterização das tortas

3.2.1 Teor de umidade e substâncias voláteis

O teor de umidade e substâncias voláteis das tortas foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a metodologia 925.10 da AOAC (AOAC, 2005b). Este método consiste em pesar de 5 a 10 g de amostra em balança analítica, com precisão de 0,0001 g (BOSH, modelo SAE 200, Alemanha) em uma cápsula de alumínio previamente seca em estufa (De Leo, modelo A3, Brasil) a 105 °C. As amostras foram colocadas na estufa a 105 °C, onde permaneceram por aproximadamente 14 h para então serem pesadas novamente. A umidade foi calculada através da diferença de massa antes e depois da secagem da água pela Equação 3.1. O resultado foi obtido em percentagem de umidade por massa de amostra.

$$x_w = \frac{m_u - m_s}{m_u} \times 100 \quad (3.1)$$

sendo, x_w a umidade em percentagem por massa em base úmida, m_u a massa de amostra úmida e m_s a massa de amostra seca.

A umidade foi determinada e os resultados apresentados em base seca. As análises de umidade foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3.2.2 Teor de óleo

O teor de óleo das tortas foi obtido de acordo com o método 996.01 da AOAC (AOAC, 2000) com algumas modificações. A extração do óleo foi realizada com o solvente hexano em um extrator Soxhlet. Em cartucho confeccionado de papel filtro foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra previamente seca. Ao extrator Soxhlet foi acoplado um condensador e um balão de destilação de 250 mL previamente seco em estufa por 12 h a 105 °C e pesado em balança com precisão de 0,0001 g. Foram adicionados aproximadamente 150 mL de hexano e a extração do óleo da amostra procedeu-se sobre refluxo de hexano durante 4 horas numa taxa de 10 refluxos por hora.

Concluído o período de extração do óleo, o solvente foi evaporado num evaporador rotativo (*Fisatom*, Modelo 450-5, Brasil); para finalizar a remoção do solvente, o balão foi colocado em estufa a 105 °C por mais 4 h. Por fim, o balão foi colocado em dessecador até atingir temperatura ambiente e posteriormente pesado em balança com precisão de 0,0001 g.

O teor de óleo foi quantificado por gravimetria através da Equação 3.2 e expresso em percentagem.

$$\% \text{ óleo em base seca} = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_s} \times 100 \quad (3.2)$$

sendo, m_s a massa de amostra seca e $m_{\text{óleo}}$ a massa de óleo. As análises de teor de óleo foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3.2.3 Teor de proteína bruta

O método de Kjeldahl foi empregado neste trabalho para determinar o teor de proteína bruta das tortas de girassol e canola segundo método 945.18 da AOAC, com algumas modificações (AOAC, 2005a). Este método é baseado na determinação do teor de nitrogênio orgânico total da amostra, tendo como princípio a digestão da amostra em meio ácido, convertendo o nitrogênio presente em amônia (NH_4^+), que é, posteriormente, separada por destilação e titulada para determinação da quantidade de amônio contida na solução receptora. Para que o valor seja expresso em proteína, é necessária a conversão do conteúdo de nitrogênio através de um fator que varia conforme a composição de aminoácidos do alimento (Chang, 2010; Bradstreet, 2015).

Para o processo de digestão, foram pesados em balança analítica 0,5 g de amostra em papel manteiga, colocados em tubo de Kjeldahl e adicionados de 5 g de mistura catalítica (sulfato de sódio anidro e sulfato de cobre 10:1) e de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi aquecida em bloco digestor a 400 °C até destruição completa da matéria orgânica (sistema apresenta aspecto de uma solução líquida esverdeada). Após resfriamento das amostras, foram acrescentados aos tubos de digestão Kjeldahl, 20 mL de água e 3 gotas de indicador Tashiro (vermelho de metila e azul de metileno). Os tubos foram encaixados no destilador Kjeldahl e através do funil introdutor do aparelho, foram adicionados aproximadamente 75 mL de solução de NaOH 40 %, para posterior destilação. O destilado foi recolhido em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 15 mL de solução de ácido bórico 4 %, 10 mL de água destilada e 5 gotas de indicador Tashiro, até se atingir o volume de aproximadamente 150 mL. A solução obtida (150 mL) foi titulada com ácido sulfúrico 0,1 N até mudança de coloração esverdeada para roxo-lilás.

O teor de proteína bruta foi calculado de acordo com a Equação 3.3.

$$\% \text{ óleo} = \frac{k \times V \times Fator}{P} \quad (3.3)$$

sendo:

$k = F_c \times 0,0014 \times 100$, pois 1 mL de H_2SO_4 0,1 N equivale a 0,0014 g de nitrogênio

F_c = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1 N

P = massa de amostra (g)

V = volume de solução de ácido sulfúrico 4 % gasto na titulação

$Fator$ = fator de conversão de nitrogênio para proteína

De acordo com Joslyn (2012), o fator de conversão assumido para o cálculo dos teores de proteínas das tortas de girassol e canola foi de 6,25. As análises de teor de proteína foram feitas em duplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3.3 Extração assistida por ultrassom (EAU) dos compostos fenólicos

A EAU dos compostos fenólicos foi realizada em uma célula de vidro encamisada com temperatura controlada por banhos de aquecimento e resfriamento. Para a seleção do banho a utilizar em função da troca térmica desejada, utilizou-se um quadro com válvulas conectado aos banhos e à célula extratora. A célula extratora usada possui as dimensões de 5 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura e se encontra sobre um agitador magnético (Fisatom,752-A, SP, Brasil), onde permaneceu sob agitação durante todo o processo de extração. O equipamento utilizado para EAU foi do tipo sonda (VC 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA), com frequência fixa de 20 kHz, diâmetro da sonda de 13 mm e potência total variável de 750 W. A intensidade da potência aplicada é regulada pela amplitude de onda estabelecida, que depende do formato e dimensões da sonda transmissora utilizada. Como forma de variar a potência, o equipamento dispõe de um comando de entrada dado em porcentagem da energia máxima oferecida pelo equipamento. Segundo dados fornecidos pelo fabricante, para a sonda de 13 mm de diâmetro, a potência máxima (100 %) do equipamento utilizado neste trabalho corresponde à amplitude da onda de 114 μm . A Figura 3.2 mostra o aparato experimental utilizado para a realização das extrações.

Figura 3.2 Aparato experimental para extração de compostos fenólicos da torta de semente de girassol e canola. Fonte: Autor.



Os seguintes fatores podem ser variados: temperatura, tempo, concentração de etanol, massa de amostra e volume de solvente utilizado e a potência de ultrassom aplicada. Inicialmente, foi medido o volume de solvente a utilizar, colocado na célula extratora e aguardado até a estabilização da temperatura de extração; em seguida, a amostra foi inserida e a sonda submersa 1 cm na solução. Após transcorrido o tempo de extração, alíquotas de 2 mL de amostra foram coletadas e centrifugadas (Minispin®, Eppendorf, Westbury, NY, USA) a 12.100 g por 2 minutos; o sobrenadante (extrato fenólico) foi coletado e transferido para um Eppendorf, o qual foi armazenado refrigerado até a realização das análises.

3.4 Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos do girassol

3.4.1 Experimentos preliminares

Experimentos iniciais foram realizados para determinação de alguns parâmetros de extração como tempo de pré-tratamento de ultrassom, faixas adequadas de temperatura, concentração de etanol e potência de ultrassom para posterior otimização em relação à extração dos compostos fenólicos.

Para a extração dos compostos fenólicos da torta de girassol, foram pesados 10 g de amostra e medidos 100 mL de solvente com concentração fixa de 45 % de etanol em água. O processo de extração foi realizado por um tempo total de 15 min e alíquotas foram retiradas para análise após 1, 3, 6, 10 e 15 min. Nos experimentos de EAU, o equipamento foi utilizado nos 10 primeiros minutos de processo, enquanto que, nos experimentos controle, o ultrassom não foi utilizado. As temperaturas testadas foram de 30 e 60 °C e as amplitudes de ultrassom de 0, 28,5, 57 e 114 μm e que corresponderam 0, 13, 20 e 64 W/cm^2 de potência de ultrassom dissipada medida pelo método calorimétrico.

3.4.2 Extração exaustiva

Para fim de comparação e análise da eficiência das extrações, foi realizada uma extração exaustiva, onde se objetivou obter uma quantificação total dos compostos fenólicos presentes nas tortas. Este procedimento foi realizado de acordo com Rodrigues (2004) com algumas modificações. 2,5 g de amostra foram pesados num tubo Falcon de 50 mL, adicionados de 25 mL de solução aquosa de etanol a 45 % (v/v) e extraído por vortex durante 5 min, seguido por centrifugação (Sigma Laborzentrifugen GmbH, modelo 2-16 KL, Alemanha) a 4757 g durante 10 minutos e a 10 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um balão volumétrico de 200 mL e o resíduo sólido foi novamente submetido a extração com 25 mL de solvente para extração. Após sete re-extrações, o volume do frasco foi completado com a solução de extração. O extrato resultante obtido foi utilizado para determinação dos compostos fenólicos totais por espectrofotometria e para a determinação do perfil de compostos fenólicos por HPLC-DAD-MSⁿ.

3.4.3 Planejamento experimental e análise estatística

Para a avaliação da influência das três variáveis independentes nos resultados obtidos referentes à concentração de fenólicos no extrato, um planejamento experimental foi realizado. As variáveis analisadas foram: temperatura de extração (T), concentração de etanol em água da solução extratora (EtOH) e amplitude de ultrassom (AU). O planejamento dos experimentos foi realizado através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Para se obter a condição ótima de extração, utilizou-se um fatorial completo 2^3 com seis pontos axiais e seis pontos centrais. A Tabela 3.1 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de processo para otimização da extração

dos compostos fenólicos da torta de girassol. As faixas de valores dos fatores utilizados para otimização foram escolhidas com base no experimento preliminar.

Tabela 3.1. Valores codificados e originais das variáveis de estudo, concentração de etanol, temperatura e amplitude de ultrassom.

Variáveis		Níveis codificados				
		$-\alpha$ (-1.68)	-1	0	1	$+\alpha$ (+1.68)
		Níveis originais				
EtOH (%)	(X1)	0	17	43	68	85
T (°C)	(X2)	20	30	45	60	70
AU (µm)	(X3)	0	16	40	64	80

Devido ao limite mínimo do equipamento ser de 22,8 µm, este valor de amplitude foi utilizado em substituição a 16 µm. As amplitudes de ultrassom aplicadas de 22,8, 40, 64 e 80 µm correspondem a 11, 14, 30 e 43 W/cm² da intensidade de ultrassom dissipada (UI) determinado pelo método calorimétrico, respectivamente. Os extratos fenólicos foram obtidos para análise de compostos fenólicos totais (CFT) e ácido clorogênico (ACG) após 1, 3 e 15 minutos de extração. O pré-tratamento com ultrassom foi realizado durante 3 minutos e a difusão continuada até o tempo de 15 minutos. O planejamento experimental foi conduzido de forma aleatória.

Para análise dos resultados utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) com o auxílio do software Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, United States). Para previsão das respostas, os dados experimentais referentes aos CFT (mg AGE/100 g b.s.) e ACG (mg ACG/100 g b.s.) foram utilizados para construção de um modelo polinomial de segunda ordem representado pela Equação 3.4.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (3.4)$$

Y é a variável de resposta, b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} são os coeficientes de regressão das variáveis para os termos de intersecção, linear, quadrático e interação, respectivamente, X_i e X_j são as variáveis independentes. O ajuste da equação foi analisado pelo coeficiente de determinação R^2 , e a significância estatística foi conferida através da análise de variância. Termos com baixa significância ($p > 0,05$) foram removidos do modelo final. O erro médio do modelo foi calculado através da Equação 3.5.

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

sendo, E o erro médio, n o número de dados experimentais, y_{exp} os dados experimentais e y_{pred} os valores preditos pelo modelo.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada resposta e para avaliação entre as diferenças entre os tratamentos, utilizou-se o teste de diferenças entre médias de Tukey com significância estatística de 0,05.

3.4.4 *Determinação dos compostos fenólicos totais*

O teor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de extrato fenólico foi determinado pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, utilizando o ácido gálico como padrão (Waterhouse, 2001; 2002). O método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* é baseado na redução química dos óxidos de tungstênio e molibdênio, que apresentam coloração azul e têm alta absorção da luz. A absorvância máxima da mistura desses óxidos se dá no comprimento de onda (λ) de 765 nm, sendo a intensidade da absorção de luz nesse λ proporcional à concentração de fenólicos (Waterhouse, 2002).

A metodologia utilizada para quantificação de compostos fenólicos totais neste trabalho foi adaptada de Waterhouse (2002). Previamente ao procedimento de preparo da reação colorimétrica, a amostra de extrato fenólico foi diluída em 1:1 em água destilada para diminuir a concentração do extrato a analisar e obter absorvância menores que 1. Para avaliação dos compostos fenólicos presentes na amostra, foram pipetados 40 μ L de extrato ou padrão para um tubo Falcon de 15 mL, adicionado de 3,2 mL de água destilada e 200 μ L do reagente *Folin-Ciocalteu*; a mistura foi levemente agitada e colocada ao abrigo de luz por 5 minutos. Após transcorrido esse tempo, foram adicionados 600 μ L de uma solução saturada de carbonato de sódio, agitada em *vortex* (Phoenix Luferco model AP 56, Brasil) e deixada ao abrigo da luz na temperatura ambiente por uma hora. Por fim, as amostras foram transferidas para cubetas de plástico para realização das leituras de absorvância em espectrofotômetro (UV 1600, PG Instruments, Brasil) no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos em mg do composto fenólico padrão de equivalência por 100 g de amostra em base seca. Para evitar a leitura de compostos interferentes, um branco foi preparado seguindo os mesmos procedimentos para preparação da amostra, somente substituindo a amostra por água destilada.

Para quantificação dos compostos fenólicos totais foi utilizada uma curva padrão de calibração, elaborada relacionando o sinal de resposta (absorvância) com concentrações conhecidas do padrão ácido gálico (100, 200, 400, 700, 1000 ppm). Para construção da curva de calibração foram preparadas soluções do padrão a utilizar em diferentes concentrações. As curvas foram elaboradas diversas vezes durante as análises espectrofotométricas e em todos os casos o coeficiente de determinação foi superior a 0,99.

3.5 Otimização da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos da canola

3.5.1 Preparação da amostra

A torta de canola utilizada neste trabalho foi proveniente do processo industrial de extração de óleo, após a etapa de extração por prensagem sem aplicação de solvente. A amostra de torta foi fornecida pela empresa Sementes Giovelli (Rolador, RS, Brasil). A amostra foi peneirada em granulometria de 20 mesh (0,84 mm) para homogeneização e mantida em temperatura de aproximadamente -18 °C até posterior uso.

Para caracterização da torta de canola foi determinada a umidade da amostra pelo método gravimétrico de acordo com metodologia 925.10 da AOAC (AOAC, 2005b), o conteúdo de proteína bruta através do método de Kjeldahl segundo metodologia 945.18 da AOAC (AOAC, 2005a) e teor de óleo em extrator Soxhlet de acordo com o método 996.01 da AOAC (AOAC, 2000).

3.5.2 Extração de compostos fenólicos

Experimentos iniciais foram realizados para avaliação dos efeitos da temperatura e da aplicação da tecnologia de ultrassom como auxiliar na extração dos compostos fenólicos da torta de semente de canola. Este estudo serviu para posterior confecção de um planejamento experimental com o objetivo de se encontrar uma condição ótima para o processo de extração. Nesta etapa, para a extração dos compostos fenólicos da torta de canola, foram pesados 10 g de amostra e medidos 100 mL de solvente com concentração fixa de 45 % de etanol em água.

O processo de extração foi realizado por um tempo total de 15 min e alíquotas foram retiradas para análise após 1, 3, 5, 8, 11 e 15 min. Nos experimentos de extração assistida por ultrassom, o equipamento foi utilizado nos 15 minutos de processo, enquanto que, nos experimentos controle, o ultrassom não foi utilizado. As temperaturas testadas foram de 25, 45 e 65 °C e a amplitudes de ultrassom de 85 µm e que correspondem 73 W/cm² de potência de ultrassom dissipada medida pelo método calorimétrico de acordo com Contamine *et al.* (1995).

A aplicação do ultrassom foi realizada por um equipamento do tipo sonda (VC 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA) com frequência fixa de 20 kHz, diâmetro da sonda de 13 mm e potência nominal máxima de 750 W.

Como forma de avaliar a capacidade de dissolução dos compostos fenólicos no solvente e com isso verificar a possível implementação de um processo de extração em contracorrente, extrações consecutivas foram realizadas em amostras de torta de canola diferentes utilizando um mesmo solvente. As condições de concentração de etanol e temperatura de extração escolhidas foram as condições ótimas segundo o modelo obtido neste trabalho 65 °C e 35 % de etanol em água; a razão de volume de solvente por massa de amostra escolhida foi a do ponto central de 12,5 em cada

estágio. Neste experimento foram analisadas as concentrações do extrato após cada novo estágio de extração.

3.5.3 *Determinação dos compostos fenólicos totais*

O teor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de extrato fenólico foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton *et al.* (1999) com algumas modificações. Uma mistura de água destilada, extrato de torta de canola, reagente de Folin-Ciocalteu (5 %, v/v) e tampão de carbonato de sódio (3 %, p/v) em um volume final de 2000 µL foi colocada em tubos de ensaio. Após 1 h de reação ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em 765 nm. A quantificação foi realizada utilizando curvas construídas com ácido gálico na faixa de 10 a 90 µg/mL e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de torta de sementes de canola em base seca (mg EAG/100 g b.s.).

3.5.4 *Análise qualitativa e quantitativa do extrato fenólico da canola*

O extrato fenólico da torta de canola foi analisado qualitativamente utilizando HPLC-DAD-MS/MS visando identificar individualmente alguns dos compostos fenólicos presentes na amostra. Esta análise qualitativa foi realizada em parceria com um aluno de pós-doutorado do grupo de pesquisa deste laboratório e a metodologia de análise pode ser encontrada com mais detalhes nos materiais e métodos do Artigo 2 da Seção 4.2 deste trabalho.

As análises quantitativas foram realizadas em um HPLC Agilent (Santa Clara, Califórnia, EUA) equipado com bomba quaternária, desgaseificador on-line, amostrador automático e forno de coluna conectados em série a um detector de arranjo de diodos. Os extratos etanólicos, não purificados por SPE, foram diluídos em água acidificada (0,5 % v/v de ácido fórmico) e filtrados através de uma membrana de PVDF de 0,22 µm antes da injeção no HPLC-DAD. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas na identificação e os espectros UV-vis foram obtidos entre 200 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados em 325 nm. Os compostos fenólicos foram quantificados por HPLC-DAD utilizando uma curva analítica de oito pontos de ácido trans-sinápico (0,04 - 68 µg/mL).

3.5.5 *Planejamento experimental e análise estatística*

Para a avaliação da influência das três variáveis independentes nos resultados obtidos referentes à concentração de fenólicos no extrato foi realizado um planejamento experimental. As variáveis analisadas foram: temperatura de extração (T), concentração de etanol em água da solução extratora (EtOH) e a razão de amostra/solvente (Ratio). O planejamento dos experimentos foi realizado através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Para se obter a condição ótima de extração, utilizou-se um fatorial completo 2^3 com seis pontos axiais e seis pontos centrais. A Tabela 3.2 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de processo para otimização

da extração dos compostos fenólicos da torta de girassol. As faixas de valores dos fatores utilizados para otimização foram escolhidas com base no experimento preliminar.

Tabela 3.2 Valores codificados e originais das variáveis de estudo, concentração de etanol, temperatura e ratio.

Variáveis		Níveis codificados				
		$-\alpha$ (-1.68)	-1	0	1	$+\alpha$ (+1.68)
		Níveis originais				
EtOH* (v/v) (%)	(X1)	0	17	43	68	85
Temperatura (°C)	(X2)	20	30	45	60	70
Ratio* (g/100 mL)	(X3)	5	8	12,5	17,5	20

* EtOH – Concentração de etanol em água; Ratio - Razão massa de amostra por volume de solvente

Os extratos fenólicos foram obtidos para a análise de compostos fenólicos totais (CFT) após 3 e 12 minutos de extração. O planejamento experimental foi conduzido de forma aleatória para minimizar possíveis erros experimentais.

Para análise dos resultados utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) com o software Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, United States). Para predição das respostas, os dados experimentais referentes aos CFT (mg EAG/100 g b.s.) foram utilizados para construção de um modelo polinomial de segunda ordem representado pela Equação 3.6.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i X_i + \sum_{i=1}^5 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 b_{ij} X_i X_j \quad (3.6)$$

Onde Y é a variável de resposta, b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} , são os coeficientes de regressão das variáveis para os termos de intersecção, linear, quadrático e interação, respectivamente, X_i e X_j são as variáveis independentes. O ajuste da equação foi analisado pelo coeficiente de determinação R^2 , e a significância estatística foi conferida através do F-test. O erro médio do modelo foi calculado através da Equação 3.7.

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{exp} - y_{pred}|}{y_{exp}} \quad (3.7)$$

sendo, E o erro médio, n o número de dados experimentais, y_{exp} os dados experimentais e y_{pred} os valores preditos pelo modelo.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada resposta e para avaliação entre as diferenças entre os tratamentos, utilizou-se o teste de diferenças entre médias de Tukey com significância estatística de 0,05. Termos com baixa significância foram removidos do modelo final.

3.6 Aplicação do extrato fenólico como antioxidante em óleo vegetal

O óleo utilizado para o desenvolvimento deste trabalho foi o óleo vegetal extraído da soja com utilização de solvente hexano e somente degomado. Este óleo foi fornecido pela empresa Oleoplan

S.A., situada na cidade de Veranópolis, cuja principal atividade é a extração do óleo de soja para produção de biodiesel. O óleo estava isento de qualquer tipo de antioxidantes.

3.6.1 Obtenção do extrato fenólico

Os compostos fenólicos utilizados como antioxidantes naturais neste trabalho foram extraídos da torta da semente de girassol, utilizando as condições otimizadas obtidas no estudo realizado previamente neste trabalho (Zardo *et al.*, 2017). No processo de extração, 10 g da torta de girassol foram mantidas sob agitação constante em solução de 43 % de etanol em água, à temperatura de 70 °C durante 1 min de pré-tratamento de ultrassom e mais 9 minutos de difusão. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador (Fisatom 804, Fisatom, SP, Brazil) até atingir concentração de compostos fenólicos totais de 10 g de EAG/ L de extrato, para posterior aplicação no óleo.

3.6.2 Teste de estocagem acelerada

Para a realização do teste de estocagem acelerada, a estabilidade oxidativa de amostras de óleo de soja adicionadas de diferentes concentrações de antioxidantes naturais e sintéticos foram comparadas após serem submetidas a tratamento térmico.

No experimento realizado, óleos, contendo seis diferentes concentrações de antioxidantes foram submetidos ao teste em estufa: óleo de soja sem adição de antioxidante – controle; óleo de soja com adição de 100 ppm de antioxidante sintético BHT (100 ppm BHT); óleo de soja com adição de 50 ppm de antioxidante sintético BHT e 50 ppm de compostos fenólicos totais (50 ppm BHT/50 ppm CFT); óleo de soja com adição de 100, 500 e 1000 ppm de compostos fenólicos totais (100 ppm CFT), (500 ppm CFT) e (1000 ppm CFT).

Cada tratamento foi realizado colocando aproximadamente 75 g de óleo em cápsulas abertas com 7 cm de diâmetro. Em seguida foram adicionadas as respectivas quantidades de compostos fenólicos utilizando-se o extrato fenólico com concentração de 10 g EAG/L. Para adição do antioxidante sintético BHT, dissolveu-se o produto em etanol a fim de se obter uma solução de concentração conhecida a ser adicionada ao óleo na quantidade necessária. Para melhor homogeneização dos extratos no óleo, cada amostra foi submetida a 30 segundos de tratamento com ultrassom (VC 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA).

Após preparo dos tratamentos, em duplicata, as amostras foram colocadas em estufa e mantidas na temperatura controlada de 65 ± 2 °C por 14 dias. Alíquotas das amostras foram recolhidas em frascos âmbar após os dias 1, 3, 5, 9 e 14 e armazenadas em temperatura de 5 °C para posterior análise.

3.6.3 Teste de termoxidação

O teste de termoxidação consistiu em colocar em estufa amostras de óleo à temperatura de 180 ± 2 °C. O procedimento foi realizado baseado no autor Abd-Elghany *et al.* (2010). Os teores de antioxidantes utilizados foram os mesmos dos avaliados durante a estocagem acelerada, com

exceção do tratamento com 1000 ppm de CFT. Optou-se por não realizar este tratamento em função dos resultados obtidos no teste de estocagem acelerada.

Foi avaliada a evolução da oxidação das amostras após os tempos de 30, 90, 150 e 210 min de aquecimento. As amostras foram recolhidas após cada intervalo de tempo, colocadas em frasco âmbar, resfriadas inicialmente à temperatura ambiente e armazenadas em geladeira à 5 °C até a análise.

3.6.4 *Estocagem em temperatura ambiente*

Este teste teve por objetivo avaliar a oxidação do óleo de soja em condições de prateleira. Amostras de óleo foram colocadas em frascos de vidro fechados e protegidos da luz em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C. Quatro tratamentos foram realizados: controle – sem aplicação de extrato; 100 ppm de BHT; 100 e 500 ppm de CFT.

Análises mensais para avaliar o grau de oxidação das amostras foram realizadas no decorrer de 232 dias.

3.6.5 *Índice de peróxidos*

A metodologia de análise do índice de peróxidos foi baseado no método da AOCS Cd 8-53 (American Oil Chemists, 1993). Esta análise consiste em dissolver 2,5 g de óleo em 15 mL de solução de ácido acético:clorofórmio (3:2) e adicionar 0,6 mL de solução saturada de iodeto de potássio, seguida de repouso ao abrigo de luz por 5 minutos.

Após transcorrido o tempo de repouso, foram adicionados 45 mL de água destilada e 0,6 mL de solução indicadora de amido 1 % em água, seguida de titulação com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N até o desaparecimento da cor azul.

Através do volume de titulante gasto, o índice de peróxidos em meq O₂/kg de óleo, foi calculado através da Equação 3.8:

$$IP \text{ (meq O}_2\text{/ kg óleo)} = \frac{(A-B) \times M \times 1000}{m} \quad (3.8)$$

sendo, A o volume de Na₂SO₃ gasto na titulação da amostra, em mL; B o volume de Na₂SO₃ gasto na titulação do branco, em mL; M a molaridade exata da solução de Na₂SO₃ e m a massa de amostra, em gramas. As análises foram realizadas em duplicata.

3.6.6 *Índice de p-anisidina*

O índice de p-anisidina foi determinado segundo o método padrão da AOCS Cd 18-90 (American Oil Chemists e Firestone, 1998) com algumas modificações. Primeiramente, pesaram-se 500 mg de cada amostra de óleo para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com isoctano, obtendo-se a solução A. A partir desta solução, mediu-se sua absorvância no comprimento de onda de 350 nm contra um branco de isoctano, obtendo-se a absorvância A₁. Uma alíquota de 5 mL da solução A, assim como 5 mL de isoctano foram transferidos para 2 tubos de

ensaio distintos e, a estes, foram adicionados 1 mL de solução de p-anisidina 0,25 % m/v em ácido acético (0,125 g de p-anisidina em 50 mL de ácido acético glacial). Após 10 minutos, a absorbância A_2 foi medida em 350 nm, considerando o isoctano contendo p-anisidina como branco. O índice de p-anisidina foi calculado de acordo com a Equação 3.9:

$$IA = 10 \times \frac{1,2 \times A_2 - A_1}{m} \quad (3.9)$$

3.6.7 Índice de dienos e trienos conjugados

Para determinação do índice de dienos e trienos conjugados, utilizou-se metodologia baseada na AOCS Ti 1a-64 (American Oil Chemists, 1993) que consiste na diluição do óleo em solvente adequado, seguido de medida da absorbância em espectrofotômetro. A partir de rediluições da solução A com isoctano, foram medidas as absorbâncias nos comprimentos de onda de 232 nm para dienos e 270 nm para trienos contra um branco de isoctano, de modo que as absorbâncias ficassem dentro da faixa ideal de leitura de 0,2 a 0,8.

Para medição da absorbância, utilizou-se cubetas de quartzo e espectrofotômetro (PG Instruments Ltd, modelo T80 UV/VIS Spectrometer). As análises foram feitas em duplicata, e a quantidade de dienos e trienos conjugados de cada amostra foi avaliada através da Equação 3.10:

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{c \times l} \quad (3.10)$$

sendo, E a extinção específica ou absorvidade no comprimento de onda λ , A a absorbância no comprimento de onda λ , c a concentração da solução em g/mL e l o caminho óptico da cubeta em cm.

3.7 Aplicação do extrato fenólico como antifúngico

3.7.1 Obtenção do extrato fenólico

Os compostos fenólicos utilizados como antifúngico neste trabalho foram obtidos da mesma forma que para aplicação em óleos, conforme Seção 3.6.1, sendo que para essa aplicação o extrato foi concentrado até atingir a concentração de 41 g de EAG/L de extrato.

3.7.2 Capacidade inibidora de germinação de esporos fúngicos

O extrato de girassol foi testado quanto à capacidade de inibir a germinação de esporos fúngicos através da técnica descrita por Martínez *et al.* (2017), com algumas modificações. A atividade foi realizada contra os fungos *Aspergillus niger* e *A. flavus*, os quais estão depositados no banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, ICTA - UFRGS.

Uma suspensão de 10^4 esporos/mL de cada fungo foi inoculada em lâminas côncavas contendo caldo YES (extrato de levedura 2 %, sacarose 20 %, pH 6.5) e diferentes concentrações de compostos fenólicos totais (25, 15 e 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), para obter um volume final de 100 μL . As lâminas foram colocadas em placas de Petri e incubadas a 25 °C durante 36 horas sob umidade relativa

controlada (80-90 %). Como controle, o extrato foi substituído pelo mesmo volume de água. Os esporos foram observados em microscópio ótico e aqueles que apresentaram comprimento dos tubos germinativos maior que seus raios foram considerados germinados. Foram realizadas quatro contagens de 100 esporos por cada repetição.

3.7.3 Efeito do extrato fenólico sobre o crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger*

O preparo das amostras foi realizado segundo metodologia descrita por Mossini *et al.* (2009). Uma suspensão de esporos do fungo *Aspergillus niger* foi inoculada no centro das placas de *Petri* em meio BDA e diferentes concentrações de compostos fenólicos totais (5 e 25 mg/mL), para obter um volume final de 25 mL. O controle foi preparado substituindo o volume de extrato pelo mesmo volume de água. As placas de *Petri* foram incubadas a 25 °C durante 6 dias. O crescimento micelial foi acompanhado diariamente através da medição do diâmetro das colônias durante todo o tempo de incubação. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

Capítulo 4. Resultados e Discussão

Neste Capítulo serão apresentados os resultados e discussão do presente estudo estando estruturada no formato de três artigos. O primeiro artigo está relacionado à otimização da extração de compostos fenólicos da torta de girassol. Este artigo está publicado na revista “*Waste and Biomass Valorization*”. O segundo artigo é referente à identificação dos compostos fenólicos, bem como à otimização da extração desses compostos da torta de canola. Este artigo foi submetido à revista “*Food and Bioproducts Processing*” e aguarda resposta. No terceiro artigo foram avaliadas as aplicações *in vitro* do extrato fenólico obtido das extrações como estabilizante em óleos e como agente antifúngico. O terceiro artigo ainda não está completamente finalizado, pois algumas análises referentes ao estudo de aplicação do extrato como agente antifúngico necessitam ser revisadas.

4.1 Artigo 1 - Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from sunflower seed cake using response surface methodology

Abstract: Sunflower seed cake is a by-product of the sunflower oil industry, which is a valuable source of protein for animal feed. The presence of phenolic compounds significantly affects the sunflower proteins quality to animal feeding, decreasing its commercial value. Seeking to valorize this by-product, by improving the nutritive potential of the sunflower cake and getting an extract rich in antioxidants, the present study aims to maximize the phenolic compounds extraction from sunflower seed cake. The following parameters were evaluated: temperature (20-70 °C), ethanol concentration (0-85 %) and ultrasound amplitude (0-80 μ m). Response surface methodology was employed to optimize the extraction factors and a second order polynomial model provided a satisfactory fit to the experimental data. The response variables analyzed were the total phenolic compounds (TPC) and the chlorogenic acid (CGA) concentrations, which ranged between 751 to 1,851 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g and 609 to 1,635 mg CGA/100 g of sunflower seed cake in dry basis, respectively. The temperature and ethanol concentration showed the highest effect on the TPC extraction from sunflower cake. The ultrasound-assisted extraction (UAE) effect was observed only in the first minute of extraction, having no influence at longer times.

Key-words: alternative extraction technologies, recovery of by-products, *Helianthus annuus L.*, antinutrients, Chlorogenic acid.

4.1.1 Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus L.*) is one of the world's most important oilseed crops. The sunflower oil extraction generates a large amount of by-products, which could be of interest to the industry. The sunflower meal or cake is the major by-product of the oil production; it has a high protein content, ranging from 40 % to 50 % of the defatted seeds, depending on the type of oil extraction process, making this meal an attractive protein source (González-Pérez *et al.*, 2002). Oilseed cakes are nowadays predominantly used as animal feed supplements (Kachrimanidou *et al.*, 2015).

In addition to the high protein content, the sunflower meal is rich in phenolic compounds (1 – 4 % of the total mass), being the chlorogenic acid (CGA) the predominant phenolic (Weisz *et al.*, 2009b). The presence of high amounts of phenolic compounds significantly affects the quality of the sunflower proteins, hindering their utilization as an animal feed. The main changes caused by the protein-phenolic interactions are basically related with their structure, digestibility, functional and nutritional properties. These interactions increase the proteins molecular weight and solubility, and also lead to some undesirable changes in color and taste (Ozidal *et al.*, 2013). The interactions become irreversible when, under alkaline conditions or by polyphenol oxidase enzyme action, phenolic compounds are oxidized to highly reactive o-quinones which can interact with functional protein groups, such as amines, thiols, thioethers, indole, imidazole, and disulfide groups, resulting in browning reactions. These reactions destroy essential amino acids, impair digestibility and nutritional quality and may also lead to the formation of toxic compounds (Pedrosa *et al.*, 2000; Weisz *et al.*, 2009b).

In contrast to the undesirable effects of phenolic compounds above described, many studies have shown that numerous phenolics, such as caffeic, chlorogenic and ferulic acids, have a high antioxidative potential. These compounds are associated with many health promoting effects that can possibly prevent diseases caused by oxidative stress (Maier *et al.*, 2009). Phenolic compounds extracted from food processing by-products have been suggested as valuable natural alternatives to synthetic antioxidants, increasing the sustainability in food production.

The removal of total phenolic compounds (TPC) is, therefore, one of the main issues concerning the production of more attractive and valorated sunflower protein products (González-Pérez e Vereijken, 2007). The traditional extraction techniques usually require long extraction times, resulting in a severe risk of thermal degradation of most of the phyto-constituents (Taha *et al.*, 2011). In order to decrease the solvent consumption, shorten the extraction time, increase the extraction yield, and enhance the quality and purity of extracts, various novel extraction techniques have been applied, including ultrasound-assisted extraction (UAE) (Wang *et al.*, 2008).

UAE is an inexpensive, simple and efficient alternative method of industrial relevance to improve the extraction process of bioactive compounds (Soria e Villamiel, 2010b). The main effect

of ultrasound on the phenolic compounds extraction is attributed to the acoustic cavitations produced in the solvent by the passage of an ultrasonic wave. Some mechanical effects involved in ultrasound, such as turbulence and cell disruption, allow a greater penetration of solvent into the sample matrix, increasing the contact surface area between solid and liquid phases, facilitating the release of interesting extractable compounds (Rostagno *et al.*, 2003; Chemat *et al.*, 2011).

Many studies have been done using ultrasound technology to enhance the extraction of bioactive components from plant material. Vilku *et al.* (2008) reported in a review several applications of ultrasound assisted extraction in the food industries to increase the rate of extraction, achieve both reduction in extraction time and higher processing throughput.

The present work aimed to analyze the ultrasound assisted extraction technology utilization to improve the total phenolic compounds and chlorogenic acid extraction from sunflower seed cake. The ultrasound-assisted extraction parameters: solvent, extraction temperature and ultrasound amplitude, were optimized using response surface methodology (RSM).

4.1.2 Material and methods

4.1.2.1 Plant material

Sunflower seed cake was provided by Pазze Indústria de Alimentos Ltda (Panambi, Brazil) and was generated by cold pressing of partially dehulled and grounded sunflower seeds for oil extraction. The cake was grounded in a mill (MF 10, IKA®, Werke, Staufen, Germany) and passed through a 20 mesh (0.85 mm) sieve to homogenize the sample. The sunflower seed cake was kept in a sealed plastic bag and stored at 5 °C until use. To characterize the sunflower seed cake, the following analysis were done: the moisture of the sample was determined by the gravimetric method according to 925.10 AOAC method (Aoac, 2005b), the protein content was determined through the Kjeldahl method according to 945.18 AOAC method (Aoac, 2005a) and the oil content by the Soxhlet extractor according to the 996.01 AOAC method (Aoac, 2000).

4.1.2.2 Sonication treatment

Ultrasound-assisted extraction (UAE) was performed using a 750 W ultrasonic processor (VC 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA) with a 13 mm diameter probe and variable input power at a constant frequency of 20 kHz was used for sonication. UAE was carried out using 10 g of grounded sample and 100 mL of solvent in a double-layered glass cell. Experiments were performed under agitation and the ultrasound probe was submerged 10 mm into the solvent. The cell was connected to heating/cooling water baths (LAUDA LCKD 4907 Model ALPHA RA 8, Lauda, Brazil) to control the temperature. The energy input was controlled by setting the ultrasonic power from 0 to 100 % of the total equipment power, where 100 % correspond to the ultrasound

amplitude (UA) of 114 μm . The ultrasonic dissipated power (P_{diss}) was determined by the calorimetric method using water according to Contamine *et al.* (1995) with some modifications:

$$P_{diss} = mC_p\Delta T/\Delta t \quad (4.1)$$

where P_{diss} , m , C_p , ΔT and Δt are the dissipated power (W), water mass (g), water specific heat (J/g °C), temperature increase (°C) and time during the increase of the temperature (s), respectively. The ultrasonic intensity power (UI) dissipated from the probe tip with diameter D is given by Eq. (4.2):

$$UI = 4P_{diss}/\pi D^2 \quad (4.2)$$

4.1.2.3 Preliminary analysis

An initial kinetic experiment was conducted to determine the appropriate ranges of the temperature and ultrasound amplitude to be used for further optimization of total phenolic compounds (TPC) and chlorogenic acid (CGA) extraction. Through these preliminary tests was also possible to determine the adequate extraction time to reach the equilibrium. The extraction process was performed over 15 min and aliquots were taken for analysis after 1, 3, 6, 10 and 15 min. Ultrasound equipment was used in the first 10 min of the process and then switched off until to complete the rest of the extraction time. In order to compare the extraction ability, a control extraction was conducted in the same bath where the ultrasound-assisted extraction was performed, but with the ultrasound machine switched off.

The ultrasound amplitudes (UA) applied were 0 (control) 28.5, 57 and 114 μm which corresponded to 13, 20 and 64 W/cm^2 of ultrasound intensity dissipated power (UI) determined by calorimetric method. The solvent used in these experiments was a 45 % ethanol/water solution. Ethanol was chosen as a solvent because its low toxicity and easy recovery by reduced pressure distillation. Different temperatures were tested (30 and 60 °C) during 15 minutes of extraction time. The extractions were performed in duplicate and a statistical analysis was performed to compare the results.

After each extraction time analyzed, 2 mL of sample was collected and centrifuged at 12,100 g for 2 min (Minispin®, Eppendorf, Westbury, NY, USA); the supernatant was collected and transferred into an Eppendorf to further TPC and CGA analysis.

4.1.2.4 Experimental design and statistical analysis

To evaluate the performance of total phenolic and chlorogenic acid extraction, a central composite rotatable design (CCRD) and response surface methodology (RSM) was applied. Three parameters were studied: ultrasound amplitude (UA), temperature (T) and ethanol concentration (EtOH). A 2^3 full factorial design with six axial and six central points design was applied to analyze the optimal extraction condition. The range of the experimental design factors were chosen based

on preliminary experiment. The coded levels and natural levels of the variables are showed in Table 4.1.

Table 4.1 Variables and their coded of the experimental design.

Variable		Coded levels				
		$-\alpha$ (-1.68)	-1	0	1	$+\alpha$ (+1.68)
		Natural levels				
EtOH* (%)	(X1)	0	17	43	68	85
T* (°C)	(X2)	20	30	45	60	70
UA* (µm)	(X3)	0	16	40	64	80

*EtOH – Ethanol concentration in water; T – Temperature; UA – Ultrasound amplitude

The minimum value for the amplitude that can be set in the equipment is 23 µm. So, this value is used instead of the minimum value specified in the experimental design (16 µm). The applied ultrasonic amplitudes of 23, 40, 64 e 80 µm correspond to 11, 14, 30 and 43 W/cm² of ultrasound intensity dissipated power (UI) determined by calorimetric method.

The samples were collected after 1, 3 and 15 minutes of extraction. The ultrasound treatment was applied only in the first 3 minutes, and the diffusion process continued until a total time of 15 minutes. The complete design was carried out in random order to minimize error due to extraneous factors. The complete set of experiments is presented in Table 4.2, which is going to be discussed later in the results section.

To predict the responses, all the experimental data for TPC (mg GAE/ 100g db) and CGA (mg CGA/100 g db) were fitted using a second order polynomial model (Equation 4.3). Multiple linear regression analysis was performed using software Statistica® 7 (Statsoft, 2012).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i X_i + \sum_{i=1}^5 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 b_{ij} X_i X_j \quad (4.3)$$

where Y is the predicted response, b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} are the regression coefficients of variables for intercept, linear, quadratic and interaction terms, respectively, and X_i and X_j are the independent variables. The adequacy of the model was evaluated by the coefficient of determination R^2 , and its statistical significance was checked using an F-test. The average error was determined comparing the experimental data with the values predicted by regression models using Eq. (4.4).

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{exp} - y_{pred}|}{y_{exp}} \quad (4.4)$$

where, E is the average error, n is the number of experimental data points, y_{exp} is the experimental value and y_{pred} is the value predicted by the model.

An analysis of variance (ANOVA) was performed for each response and the p-values, under a level of significance of 0.95. Less significance terms were removed from the final models. The significance of the regression was also evaluated using ANOVA.

4.1.2.5 *Determination of total phenolic content*

Total phenolic content of the extract was determined through the Folin-Ciocalteu method using gallic acid as the standard (Waterhouse, 2001). Briefly, 40 μL of an appropriate dilution of the extracts or the standard was diluted in 3.2 mL of distilled water and 200 μL of Folin-Ciocalteu reagent. The mixture was kept protected from light for 5 minutes and 600 μL of a sodium carbonate saturated solution were added. The mixture was agitated in a vortex mixer (Phoenix Lufenco model AP 56, Brazil) and left protected from light and at room temperature for 1 hour. The samples were transferred to polystyrene cuvettes and the absorbance was read in a spectrophotometer (UV 1600, PG Instruments, Brazil) at a wavelength of 765 nm. The results were expressed as mg of GAE (gallic acid equivalent) per 100 g of sample on a dry weight basis (mg GAE/100 g db).

To compare and analyze the effectiveness of each test extraction, an exhaustive extraction was performed to obtain an overall quantification of the compounds in the sunflower seed cake. In this procedure, repetitive extractions from the same sample with a fresh solvent were performed, until no absorbance was detected.

4.1.2.6 *Determination of chlorogenic acid by High Performance Liquid Chromatography*

Folin-Ciocalteu method is not a specific method to determine phenolic compounds due to the fact that it can react with other reductive substances present in foods. These substances, such as proteins, are present in the sunflower cake and can interfere the results (Morelli e Prado, 2012). In the light of this interference, HPLC was used to determine the presence of chlorogenic acid, which is the predominant phenolic component present in sunflower seeds (Weisz *et al.*, 2009b).

Chlorogenic acid was analyzed according to the method of Rodrigues *et al.* (2013) with some modifications. HPLC analysis was carried out on a Perkin Elmer chromatography system equipment with a quaternary pump, a UV-Vis detector and a column oven. Separation was conducted on a reversed-phase C18 column (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, USA) (5 μm , 250 x 4.6 mm i.d.) coupled to a C18 guard column (5 μm , 15 x 3.2 mm i.d.) at a flow rate of 0.9 mL/min; the column temperature was at 29 °C. Mobile phases used consisted of water/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent B) in a linear gradient from A:B 99:1 to 65:35 in 35 min; then from 65:35 to 1:99 in 1 min. This ratio was maintained for additional 7 min. The UV-vis spectra were obtained between 200 and 600 nm and the chromatograms were analyzed at 280 and 325 nm, for CGA quantification 325 nm was used. CGA was employed as standard.

4.1.2.7 *Protein losses*

In order to investigate the loss of proteins from the sunflower seed cake to the phenolic extract, after the TPC extraction, the sunflower seed cake was dried at 60 °C for 24 h and the protein content

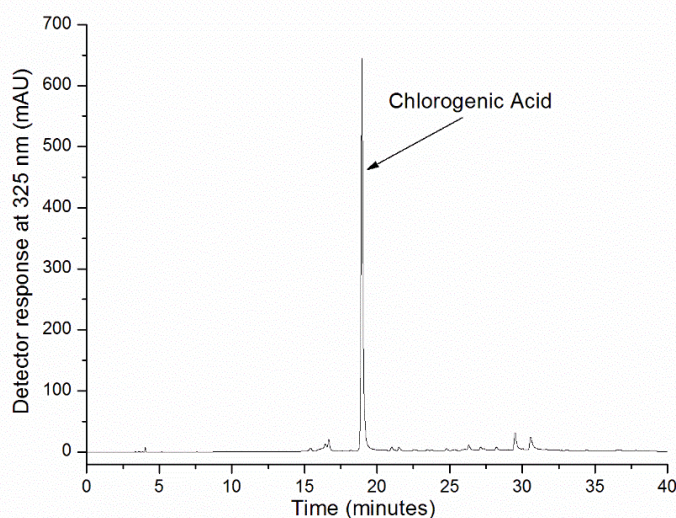
was measured. To evaluate the solvent and ultrasound application effects, four experiments were conducted. TPC extraction was performed using pure water and 43 % EtOH as solvents, assisted and not assisted by ultrasound (40 μ m of UA). The temperature was maintained constant at 45 °C during the total time extraction of 1 minute. The protein content of no treated sunflower seed cake (control) was also determined to compare and verify the protein losses. Crude protein was measured by the Kjeldahl method with a conversion factor of 6.25 and expressed as a percentage of dry basis oilseed cake (Cunnif, 1998).

4.1.3 Results and discussion

4.1.3.1 Chlorogenic acid analysis

Figure 4.1 shows the chromatogram for the sunflower seed cake phenolic extract obtained at the extraction conditions of 30 °C, without ultrasound application and after 10 min of extraction time.

Figure 4.1 HPLC chromatogram of the sunflower seed cake extract obtained at 30 °C, without ultrasound application and after 10 min of extraction time, monitored at 325 nm.

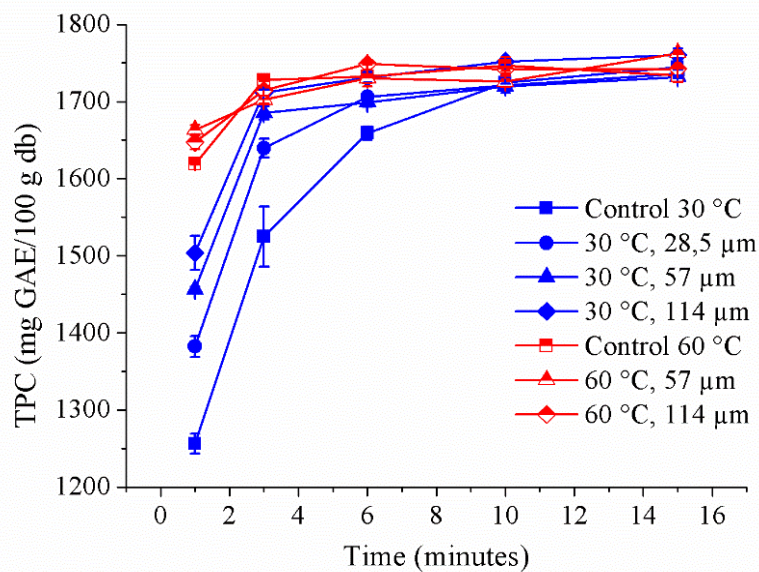


For the other conditions analysed in this study, the same phenolic profile was observed. The extract chromatogram shown in Figure 4.1 clearly demonstrates a predominant peak, approximately at 19 minutes. According to the external calibration standards, the peak can be identified as chlorogenic acid (5-o-caffeoylquinic acid). This peak represents around 75 % of the total chromatogram area, being the major phenolic compound found in sunflower seed cake, which is in agreement with the literature (Pedrosa *et al.*, 2000; Weisz *et al.*, 2009b). The chromatogram was obtained at 325 nm, which is the wavelength of maximum absorbance for the chlorogenic acid.

4.1.3.2 Preliminary Results

As mentioned in Section 4.1.2.3, preliminary experiments were conducted to choose the best conditions for the experimental design. Sunflower seed cake used presented moisture of 7.40 ± 0.05 %, protein content of 23.9 ± 0.3 % and an oil content of 8.7 ± 0.4 %. Castro *et al.* (2016) obtained similar results in their studies with sunflower seed cake, where they determined the moisture, protein and oil content as 5.56 %, 23.72% and 2.75 %, respectively. Fig. 4.2 shows the preliminary results for TPC extraction using different UA and temperatures. Experiments were performed for 15 min.

Figure 4.2 Total phenolic compounds (TPC) extraction under different conditions: preliminary results.



As can be seen in Fig. 4.2, only at the lowest tested temperature (30 °C), UAE showed an effect on the TPC extraction. At 60 °C, there were no differences between extractions with or without ultrasound application. Analyzing the results of the treatments at 30 °C, it was observed that for the treatment without the ultrasound application (Control 30 °C), the time needed to reach the extraction equilibrium was longer than the treatments with ultrasound application, suggesting a positive effect of the studied technology. Among the different tested UA, it was observed that there was no significant difference ($p > 0.05$) between the treatments at 30 °C with UA application of 57 and 144 μm for all analyzed extraction times. However, comparing these treatments with the one using 28.5 μm, there is a significantly ($p < 0.05$) higher yield at higher amplitudes in the extraction times of 1 and 3 min.

In the extraction temperature of 60 °C, no significant difference ($p > 0.05$) was observed between the extraction assays with and without ultrasound application. Moreover, when different extraction times in the same assay of 60 °C are compared, the TPC concentration obtained after 1 minute was significantly lower than the higher times, reaching the equilibrium after 3 min.

The results obtained in the initial experiments suggest that both parameters analyzed, ultrasound amplitude and temperature, have a significant influence on extraction efficiency. To further analyze this influence, a central composite design was applied, in order to optimize the extraction process of TPC and CGA components from sunflower seed cake.

4.1.3.3 Experimental design analysis

Based on the preliminary experiments, the factors ranges were determined. As discussed earlier, at 30 °C no significant difference ($p > 0.05$) was observed between the results obtained with 57 and 114 μm of UA applied (Fig. 4.2). Because of this, 80 μm was chosen as the highest limit of UA range. High extraction temperatures were avoided due to the boiling point of ethanol (78 °C) and a temperature of 70 °C was chosen for the experiments. The range of time was chosen because it is clearly seen that, after 15 minutes, the equilibrium of the extraction was reached.

Table 4.2 presents all the conditions used in the experimental design and the respective TPC and CGA results after the three extraction times (1, 3 and 15 min). Based on the results, a multiple linear regression was performed and the regression coefficients (R^2) were determined.

Table 4.2 Experimental Design (uncoded) arrangement for extraction and the responses of Total Phenolic Compounds (TPC) and Chlorogenic Acid (CGA) after extraction times of 1, 3 and 15 min.

Run	Factors			mg GAE/100 g db			mg CGA/100 g db		
	EtOH* (%)	T* (°C)	UA* (μm)	TPC	TPC	TPC	CGA	CGA	CGA
				1 min	3 min	15 min	1 min	3 min	15 min
1	17	30	23	1359.1	1487.4	1504.5	1359.3	1375.9	1494.5
2	17	30	64	1470.5	1588.1	1588.1	1460.7	1551.6	1535.0
3	17	60	23	1611.5	1642.9	1671.6	1504.8	1548.1	1517.9
4	17	60	64	1768.1	1786.2	1803.0	1542.0	1576.8	1544.6
5	68	30	23	1043.9	1403.5	1510.8	932.2	1205.0	1517.0
6	68	30	64	1205.4	1559.8	1636.0	957.1	1259.9	1440.4
7	68	60	23	1661.8	1786.9	1799.5	1439.9	1514.5	1499.7
8	68	60	64	1849.8	1870.8	1895.3	1460.8	1558.5	1581.2
9	0	45	40	1552.8	1598.9	1615.7	1504.9	1504.7	1494.9
10	85	45	40	751.0	1166.9	1309.5	608.9	816.3	1101.6
11	43	20	40	1118.7	1510.8	1619.9	1107.8	1415.4	1527.7
12	43	70	40	1851.2	1867.3	1869.1	1635.3	1645.8	1652.9
13	43	45	0	1606.4	1837.4	1848.5	1390.1	1550.4	1598.2
14	43	45	80	1760.0	1784.8	1787.3	1588.0	1598.5	1641.1
15	43	45	40	1706.5	1770.9	1767.4	1444.1	1434.5	1574.3
16	43	45	40	1712.1	1748.5	1760.4	1520.4	1613.7	1579.2
17	43	45	40	1748.5	1789.7	1798.8	1517.6	1602.1	1584.8
18	43	45	40	1778.5	1816.3	1841.5	1549.1	1600.3	1597.5
19	43	45	40	1647.83	1748.9	1756.2	1430.4	1514.7	1495.8
20	43	45	40	1758.9	1825.4	1832.4	1543.0	1604.8	1587.6

*EtOH – Ethanol concentration in water; T – Temperature; UA – Ultrasound amplitude

The R^2 for the TPC results after 1, 3 and 15 min were 0.91, 0.77 and 0.71, respectively, and for the CGA results were 0.94, 0.65 and 0.69, respectively. Considering that a regression coefficient lower than 0.80 presents a bad polynomial equation fit, therefore, only the results obtained at 1 min of extraction time were analyzed with the response surface methodology (RSM).

It can also be observed that the sunflower seed cake extract obtained after 1 min and in the different extraction conditions showed a concentration of TPC ranging from 751 to 1851 mg GAE/100 g db and of CGA from 609 to 1635 mg CGA/100 g db. The exhaustive extraction of sunflower seed cake resulted in an extract with TPC and CGA concentration of 1945 ± 5 mg GAE/100 g db and 1694 ± 42 mg CGA/100 g db, respectively. A multiple linear regression was performed to obtain a second order polynomial model (Eq. (4.3)) for these two responses. The results of the analysis of variance (ANOVA) of each factor and their interactions, the goodness of fit, and the adequacy of the models are summarized in Table 4.3.

Only the significant terms ($p < 0.05$) or the terms which presented p slightly higher than 0.05 were considered to construct the final predictive model. Both TPC and CGA responses presented satisfactory determination coefficient (R^2) values and, as a result of the low variability between the values, the lack of fit of the model was significant ($p > 0.05$) for the TPC results (Table 4.3).

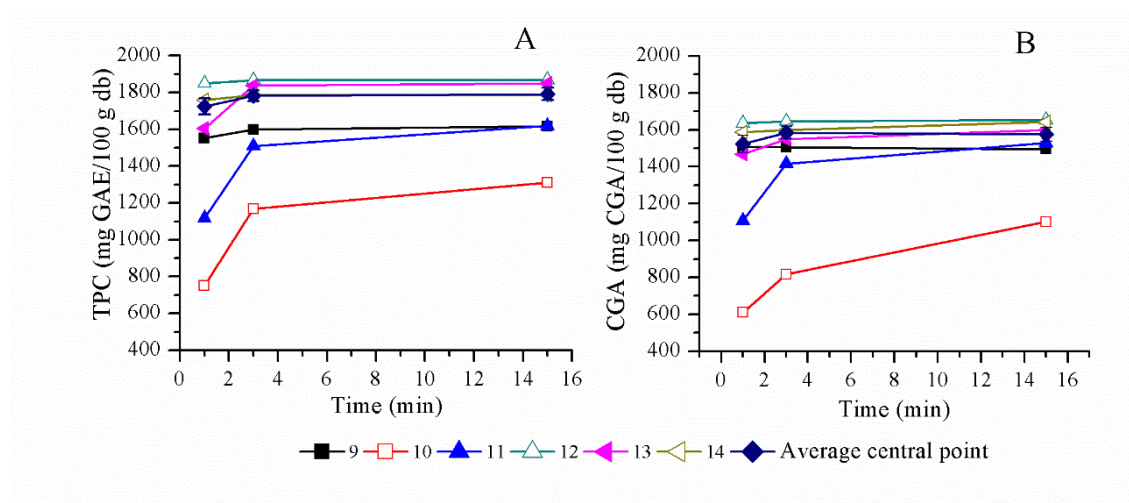
Table 4.3 Estimated coded coefficients of the fitted second order polynomial model of the Total Phenolic Compounds (TPC) and Chlorogenic Acid (CGA) results obtained after 1 min of extraction time.

Factor	TPC Coefficient	p-value	CGA Coefficient	p-value
Mean/Interc.	1732.0	< 0.0001	1508.0	< 0.0001
EtOH (%) (L)	-131.6	0.0004	-189.2	< 0.0001
EtOH (%) (Q)	-189.2	< 0.0001	-150.5	< 0.0001
T (°C) (L)	222.9	< 0.0001	155.6	< 0.0001
T (°C) (Q)	-71.4	0.022	-39.3	0.077
UA (μ m) (L)	60.7	0.038	37.7	0.077
EtOH (L) by T (L)	89.1	0.031	98.1	0.003
R^2	0.92		0.94	
Lack of fit	0.02		0.11	
Erro (%)	3.4		4.64	

*EtOH – Ethanol concentration in water; T – Temperature; UA – Ultrasound amplitude

In order to visualize the effect of the different conditions on TPC and CGA extractions, Figure 4.3 was constructed using the average results of the central points and the results of the axial points, which represent the extreme conditions (Table 4.1). The number of each curve corresponds to the experiments presented in Table 4.2.

Figure 4.3 TPC (A) and CGA (B) concentration analysis of the average results of the central points and of the results of the axial points as a function of extraction time.



The behavior of the extraction concentration observed in Fig. 4.3 (A and B) indicates, with the exception of the high EtOH concentration (85 %) (—□—10) and to the low temperature (20 °C) (—▲—11) tested, that the extraction equilibrium was reached after the extraction time of 3 min. Comparing the results between the lowest and highest parameter levels it is clearly observed for temperature (—▲—11, —△—12) and EtOH concentration (—■—9, —□—10) a high variability in the results along the 15 minutes of extraction. However, regarding the parameter UA (—◀—13, —◁—14) only after 1 minute was observed a considerable difference between the TPC and CGA concentration extracted at 0 and 80 μ m of UA. The central point conditions —◆— in 3 minutes presented a yield slightly lower than the highest temperature tested.

4.1.3.4 Response surface analysis

Based on the predicted model equation, three-dimensional response surfaces plots were constructed to demonstrate the relationships between the independent and dependent variables: Fig. 4.4 and 4.5 present the response surfaces for total phenolic compounds and chlorogenic acid extraction from sunflower seed cake, respectively. The analysis for each independent factor will be presented separately as follows.

Figure 4.4 Response surface plots of the total phenolic contents of sunflower seed cake extract as affected by ethanol concentration (EtOH), temperature and ultrasound amplitude (UA). (A) EtOH and temperature (UA 40 μm); (B) EtOH and UA (temperature 45 $^{\circ}\text{C}$); (C) temperature and UA (EtOH 43 %).

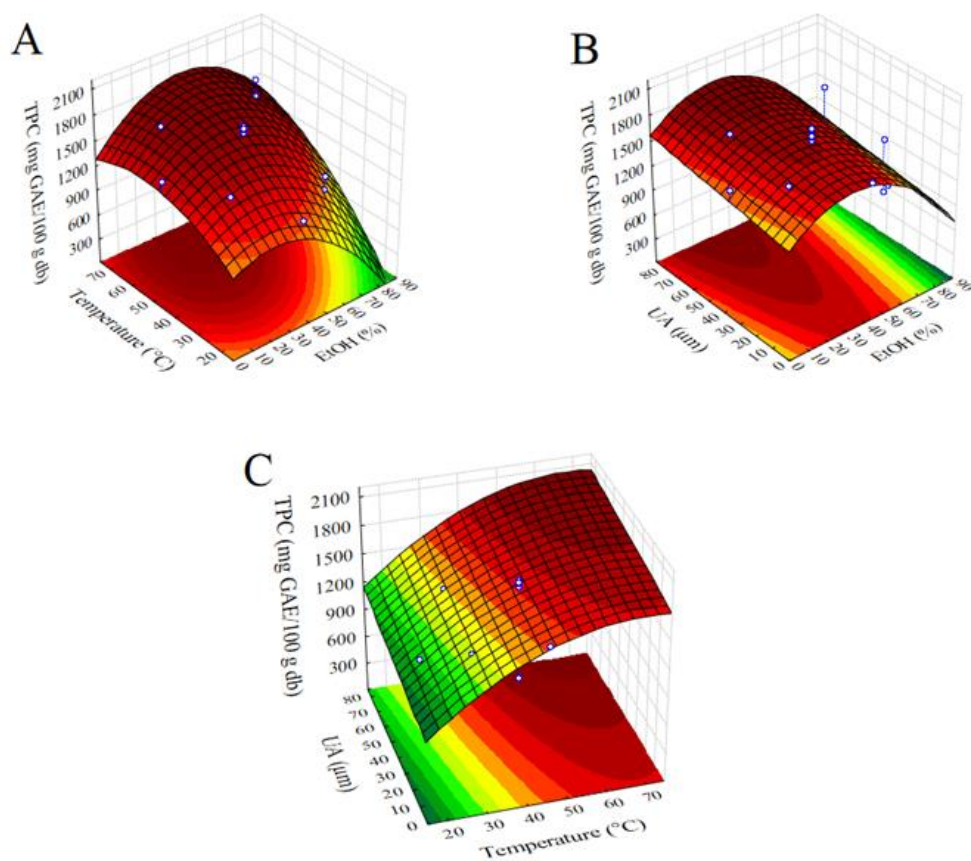
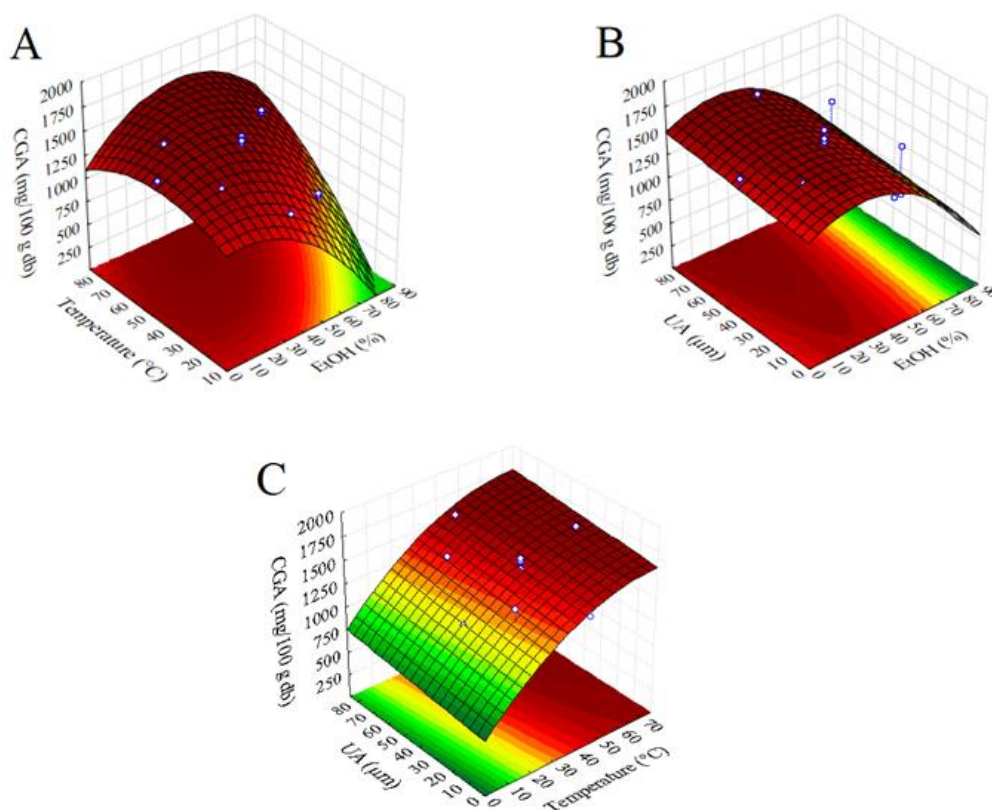


Figure 4.5 Response surface plots of the Chlorogenic Acid concentration of sunflower cake extract as affected by ethanol concentration (EtOH), temperature and ultrasound amplitude (UA). (A) EtOH and temperature (UA 40 μm); (B) EtOH and UA (temperature 45 $^{\circ}\text{C}$); (C) temperature and UA (EtOH 43 %).



4.1.3.5 Ethanol concentration

A quadratic effect of ethanol concentration (shown in Table 4.3) was observed in the TPC and CGA extraction, with the highest yield obtained by using an ethanol concentration around 40 to 45 % for both compounds analysed. As can be seen, the increase of ethanol concentration from 0 to about 45 % increases the TPC and CGA extraction, while in higher ethanol concentrations, starting in 45 %, a decrease occurred in the TPC and CGA concentrations. Pure water had one of the lowest yields in TPC extraction. This fact can be attributed to the higher viscosity of the water when compared to the EtOH solutions, resulting in a decrease of mass transfer (Şahin e Şamlı, 2013). According to Cacace e Mazza (2003), changes in ethanol concentration modify the physical properties of the solvent such as density, dynamic viscosity and dielectric constant, as well as modify the solubilities of compounds, influencing the phenolic extraction. EtOH also acts altering the structure by swelling the matrix, which, added to the lower viscosity effect, allows easier solvent

penetration in the cells tissue. High EtOH concentrations (higher than 45 %) showed a decrease in TPC and CGA yields, probably due to the lower dielectric constant of the EtOH, leading to a decrease in the solvent polarity, which affects the extraction yield. A similar effect was reported in the extraction of total phenolic compounds from wheat bran (Wang *et al.*, 2008), soybeans (Lee *et al.*, 2016) and black currants (Cacace e Mazza, 2003).

4.1.3.6 Temperature

The effects of temperature on TPC and CGA extraction can be seen in Fig. 4.4 and 4.5 (A-C). The temperature showed a high positive linear effect on the phenolic compounds extraction and a smaller, but significant ($p < 0.05$), quadratic effect (see Table 4.3). The increase in extraction temperature at a fixed ethanol concentration (Fig. 4.4 and 4.5 A) led to an increase in total phenolic content, reaching a maximum at the highest extraction temperature tested (70 °C). The influence of the temperature on the phenolic compounds extraction was more pronounced from 20 to 45 °C when compared to the results at higher temperatures (above 45 °C). Teh e Birch (2014) obtained the maximum yield of polyphenol extraction from defatted hemp, flax and canola seed cake at the highest temperature tested (70 °C). Higher temperatures enhance the solubility of phenolic compounds, decrease the viscosity of the extract and increase the diffusion coefficient (Wang *et al.*, 2008). According to Corrales *et al.* (2008b), heat application increases mass transport phenomena by improving internal liquid phase pressure, resulting in centrifugal circulation of the solutes through plant membranes.

Temperature showed a significant interaction with ethanol concentration in the extraction of TPC and CGA. In the response surface it is possible to observe that for lower temperatures, a lower concentration of ethanol was needed to obtain a good phenolic extraction.

4.1.3.7 Ultrasound Amplitude (UA)

The ultrasound amplitude applied to the extraction process showed a linear and positive effect on TPC and CGA extraction (Fig. 4.4 and 4.5 (B-C)). The increase in UA at a fixed ethanol concentration and temperature lead to an increase in total phenolic content, reaching the maximum at the higher UA applied. A similar equipment of ultrasound assisted extraction was used by Kadam *et al.* (2015) to extract TPC from seaweed, and the authors reported that the TPC extraction improved with the increase of the ultrasound amplitude, reaching the optimum at the highest ultrasound amplitude tested (114 μm). The effects of ultrasound on extraction yield depend on the nature of the plant material. The major effects related to the release enhancement of the plant material contents can be attributed to the cavitation, which causes disruption of the cell wall, particle size reduction, intensification of mass transfer and, consequently, an increase of extraction (Vinatoru, 2001; Wang e Weller, 2006).

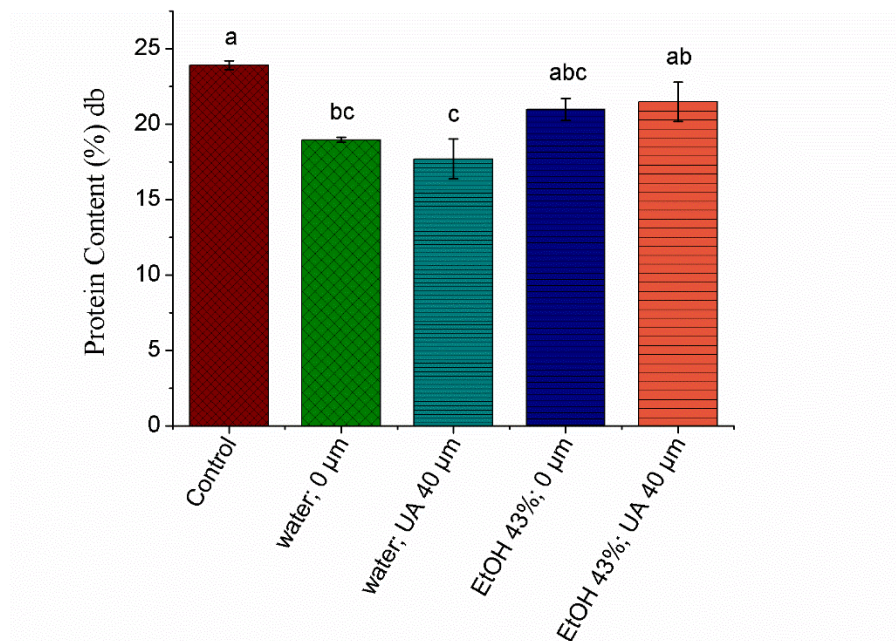
Based on the results obtained in the present work, it is possible to affirm that the effect of the UA on the extraction efficiency is considerably less significant than the temperature and ethanol concentration effects. This behavior can be attributed to the previous cell damage caused to the sunflower seed cake during the oil extraction process. The extraction from the damaged cells occurred easily, which also explains the high amounts of TPC and CGA found after only 1 min of extraction.

Although the ultrasound assisted extraction showed a low effect on the phenolic extraction from sunflower seed cake, the advantage of a shorter extraction time can be considered in relation to the conventional method.

4.1.3.8 Optimal conditions analysis

From the mathematical models, it is possible to calculate of the optimum operating parameters of the TPC and CGA sunflower seed cake extraction in 1 minute of extraction time. The highest concentration values given by the mathematical model of TPC (1997.8 mg GAE/100 g db) and CGA (1723.3 mg CGA/100 g db) were obtained at the highest temperature and ultrasonic amplitude values (70 °C and 80 μ m) and at the ethanol concentration of 43 %. It is observed in Fig. 4 and 5 that, at temperatures above 40 °C and UA higher than 34 μ m, no substantial increase in the TPC and CGA concentration has occurred. To clarify the comparison between the observed and the predicted values of the TPC at the optimized condition (43 % EtOH; 70 °C; 80 μ m UA), Table 4 shows these two values. As observed, the model adequately predicts the experimental data.

In order to verify the behavior of the response surfaces presented in Figures 4 and 5, the experimental values found to the TPC at the central point conditions (43 % EtOH; 45 °C; 40 μ m UA) and the optimal determined condition (43 % EtOH; 70 °C; 80 μ m UA) were also compared. The results found were 1740.9 ± 27.6 and 1795.6 ± 42.2 mg GAE/100 g db, for the central point and the optimal condition, respectively, and the statistical analysis showed that there is no significant difference ($p > 0.05$) between them. Due to the low responses variability at this region, it was defined as an optimum region; this definition better elucidates the best conditions for extraction. The optimum region was assumed to be in temperatures above 40 °C, UA higher than 34 μ m and ethanol concentration between 40 and 45 %. The best extraction conditions can be chosen in this region according to the economical point of view.

*Protein losses***Figure 4.6** Sunflower seed cake protein content under different extraction conditions.

As can be seen, the sunflower seed cake submitted to phenolic extraction using water presented a significant lower content of proteins than the control sample; using an ethanol solution (43 %) as solvent no significant difference from the control was observed. Ultrasound application has not shown an effect on protein losses from the sunflower seed cake dephenolized. For vegetable protein extraction, due to the polarity similarity, pure water can extract more proteins than water with a certain amount of ethanol. Aqueous ethanol solution has more affinity with polyphenols and, consequently, presents better results on phenolic extraction from seed cakes (Sarkis *et al.*, 2015). It is important to point out that the maintenance of the protein in the cakes is desirable for future application of this product.

4.1.4 Conclusion

In this study, ethanol concentration, temperature and ultrasound amplitude were evaluated in order to obtain a high extraction yield of total phenolic compounds and chlorogenic acid from sunflower seed cake. CGA was found to be the main phenolic compound in the cake. Response surface methodology was successfully employed to optimize the extraction conditions and a second order polynomial model gave a satisfactory description of most of the experimental data after 1 min of extraction. Ethanol concentration and temperature were the most significant parameters affecting the extraction performance of phenolic compounds. The ultrasound application for TPC extraction from sunflower seed cake had a small effect on the results since high amounts of phenolics were obtained in the first minute of extraction. The low ultrasound effect is related to the previous cell damage caused by the oil extraction process. From the optimization it was found that the best

conditions for extraction are in temperatures above 40 °C, UA higher than 34 µm and ethanol concentration between 40 and 45 %. The phenolic compounds present in sunflower seed cake can be easily and efficiently extracted, resulting in a cake with low content of antinutritional compounds, low proteins losses and in an extract rich in phenolic compounds, which can be used as a source of antioxidants.

4.1.4.1 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4.2 Artigo 2 - Extraction optimization of phenolic compounds from canola seed cake and their identification by mass spectrometry

Abstract

Canola oil processing generates as by-products cakes rich in proteins, which have high nutritional value. Moreover, these cakes contain expressive amount of phenolic compounds which are important as antioxidants, however can interfere in proteins nutritional value. The aim of this work was to identify the phenolic compounds present in canola seed cake and maximize their extraction by investigating the factors: temperature (20 - 70 °C), ethanol concentration in water (0 – 85 %) and sample/solvent ratio (1:5 - 1:20). An experimental design was used and the responses were obtained after 3 and 12 minutes of extraction time. Through the response surface methodology, a satisfactory model was obtained to fit the experimental data. The optimum extraction condition for both responses was the temperature between 65 and 70 °C, ethanol concentration of 35 % and sample:solvent ratio 1:20. Under optimum extraction conditions, more than 95 % of the total phenolic compounds content was extracted from the canola seed cake. Successive extractions were carried out, in order to purpose a way to minimize the solvent using. A large number of phenolic compounds were identified, including sinapic acid derivatives, the flavonoid glycosides derivatives and the major and minor sinapoyl choline derivatives.

Keywords: *Brassica napus*, response surface, byproduct, reuse, mass spectrometry.

4.2.1 Introduction

Canola (*Brassica napus* L.) oil is the third largest oil produced in the world (Faostat, 2014). Canola seed is composed mainly of oil (42 %), proteins (21 %), soluble carbohydrates (17 %), moisture (8 %), fibers (7 %) and ashes (5 %) (Edwards *et al.*, 2011). The canola seed meal or cake, a by-product of canola oil refining, is rich in proteins (Aider e Barbana, 2011). These by-products have a great potential for use as animal feed and to produce protein concentrates or isolates of high nutritional value, that is essential for the generation of additional income to the oil production chain (Godoy *et al.*, 2018).

Canola, as well as its cake, are recognized for having the highest phenolic compounds content among oleaginous plants (Cartea *et al.*, 2010). Even after extracting the oil from the canola seed, most of these phenolic compounds remain in the cake (Liu *et al.*, 2012). Sinapate esters are reported as the main phenolic compounds in rapeseed with sinapoylcholine (sinapine) as the major

component (Cartea *et al.*, 2010). Besides choline, sinapic acid can be esterified with another phenolic acid, sugars, or kaempferol (Vuorela *et al.*, 2004). The high amount of phenolic compounds (6.4 - 18.4 mg/g), especially tannins (0.2 % - 3 %), or their oxidation products, contributes to the brown color, bitter and astringent taste of the cake, reducing its palatability and nutritional value in diets for ruminants (Kozłowska *et al.*, 1990; Das Purkayastha *et al.*, 2013). On the other hand, the high antioxidant capacity of phenolic compounds makes the extract resulting from the removal of these compounds to have different applications as functional ingredient, food supplement and as inhibitor of lipid oxidation reactions in foods (Thiyam *et al.*, 2006; Sarkis, Júlia Ribeiro *et al.*, 2014; Adeyinka e Richard, 2015).

In order to produce a more nutritious canola cake for feed formulation and, consequently, enhance its commercial value, as well as to obtain an extract rich in phenolic compounds, it is of great importance to develop an efficient technique for removal and separate these compounds (González-Pérez e Vereijken, 2007; Das Purkayastha *et al.*, 2013).

Alternative technologies, among them the ultrasound assisted extraction (UAE), are being used as substitutes or auxiliary to the conventional extraction methods to improve the efficiency of the process. The UAE has presented quite satisfactory results in the extraction of phenolic compounds from vegetal materials as reported by Teh and Birch (2014), Wang *et al.* (2008) and by Zardo *et al.* (2017).

One of the industry's main ambitions is to minimize solvent consumption, since the excess of solvent generates a high energy cost and an extended time for subsequent concentration of the extract. An alternative that has recently been also applied for the extraction of bioactive compounds is the multi-stage process, which combines a dynamic circular extraction and the technology of countercurrent extraction (Wang *et al.*, 2004). Multi-stage countercurrent extraction is based on the reuse of the same extract for circulation between different stages of the extraction, creating and maintaining a constant concentration gradient between the solvent and the matrix at each stage. This technique not only increases the efficiency of the extraction, but also substantially decreases the use of solvent (Zhang *et al.*, 2015).

The aim of this work was to determine the qualitative and quantitative profile of phenolic compounds in canola seed cake and investigate the removal of these compounds by conventional stirring extraction and by ultrasonic assisted extraction. The profile of phenolic compounds was also monitored during simultaneous extractions by reusing the extract in order to evaluate the phenolic compounds dissolution capacity in the solvent.

4.2.2 *Material and methods*

4.2.2.1 *Sample preparation and characterization*

The canola seed cake used in this work came from the industrial process of oil extraction after the extraction step by pressing without solvent application. The cake sample was supplied by Sementes Giovelli (Rolador, RS, Brazil). The sample was sieved in 20 mesh (0.84 mm) for granulometry homogenization and stored at -18 °C until further use.

The moisture of the canola seed cake was determined by the gravimetric method according to AOAC methodology 925.10 (Aoac, 2005b), the crude protein content by the Kjeldahl AOAC method 945.18 (Aoac, 2005a) and the oil content with Soxhlet extractor according to AOAC method 996.01 (Aoac, 2000).

4.2.2.2 *Phenolic compounds exhaustive extraction*

Phenolic compounds of the canola seed cake were exhaustively extracted in triplicate according to Rodrigues *et al.* (2013) with some modifications. Canola seed cake (2.5 g) was weighed into a 50 ml Falcon tube, added by 25 ml of 45 % aqueous ethanol solution (v/v) and extracted by vortexing for 5 min followed by centrifugation (Sigma Laborzentrifugen GmbH, model 2-16KL, Germany) at 4757 g for 10 minutes at 10 °C. The supernatant was collected and the solid residue was subjected to the extraction again. After seven re-extraction, a volume of 200 mL volumetric flask was completed and the extract was analyzed qualitative and quantitative by HPLC-DAD-MSⁿ.

4.2.2.3 *Phenolic compounds determination*

4.2.2.3.1 *Determination of the total phenolic compounds*

Total phenolics were determined using the Folin-Ciocalteu colorimetric method, according to Singleton *et al.* (1999) with some modifications. A mixture of distilled water, canola seed cake extract, Folin-Ciocalteu reagent (5 %, v/v) and sodium carbonate buffer (3 %, w/v) in a final volume of 2000 µL was placed in Falcon tubes. After 1 h of reaction in the dark, the absorbance was measured at 765 nm. Quantification was carried out using a six-point analytical curve of gallic acid (10-90 µg/mL).

4.2.2.3.2 *Determination of the qualitative and quantitative phenolic profile by HPLC-DAD-MS/MS*

The qualitative and quantitative phenolic profile was determined by HPLC-DAD-MS/MS in the extracts obtained from exhaustive extraction (Section 4.2.2.2) and from phenolic compounds dissolution capacity (presented in Section 4.2.2.5). Previous to mass spectrometry (MS) analysis, the extracts were semi-purified using a solid phase extraction (SPE) according to Bochi *et al.* (2015) with minor modifications. First, the ethanol was totally removed in a rotary evaporator (T < 40 °C) followed by centrifugation at 10000 g for 10 min at 10 °C and filtration through a 0,22 µm

membrane of acetate and nitrate cellulose. Then the aqueous extract (2 mL) was loaded into SPE C18 cartridges (Waters Corporation, Milford, MA, USA), previously activated with methanol and conditioned with acidified water (0.35 % v/v formic acid). Interfering compounds such as sugars and organic acids were washed out with two volumes of acidified water. In a final step, the phenolic compounds were eluted with two volumes of acidified methanol (0.35 % v/v formic acid). The solvent from the purified extract was completely removed in a concentrator centrifuge; the extract was resuspended to a known volume (2 mL) with acidified water (1 % v/v formic acid) and filtered through a 0.22 μm PVDF membrane prior to HPLC-DAD-MS/MS injection.

The identification of the phenolic compounds present in the canola seed cake by MS was performed in a Shimadzu HPLC (Kyoto, Japão) connected in series to a diode array detector (Shimadzu, SPD-M20A) and a mass spectrometer with an electrospray ionization source (ESI) and a quadrupole time-of-flight analyzer (model *micrOTOF-Q II*, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The phenolic compounds were separated on a C18 Synergi Hydro-RP column (4 μm , 250 x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) coupled to a ODS-C18 pre-column (5 μm , 4 x 3 mm, Phenomenex) using a mobile phase consisting of a water/formic acid mixture [99.5:0.5 (v/v) (solvent A)] and an acetonitrile/formic acid mixture [99.5:0.5 (v/v) (solvent B)]. The gradient was programmed as follows: 99:1 (solvent A:solvent B) to 50:50 for 50 min, from 50:50 to 1:99 in 5 min, maintaining 1:99 for 5 min, changing to 99:1 in 1 min and maintaining this proportion for 7 min (Rodrigues *et al.*, 2013). The flow rate was 0.9 mL/min and the column temperature 29 °C.

The mass spectra were acquired in the range from m/z 100 to 1000, and the parameters used were as follows: ESI source in positive or negative ion modes; capillary voltage, 3000 V; end plate offset, -500 V; dry gas (N_2) temperature, 310 °C; flow rate, 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (negative) or 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (positive); nebulizer gas, 4 Bar. MS/MS were set in automatic mode applying fragmentation energy of 20 to 60 eV. The phenolic compounds were identified on the basis of the combined results of the following parameters: elution order and retention time on reversed phase column, and UV-visible and mass spectra characteristics compared with the standards and the data available in the literature, analyzed under the same conditions.

Quantitative analyses were carried out in an Agilent HPLC (Santa Clara, California, USA) connected to a diode array detector. The ethanolic extracts, not purified by SPE, were diluted in acidified water (0.5 % v/v formic acid) and filtered (0.22 μm PVDF membrane) prior to HPLC-DAD injection. Chromatographic conditions were the same used in the identification, the UV-vis spectra were obtained between 200 and 600 nm, and the chromatograms were processed at 325 nm. The phenolic compounds were quantified by HPLC-DAD using an eight-point analytical curve of *trans*-sinapic acid (0.04-68 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.2.2.4 Phenolic compounds extraction by conventional and ultrasonic assisted extraction

Initial experiments were carried out to evaluate the effects of temperature and ultrasound technology application in the phenolic compounds extraction efficiency.

Phenolic compounds extraction was performed by weighting 10 g of sample, adding 100 mL of solvent with fixed concentration of 45 % ethanol in water and maintaining under agitation for 15 min. Temperatures tested were 25, 45 and 65 °C at ultrasound amplitude of 85 µm which correspond to 73 W/cm² of dissipated ultrasound power (measured by the calorimetric method according to Contamine *et al.* (1995)). In the ultrasound-assisted extraction experiments, the equipment operated during the 15 min of process. Aliquots were collected for analysis after 1, 3, 5, 8, 11 and 15 min, centrifuged at 12,100 g for 3 min and the supernatant separated for analysis. Ultrasound was applied by a probe equipment (VC 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA) with a fixed frequency of 20 kHz, a probe diameter of 13 mm and a maximum nominal power of 750 W.

An analysis of variance (ANOVA) was performed for each extracting condition (time, temperature and US). The Tukey averages difference test with statistical significance of 0.05 was used.

After the initial experiments, the factors chosen to be analyzed in the factorial design were: temperature (T), ethanol concentration in water (EtOH %) and the sample/solvent ratio (Ratio). To analyze the optimal extraction condition, a 2³ full factorial design with six axial and six central points was used. Table 4.4 shows the coded and original values used.

Table 4.4 Coded and natural values of the experimental design

Variables		Coded levels				
		-α (-1.68)	-1	0	1	+α (+1.68)
		Original levels				
EtOH* (v/v) (%)	(X1)	0	17	43	68	85
Temperature (°C)	(X2)	20	30	45	60	70
Ratio* (g/100 mL)	(X3)	5	8	12.5	17.5	20

*EtOH – ethanol concentration in water

The responses analyzed were total phenolic compounds (TPC) concentration after 3 and 12 minutes of extraction. The experimental design was conducted in a randomized way. A second-order polynomial model was used for fitting the experimental data of TPC (mg GAE/100 g db) and predicting the response (Equation 4.5).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i X_i + \sum_{i=1}^5 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 b_{ij} X_i X_j \quad (4.5)$$

where Y was response, b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} were regression coefficients for the intercept, linear, quadratic and cross-product terms, respectively. The final model obtained considered only the influences of significant factors ($p < 0.05$). The quality of fit was evaluated by the determination coefficient (R^2)

and the statistical significance was checked through the F-test. The average error was determined comparing the experimental data with the predicted values according to Equation 4.6.

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{exp} - y_{pred}|}{y_{exp}} \quad (4.6)$$

where E is the average error, n is the number of experimental data points, y_{exp} is the experimental value and y_{pred} is the value predicted by the model.

4.2.2.5 Phenolic compounds dissolution capacity

As a way to evaluate the maximum dissolution capacity in the solvent, consecutive extractions were carried out on different canola cake samples using the same solvent. The ethanol concentration (35 %) and extraction temperature (65 °C) chosen were the optimum conditions according to the model obtained in this work and the ratio of sample/solvent chosen at each stage was 12.5:100. The total phenolic compounds and the phenolic compounds profile were determined in the each extraction stage.

4.2.3 Results and discussion

Canola seed cake sample used in this work presented 7.9 ± 0.1 % of moisture, protein content of 27.7 ± 0.1 % and oil content of 21.5 ± 0.4 %. Zhou *et al.* (2016) obtained similar results in their studies with canola cake used for pig feed.

4.2.3.1 Identification and quantification of phenolic compounds

Figure 4.7 shows a chromatogram of the phenolic compounds separation from canola seed cake. A total of 24 phenolic compounds were identified in the canola seed cake; the accurate mass of the deprotonated and protonated molecules, the error calculated considering theoretical mass and the main fragments generated at MS/MS are listed in Table 4.5. The identification was done comparing the mass/charge ratio (m/z) of the deprotonated/protonated molecule and the MS/MS fragmentation pattern with data previously reported in the literature, and comparing the observed mass with the calculated theoretical mass. Accurate mass measurements of the product ions facilitate the correct elucidation of a high diversity of phenolic compounds present in vegetal matrix.

The phenolic profile of canola seed cake comprises mainly derivatives of sinapic acid. These phenolic compounds were found in the free form, as *trans*-sinapic acid and *cis*-sinapic acid, and also esterified with mono and diglycosides, esterified with the flavonoid kaempferol and esterified with choline. To the best of our knowledge, this is the first work that reports the identification and quantification of a large number of phenolic compounds in canola seed cake, including sinapic acid derivatives, flavonoid glycosides derivatives, and the major and minor sinapoyl choline derivatives. This complete phenolic compounds profile is important since the sinapoyl choline derivatives are the major antinutritive compounds found in canola; they are responsible for the bitterness and

astringency and can form complexes with amino acids and proteins, reducing their digestibility. Furthermore, the chemical structure of the phenolic compounds (characterized by at least one hydroxyl group on the aromatic ring) is responsible for their antioxidant capacity through the hydrogen donation to the reactive species and for their metal-chelating properties (Cartea *et al.*, 2010).

The identification of the twenty four phenolic compounds will be discussed separately for each group of compounds: free sinapic acid, sinapic acid glycosylated derivatives, flavonoid glycosylated derivatives and sinapoyl choline derivatives.

Figure 4.7 Chromatogram of phenolic compounds from canola seed cake obtained by HPLC-DAD at 325 nm. Compound identification is detailed in Table 4.5.

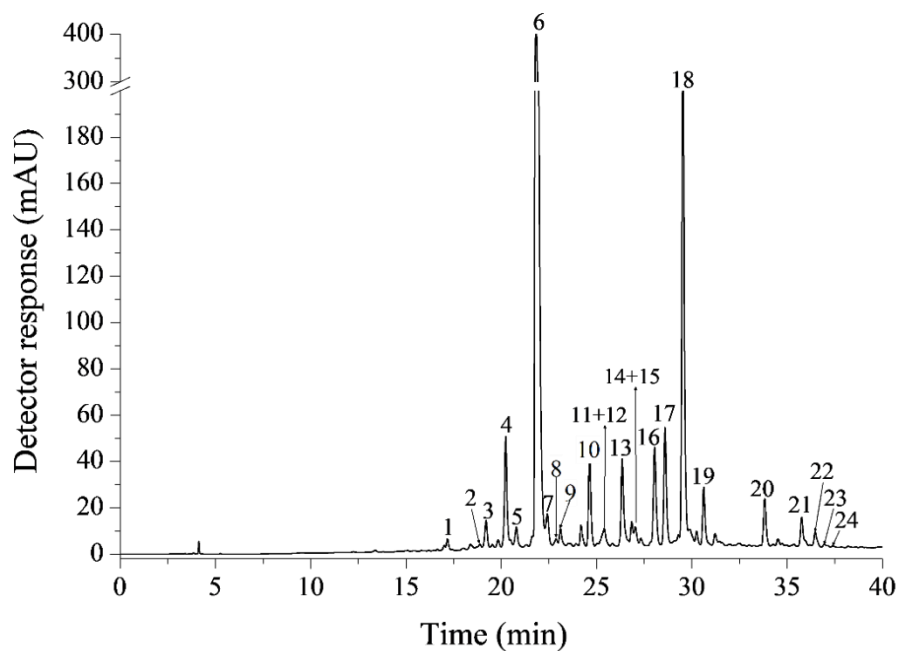


Table 4.5 Chromatographic and spectroscopic characteristics and phenolic compounds content of canola seed cake, obtained by HPLC-DAD-MS/MS.

Compound ^a	RT (min) ^b	λ_{\max} (nm) ^c	Accurate mass (ion mode)	Fragment ions (MS ²) <i>m/z</i>	Error (ppm)	Nomenclature	Concentration ($\mu\text{g/g}$ dry weight) ^e
1	16.7	265, 346	771.2031 (-)	609.1491; 446.0873; 284.0351	5.4	kaempferol-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -glucoside	11.8 \pm 0.4
2	18.5	326	385.1161 (-)	190.0286; 205.0505; 164.0473; 149.0245; 179.0716; 232.0350	6.8	sinapoylglucoside	12.0 \pm 2.4
3	18.9	328	547.1707 (-)	205.0510; 190.0278	8.0	sinapoylgentibioside	82.5 \pm 0.5
4	19.8	269, 333	977.2640 (-)	815.2103; 609.1490; 591.1391; 446.0864; 284.0347; 205.0499	7.4	kaempferol-3- <i>O</i> -sinapoylsophoroside-7- <i>O</i> -glucoside	322 \pm 6
5	20.4	331	385.1167 (-)	190.0276; 205.0503; 175.0037; 164.0470; 149.0225	8.3	sinapoylglucoside	55 \pm 1
6	21.4	329	310.1627 (+)	251.0906; 175.0399; 207.0647; 147.0457; 119.0507; 236.0659	7.4	sinapine	4247 \pm 136
7	21.9	327	476.2280 (+)	221.0814; 177.0594; 145.0292	0.2	feruloyl-4- <i>O</i> -8'-feruloyl choline	120 \pm 2
8	22.5	327	476.2286 (+)	-	1.5	feruloyl-4- <i>O</i> -8'-feruloyl choline	18.5 \pm 0.2
9	22.8	330	620.2702 (+)	381.1339; 399.1445; 543.1871; 369.1341; 561.1965; 551.5612	0.1	hexose-feruloyl-8'- <i>O</i> -5-xxxx choline	53 \pm 3
10	23.8	267, 323	977.2610 (-)	653.1547; 815.2080; 447.0929; 609.1469; 285.0393	4.3	kaempferol-6- <i>O</i> -sinapoylglucoside-3,7- <i>O</i> -diglucoside	58 \pm 2
11	24.9	coelution with 12	609.1473 (-)	284.0325; 456.1974; 290.6582; 255.0323	9.8	kaempferol-3- <i>O</i> -sophoroside	n.c. ^f
12	24.9	coelution with 11	506.2397 (+)	251.0930; 207.0654; 175.0398	2.4	sinapoyl-4- <i>O</i> -8'-feruloyl choline	n.c.

13	25.9	295 (sh) ^d , 308	496.2452 (+)	408.1447; 175.0409; 351.0873; 149.0598; 268.0725; 325.1069	2.0	cyclic spermidine conjugate	272 ± 3
14	26.5	coelution with 15	815.2089 (-)	284.0335; 609.1475; 591.1397; 205.0500	6.7	kaempferol-3- <i>O</i> -sinapoylsophoroside	n.c.
15	26.5	coelution with 14	753.2276 (-)	205.0509; 223.0604; 190.0284	2.8	disinapoylgentibiose	n.c.
16	27.8	324	223.0607 (-)	193.0140; 149.0239; 121.0285; 165.0206; 163.0406	34	<i>trans</i> -sinapic acid	300 ± 26
17	28.3	330	223.0613 (-)	-	32	<i>cis</i> -sinapic acid	353 ± 12
18	29.1	330	753.2273 (-)	205.0505; 223.0598; 190.0266; 547.1669	3.3	disinapoylgentibiose	1450 ± 40
19	30.2	330	753.2269 (-)	205.0505; 223.0605	2.8	disinapoylgentibiose	168 ± 5
20	33.5	330	591.1768 (-)	205.0512; 223.0615; 164.0479; 190.0278; 208.0380	8.3	disinapoylglucoside	147 ± 3
21	35.3	330	959.2882 (-)	205.0509; 529.1594; 223.0610; 190.0275	5.7	trisinapoylgentibioside	94 ± 3
22	36.0	283, 324	682.2872 (+)	221.0817; 207.0660; 147.0450; 179.0704; 177.0554; 175.0404	2.1	feruloyl-4- <i>O</i> -8'-feruloyl sinapoyl choline	48 ± 2
23	36.3	328	591.1766 (-)	205.0505; 190.0294; 456.2076; 223.0607; 420.7103	8.0	disinapoylglucoside	5.9 ± 0.3
24	36.6	270, 336	712.2959 (+)	251.0922; 207.0658; 147.0444; 179.0698; 175.0398	0.7	sinapoyl-4- <i>O</i> -8'-feruloyl sinapoyl choline	2.2 ± 0.2

^a Numbered according to the chromatogram show in **Figure 4.7**. ^b Retention time (RT) on C18 column. ^c Linear gradient of water and acetonitrile both with 0,5 % of formic acid. ^d Shoulder (sh). ^e The phenolic compounds were quantified as sinapic acid equivalents (n= 2). ^f Not calculated (n.c.).

4.2.3.1.1 *Free sinapic acid*

Hydroxycinnamic acids have a C6-C3 structure with a double bond in the side chain in *cis* or *trans* configuration. Compound 11 was identified as *trans*-sinapic acid, since it eluted at the same retention time and presented the same UV-visible and MS spectra and MS/MS fragmentation pattern as the analytical standard of *trans*-sinapic acid. The fragmentation of the deprotonated molecule (m/z 223.0607) generated as base peak the ion at m/z 193.0140 which corresponds to the loss of two CH₃ groups from the benzene ring, followed by the successive breakdown of the CO₂ from the carboxylic acid giving the fragment at m/z 149.0239 (Lee *et al.*, 2017).

Compound 12 presented the same UV-visible and MS spectra of the analytical standard of *trans*-sinapic acid and it was identified as the isomer *cis*-sinapic acid. The *cis*-sinapic acid eluted after the *trans* isomer in the C18 column. The higher elution time of the *cis* isomer in the C18 column was reported by Caccamese *et al.* (1979), who studied the UV irradiation effect on isomerization of the pure *trans* sinapic acid standard and was also reported by Siger *et al.* (2013), who used the similar chromatographic conditions to separated phenolic compounds in two rapeseed cultivars, Visby F1 and Bellevue. These acids can, in fact, occur in both forms due to the presence of an ethylenic group in the side chain; the *trans* form, originally synthesized in plants via the phenylalanine and tyrosine metabolic pathway, can be partially convert to the *cis* form by *cis-trans* isomerase *in vivo* or by ultraviolet light *in vitro* (Caccamese *et al.*, 1979).

4.2.3.1.2 *Sinapic acid glycosylated derivatives*

Six glycosilated derivatives of disinapoyl (compounds 15, 18-20 and 23) and trisinapoyl (compound 21) were identified in the canola seed cake by comparing the values of the deprotonated molecule and the accurate mass with the data reported by Baumert *et al.* (2005), who used a combination of high-field nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry to identify the sinapate esters in canola (*Brassica napus* L.) seeds. Compound 21 showed the deprotonated molecule at m/z 959.2882 corresponding to trisinapoylgentibiose. Compounds 15, 18 and 19 presented the same deprotonated molecule at m/z 753.22 corresponding to disinapoylgentibiose isomers. Compounds 20 and 23 presented the same deprotonated molecule at m/z 591.17 corresponding to disinapoylglycose isomers. The disaccharide moieties were named as gentibiose unit (1→6 linkage of two glucoside molecules), as previously identified by Baumert *et al.* (2005), using high-field NMR in the same canola species evaluated in this work.

In the canola seed cake were also identified three glycosilated derivatives of monosinapoyl (compounds 2, 3 and 5) by comparing the values of the deprotonated molecule with the data reported by Ferreres, Fernandes, Oliveira, *et al.* (2009), who evaluated kale leaves and tronchuda cabbage seeds (plants belonging to the same family as canola, a *Brassicaceae*). Compounds 2 and 5 showed the same deprotonated molecule at m/z 385.1161 corresponding to sinapoylglucoside

isomers. Compound 3 showed deprotonated molecule at m/z 547.1707 and was identified as sinapoylgentibiose.

The fragmentation pattern of the glycosylated derivatives of mono-, di- and trisinapoyl was similar, generating the same dehydrated sinapic acid ion as the base peak at m/z 205 [sinapic acid-H-H₂O]⁻ and the same secondary fragments ions at m/z 190 [sinapic acid-H-H₂O-CH₃]⁻ corresponding to the successive loss of the methyl group. The sinapic acid ion [sinapic acid-H]⁻ at m/z 223 was only found in disinapoyl and trisinapoyl glycosylated derivatives, but was absent in monosinapoyl derivatives. Furthermore, these compounds also presented the same UV-visible spectrum profile with a large absorption band at 326-331nm, which is characteristic of the sinapic acid derivatives (Table 4.5 and Supplementary Figure A1).

4.2.3.1.3 *Flavonoid glycosylated derivatives*

Five flavonoid glycosides derivatives were found in canola seed cake, which generated a fragment of the deprotonated aglycone at m/z 284, indicating that the kaempferol was the flavonoid present. Three of them were identified as kaempferol mono- or diglycoside monoacylated with sinapic acid (compounds 4, 10 and 14) and two of them as kaempferol diglycoside non-acylated (compounds 1 and 11). These compounds were identified using the combined data from the elution order in the C18 column, the UV spectrum, the accurate mass and the deprotonated molecule m/z value compared with data reported by Baumert *et al.* (2005) and Ferreres, Fernandes, Oliveira, *et al.* (2009). Considering these references, the diglucosyl unit was identified as sophoroside (1→2 linkage of two glucoside molecules). The flavonoid glycosides derivatives presented a large absorption band at 323-346 nm similar to the others sinapic acid derivatives, and a small absorption band at 265-269 nm characteristic of the kaempferol presence (Table 4.5 and Supplementary Figure A1).

The kaempferol derivatives found in canola seed cake are flavonoid *O*-glycosides, in which one or more hydroxyl groups of the aglycone are bound to a sugar forming a glycosidic O-C bond. Fragmentation pathway of *O*-glycosylated flavonoids starts with the cleavage of the glycosidic bonds and elimination of the sugar moieties generating aglycone or sugar fragments (Stobiecki, 2000). In fact, the fragmentation of the kaempferol-3-*O*-sophoroside-7-*O*-glucoside (compound 1) and kaempferol-3-*O*-sinapoylsophoroside-7-*O*-glucoside (compound 4) generated as MS² base peak the ion which corresponds to the loss of 162 u (unified atomic mass unit), which is, in turn, the mass of one hexose residue. The kaempferol-6-*O*-sinapoylglucoside-3,7-*O*-diglucoside (compound 10) and kaempferol-3-*O*-sophoroside (compound 11) exhibited as MS² base peak the fragment ion which corresponds to the loss of diglycoside moiety (324 u). Regarding the kaempferol-3-*O*-sinapoylsophoroside (compound 14), the main ion fragment was the aglycone at m/z 284 generated by the simultaneous loss of an acyl radical (206 u) and of diglycosil moiety

(324 u). Furthermore, the fragmentation pattern from these compounds is in accordance with data reported in the literature (Ferrerres *et al.*, 2007).

Some of these flavonoid glycosides derivatives found in canola seed cake were also identified by HPLC-DAD-MS in canola seeds (Baumert *et al.*, 2005), in kale and tronchuda cabbage seeds (Ferrerres, Fernandes, Sousa, *et al.*, 2009) and in pak choi (leafy Chinese cabbage) (Harbaum *et al.*, 2007), which are plants belonging to the same family as canola, *Brassicaceae*. To the best of our knowledge, this is the first work that reports the presence of kaempferol-3-*O*-sinapoylsophoroside (14) in canola.

4.2.3.1.4 *Sinapoyl choline derivatives*

The identification of the sinapoyl choline derivatives was carried out by ionization in the positive mode. This ionization mode is the most suitable for the detection of this molecular ion, which is naturally positively charged due to the choline group.

The main sinapoyl choline derivatives present in canola seed cake was sinapine (compound 6) that consists of a sinapic acid esterified with a choline group. Sinapine showed a protonated molecule at m/z 310.1627 and the fragmentation generated as base peak the ion at m/z 251.0906 which corresponds to the loss of the trimethylamine ($N(CH_3)_3$, 59 u) followed by the successive breakdown to m/z 207.0647 due the loss of ethoxy fragment (OCH_2CH_2-). The latter ion suffered additional fragmentations generating ions at m/z 175.0399 and m/z 147.0457 corresponding to the loss of CH_3OH (32 u) and CH_3OH-CO (60 u) groups, respectively. According to the literature, the identification of sinapine by mass spectrometry is commonly performed by ionization in the positive mode, as performed in ten varieties of rapeseed (Liu *et al.*, 2012), in another study with four varieties of rapeseed meal (Yang *et al.*, 2015), in tronchuda cabbage seeds (Ferrerres *et al.*, 2007) and in seeds and mustard flour (Thiyam-Holländer *et al.*, 2014).

Besides sinapine, another 6 sinapoyl choline derivatives were identified in canola seed cake based on accurate mass measurements and by the comparison of the protonated molecule values and the mass spectral fragmentation pattern values with those reported by Böttcher *et al.* (2009). These authors elucidated the chemical structure of the minor phenolic choline esters present in seeds of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. These compounds are cross-coupling products derived from feruloyl/sinapoylcholine and coniferyl/sinapyl alcohol (in Table 4.5 coniferyl group was named guaiacyl). The choline esters of hydroxycinnamic acids are oxidatively coupled to monolignols via 4-*O*-8' (compounds 7, 8, 12, 22 and 24) or 5-8' (compound 9) linkage.

The compounds 7, 12, 22 and 24 had similar fragmentation patterns, generating major ions at m/z 251 or 221 due to simultaneous loss of monolignol (195 u) and trimethylamine (59 u) groups; concerning compounds 22 and 24, it was observed a further loss from the sinapoyl group (207 u) which is esterified to guaiacyl group. The consecutive cleavage of ethoxy fragment (OCH_2CH_2- , 44 u) generated the ions feruloyl⁺ at m/z 177 (compound 7) and sinapoyl⁺ at m/z 207 (compounds

12, 22 and 24) indicating the phenolic acid which is esterified with choline. The fragmentation characteristic of the compound 9 was the sugar moiety loss giving as base peak the ion at m/z 381.1339 $[M+H-N(CH_3)_3-H_2O-C_6H_{12}O_6]^+$ and others ions at m/z 399.1445 $[M+H-N(CH_3)_3-C_6H_{12}O_6]$ and m/z 369.1341 $[M+H-CH_2O-C_6H_{12}O_6]$.

In the positive mode ionization, it was also possible to identify a cyclic spermidine conjugate (compound 13) comparing its MS spectrum with those reported by Baumert *et al.* (2005). This compound showed protonated molecule at m/z 496.2452, MS/MS base peak at m/z 408.1450 $[M+H-putrescine]^+$ and other fragments at m/z 351.0879 $[M+H-spermidine]^+$.

4.2.3.2 Phenolic compounds quantification

Table 4.5 also presents the quantification of each phenolic compound identified in canola seed cake. The sum of all phenolic compounds estimated by HPLC-DAD was 7.8 ± 0.2 mg of *trans*-sinapic acid equivalent/g (db). Sinapoyl choline derivatives is the predominant group presented in canola seed cake, representing 57.4 % of the total phenolic content (sum of the compounds 6, 7, 8, 9, 22 and 24), following by 25.8 % of sinapic acid glycosilated derivatives (sum of the compounds 2, 3, 5, 18, 19, 20, 21 and 23), 8.3 % of free sinapic acid (*trans*-sinapic acid and *cis*-sinapic acid, compounds 16 and 17, respectively), 5.0 % of kaempferol derivatives (sum of the compounds 1, 4 and 10) and 3.5 % of the compound spermidine conjugate (compound 13). Sinapine (compound 6), represented by the phenolic choline esters group, is the major phenolic compound identified in the canola seed cake, resulting in 54.3 % of total phenolic compounds. The esterified forms of sinapic acid, represented by phenolic choline esters, sinapic acid glycoside and kaempferol derivatives, are the predominant phenolic compounds in canola seed cake.

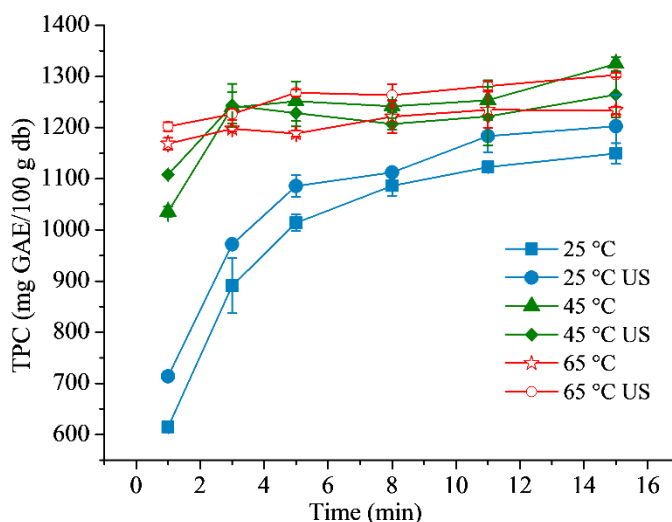
The phenolic compounds content found in this work were lower than others reported in the literature. Khattab *et al.* (2010) analysed different varieties of canola extracts and found the content of total phenolics, sinapine, sinapic acid and sinapoyl glucose ranging from 9.16 to 16.13, 6.39 to 12.28, 0.11 to 0.59 and 1.36 to 7.50 mg of sinapic acid equivalent/g, respectively. Cai e Arntfield (2001) reported in their results that the 70 % methanolic extract of canola flour had 11.74 mg/g sinapine representing 52 % of the canola total phenolics.

The high variability in the amounts of the individual phenolic compounds in rapeseed has been widely reported and depends on several factors, such as genetic, growing conditions, environment, and extraction procedures (Cai e Arntfield, 2001; Yang *et al.*, 2014).

4.2.3.3 Phenolic compounds extraction using conventional and ultrasonic methods

Preliminary tests were performed in order to analyze and choose the parameters to be used in the experimental design; the results are presented in Figure 4.8.

Figure 4.8 Kinetics of the total phenolic compounds (TPC) extracted from canola seed cake at different temperatures with and without ultrasound.



In Figure 4.8 it can be verified an evident effect of the extraction temperature. At the lowest temperature used (25 °C), the extraction equilibrium was reached only after 11 min, while at 45 °C and at 65 °C the equilibrium was reached in 3 and 1 min, respectively. Ultrasound application showed significant differences ($p < 0.05$) only after 1 min of extraction time and at temperatures of 25 and 45 °C. After 3 min of extraction, no significant difference was observed when ultrasound was used. According to these results, it was established not to use ultrasound technology as an auxiliary to the extraction. In contrast, some authors have obtained satisfactory results with the application of ultrasound technology to extract phenolic compounds from oilseed cakes (Teh e Birch, 2014; Mojerlou e Elhamirad, 2018).

The parameters as well as the ranges presented in Table 4.4 were chosen to elaborate the experimental design. Response surfaces were created by the responses obtained after 3 and 12 min of extraction. The extraction equilibrium was reached for all conditions analyzed at 12 min. Table 4.6 shows the factors and levels evaluated by the experimental design, as well as the results obtained after the extraction times of 3 and 12 min. The large range of phenolic compounds obtained at the different extraction conditions (675 to 1322 mg GAE/100 g) emphasizes the importance of an extraction process optimization.

Table 4.6 Experimental design factors used in canola seed cake extraction and the total phenolic compounds content after 3 and 12 minutes of extraction.

Factors			Total phenolic compounds (mg GAE/100 g db)	
EtOH* (%)	Temperature (°C)	Ratio (g/100 mL)	3 min	12 min
17	30	8.0	1158	1322
17	30	17.0	1055	1067
17	60	8.0	1301	1335
17	60	17.0	1232	1262
68	30	8.0	1083	1224
68	30	17.0	899	1034
68	60	8.0	1297	1303
68	60	17.0	1174	1253
0	45	12.5	1087	1138
85	45	12.5	675	964
43	20	12.5	874	1151
43	70	12.5	1299	1333
43	45	5.0	1322	1350
43	45	20.0	1175	1271
43	45	12.5	1261	1301
43	45	12.5	1256	1290
43	45	12.5	1269	1273
43	45	12.5	1280	1278
43	45	12.5	1254	1273
43	45	12.5	1275	1294

*EtOH – ethanol concentration in water

Based on the results, a second-order polynomial model was obtained with the fit quality determined by the determination coefficient (R^2). The R^2 of the models obtained for the responses after 3 and 12 min were 0.89 and 0.84, respectively. Some authors suggest that for a good fit the model should present a minimum R^2 of 0.8 (Bae *et al.*, 2015; Mašković *et al.*, 2016). Table 4.7 presents the coded coefficients estimated and the p-values. The terms that presented significance lower than 95 % were neglected in the models construction. The errors between estimated and predicted values were lower than 1 %, indicating an accurate prediction of the TPC. The experimental error was determined comparing central points, and the error was of 0.76 % and 0.84 % for 3 and 12 min, respectively.

Table 4.7 Estimated coded coefficients adjusted to the second-order polynomial model and the p-values for 3 and 12 min.

Factors	3 min		12 min	
	Coefficients	p-values	Coefficients	p-values
EtOH* (%) (L)	-72.07	0.0014	-33.99	0.019
EtOH* (%) (Q)	-118.32	< 0.0001	-77.14	< 0.0001
Temperature (°C) (L)	111.70	< 0.0001	59.32	0.0003
Temperature (°C) (Q)	-45.74	0.0209		
Ratio (g/100 mL) (L)	-53.15	0.0110	-51.32	0.001
R ²	0.89		0.84	
Error (%)	0.81		0.55	

*EtOH – ethanol concentration in water

Figure 4.9 and 4.10 show the response surfaces generated by the prediction models obtained after 3 and 12 min of phenolic compounds extraction from the canola seed cake, correspondingly.

Figure 4.9 Response surface of the TPC extracted from the canola seed cake after 3 min: (A) EtOH and Temperature (Ratio 12.5); (B) EtOH and Ratio (Temperature 45 °C); (C) Temperature and Ratio (EtOH 43 %).

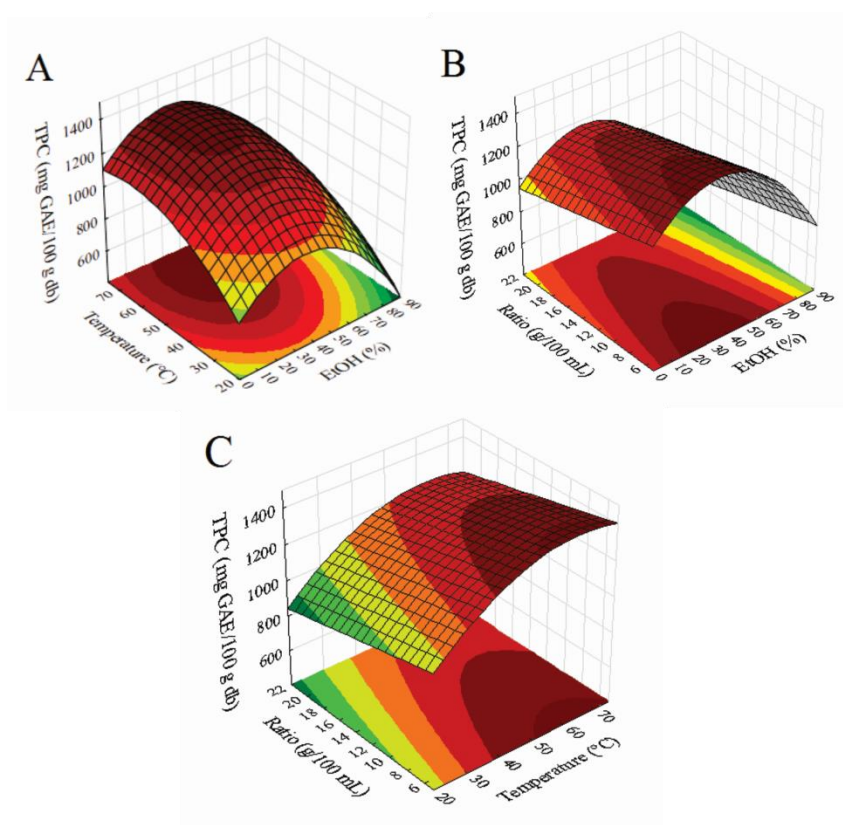
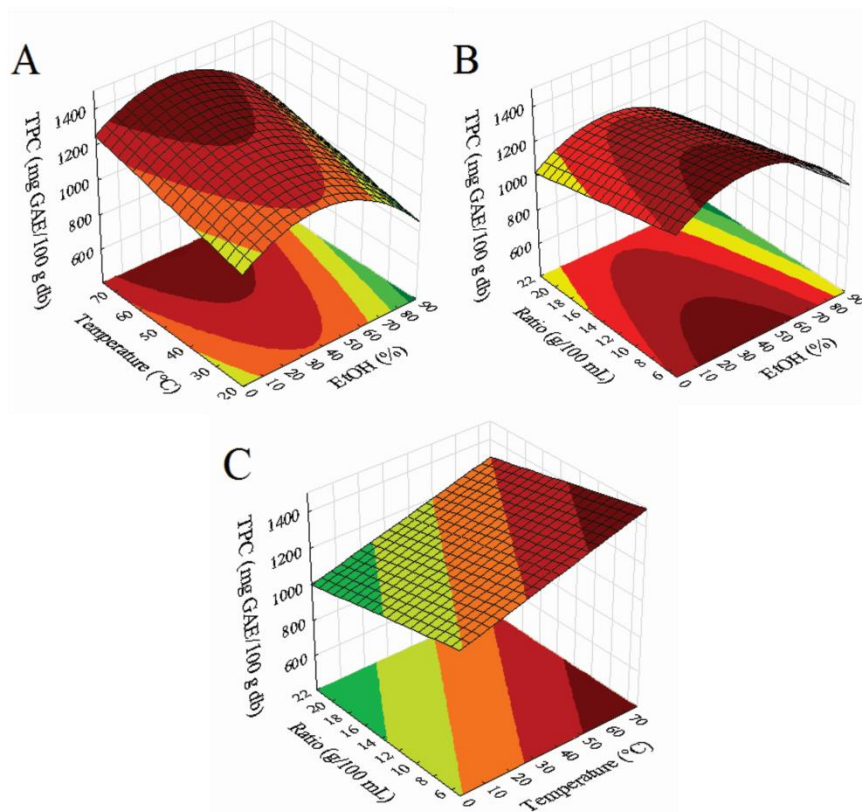


Figure 4.10 Response surface of the TPC extracted from the canola seed cake after 12 min: (A) EtOH and Temperature (Ratio 12.5); (B) EtOH and Ratio (Temperature 45 °C); (C) Temperature and Ratio (EtOH 43 %).



The TPC extraction of the canola seed cake was strongly affected by the ethanol concentration. This parameter presented a significant quadratic effect, reaching a maximum value at 35 % and 37 % of ethanol concentration after 3 and 12 min, respectively. The lower coefficient values for 12 min when compared to those for 3 min shows that, due to the longer contact time, the ethanol percentage effect was less pronounced.

Boussetta *et al.* (2013), working with flaxseed cake, found an increase in the phenolic compounds extraction yield of 1.2 to 2.5 times when 25 % of ethanol concentration was used in comparison with pure water. Similar behaviors were also found in studies that used water/ethanol mixture as the extraction solvent in different matrixes, where a maximum extraction was achieved at a specific ethanol concentration (Singh *et al.*, 2012; Bae *et al.*, 2015; Dahmoune *et al.*, 2015; Arruda *et al.*, 2016). Phenolic compounds solubility in the extraction solvent strongly influences their recovery from the vegetable matrix. Similar polarities between solvent and compounds to be extracted is the main factor that influences the solubility (Barchan *et al.*, 2014).

The extraction temperature showed a significant positive linear effect, followed by a smaller negative quadratic effect for 3 min. It can be observed in Figure 4.9 that, at lower temperatures, the extraction has a linear behavior, which becomes quadratic as the temperature increases. According to the model, the maximum amount of TPC was obtained at 65 °C. For 12 min, temperature

presented only a linear effect; however, it can be observed in Figure 4.10 A and C that, for temperatures above 65 °C, the amount of TPC did not increase significantly. Arruda *et al.* (2016) attributed the TPC extraction yield increase from araticum pulp with temperature to several factors: a) the softening and swelling of the vegetal tissues, making the cells more permeable; b) the interactions weakening between phenolic compounds with proteins and polysaccharides, favoring the diffusion rate; c) the increase in solubility of the compounds to be extracted and d) the decreasing in solvent viscosity.

High temperatures can also lead to thermal or chemical degradation of phenolic compounds (Vuong *et al.*, 2013; Arruda *et al.*, 2016). In the present work, the maximum extraction yield was obtained between 65 and 70 °C according to the responses obtained after 3 and 12 min. These results are in agreement with Alu'datt *et al.* (2011), who obtained the greatest yield of phenolic compounds from the olive seed when the highest temperature tested of 70 °C was used, even after 12 hours of extraction.

Regarding the ratio, it was observed, for both times, that as the sample mass per solvent volume decreases, the extraction of TPC increases significantly ($p < 0.05$). This fact is based on the principles of mass transfer, where the driving force is the concentration gradient between the solid and the solvent. An enhancement in the sample to solvent ratio (m:v) promotes an increase in the concentration gradient (Radojkovic *et al.*, 2012). This statement is in accordance with several authors (Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2015). The sample:solvent ratio is an important factor to take into account, since very high ratios generate excessive energy and solvent costs. Vinatoru (2015) reports that adequate ratios for bioactives compounds extraction should be around 1:5 to 1:10, except in cases where the component of interest is quite valuable and justifies the use of higher ratios.

4.2.3.4 Optimized extraction conditions

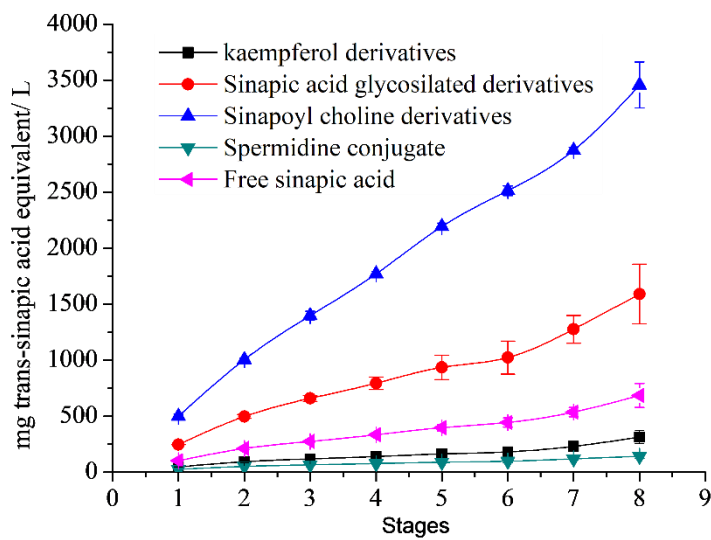
According to the models, the optimal extraction conditions were: temperature of 65 °C, 35 % ethanol concentration in water and 1:5 sample:solvent ratio, resulting in a predicted value of 1442 and 1479 mg GAE/100 g of dry sample for 3 and 12 min, respectively. The experimental values obtained using these extraction conditions were: 1368 ± 9 and 1390 ± 17 mg GAE/100 g db, which corresponds to perceptual errors of 5.1 and 6.0 %. These results showed a yield of more than 95 % of the total phenolic compounds extraction from the canola seed cake when compared to the value of 1419 ± 26 mg GAE/100 g db obtained by an exhaustive extraction.

4.2.3.5 Phenolic compounds dissolution capacity test

Consecutive extractions reusing the same solvent on new sample masses were performed and the results are presented in Figure 4.11 This Figure shows the concentration of the phenolic compounds groups of each extract plotted against the number of times that the solvent was reused

for a new extraction. The objective was to evaluate, mainly, the solubilization capacity of the phenolic compounds in the solvent, allowing its application in a multi-stage countercurrent system. Comparing to the single step extraction, Zhang *et al.* (2015) demonstrated that multi-stage countercurrent was a time-, energy-, and cost-saving extraction technology for manufacturing resveratrol from peanut sprouts.

Figure 4.11 Concentration of the different phenolic compounds groups after each consecutive extractions using the same solvent on new samples of canola seed cake.



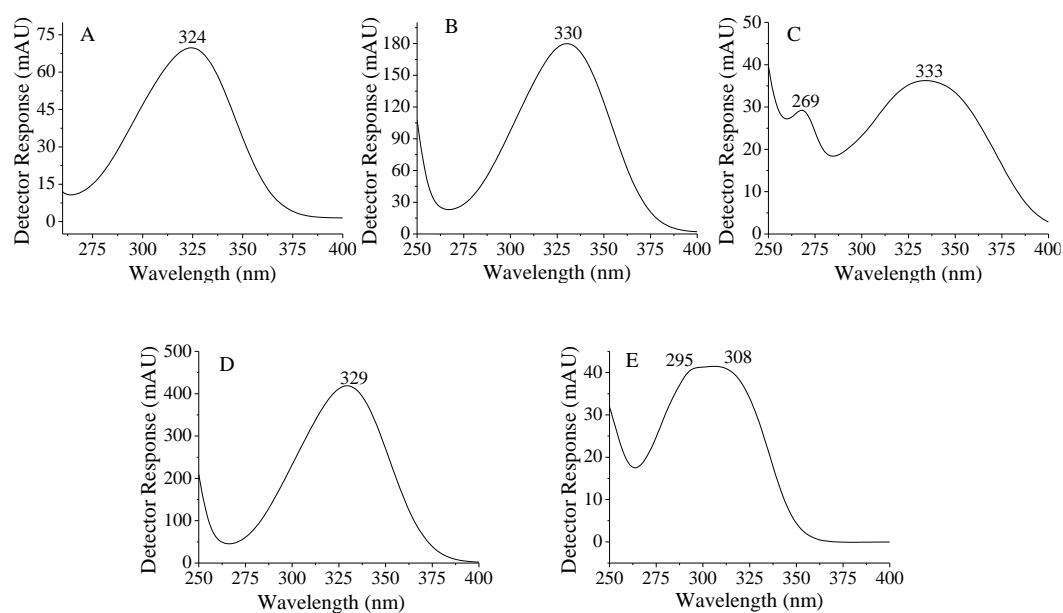
Analyzing the concentrations of the five separate groups present in the extract obtained after each consecutive extraction, it can be verified there was an almost linear increase with the number of stages. These results show the high dissolution capacity of phenolic compounds in the solvent used, allowing the reuse of the same solvent for consecutive extractions. Moreover, after eight re-extractions, the extract presented a total concentration of $6,187 \pm 654$ mg trans-sinapic acid equivalent/L (sum of the five different groups). This value is 6.7 times higher than the value obtained in a single extraction using a 12.5:100 g solid/mL solvent ratio. Therefore, a multi-stage countercurrent implementation system to extract phenolic compounds from the canola seed cake is feasible, allowing the solvent use reduction.

4.2.4 Conclusion

The present work identified the major phenolic compounds in canola seed cake, showing that the esterify forms of sinapic acid are the predominant phenolic compounds in canola seed cake; they are represented in decreasing order of content by phenolic coline esters (sinapine), sinapic acid glycoside and kaempferol derivatives. The application of ultrasound and best conditions for phenolic compounds extraction were also analyzed. The use of ultrasound did not show a significant effect on the results. Ethanol concentration and temperature were the factors that presented the most

significant effects in the extraction yield. The optimized conditions for extraction were the temperature of 65 °C, 35 % ethanol concentration in water and 5/100 sample/solvent ratio. Phenolic compounds showed a high solubility in the solvent, which may enable a countercurrent system implementation. Through this study it was found that phenolic compounds can be easily extracted from the canola seed cake, resulting in a cake with low content of antinutrients and, in contrast, an extract rich in antioxidant compounds with possible use as a natural source of antioxidants.

Supplementary Figure A1. UV spectra of the main phenolic compounds groups identified in canola seed cake. Legend: (A): *trans*-sinapic acid; (B): sinapic acid glycosylated derivatives (disinapoylgentibiose); (C): kaempferol derivatives (kaempferol-3-*O*-sinapoylsophoroside-7-*O*-glucoside); (D): sinapoyl choline derivatives (sinapine); (E): cyclic spermidine conjugate.



4.3 Artigo 3 – Application of sunflower (*Helianthus annuus*) seed cake extract as antioxidant and antifungal

Abstract

In this study it was evaluated the *in vitro* application of the phenolic extract obtained from the sunflower seed cake as a retarder of the lipid oxidation reaction in soybean oil and as an inhibitor of the fungal spores germination (*Aspergillus niger* e *A. flavus*). The sunflower seed cake extract in different concentration of total phenolic compounds (TPC) was added to soybean oil. To evaluate the antioxidant capacity of the extract, the soybean oil was submitted to three experiments: accelerated storage (65 °C during 14 days), thermo-oxidation (180 °C during 210 min) and in ambient temperature (25 °C during 232 days). The treatments with TPC were compared with those using synthetic antioxidant BHT and with the control, without any addition of antioxidants. In accelerated storage, the TPC extract showed efficacy in delaying both primary and secondary oxidative changes during storage under favorable oxidation conditions. In thermo-oxidation, the prevailing formation of secondary oxidation products was observed, by the consequent rapid conversion of the primary oxidation products. The samples containing the phenolic presented smaller formation of primary oxidation products, indicating effectiveness to retard the reaction. Similar results were observed for dienes and trienes. For both fungi tested, all the concentrations used (25, 15 and 5 µg/µL) were efficient in inhibiting the spore germination. Based on the results, phenolic compounds, especially chlorogenic acid (the major phenolic compound of sunflower seed cake), can be considered as a potential partial or even total substitute for synthetic antioxidants and an effective natural antifungal.

Keywords - chlorogenic acid, natural antioxidant, vegetables oil deterioration, waste valorization and fungicidal activity.

4.3.1 Introduction

The sunflower oil industry generates a large amount of by-products with potential applications that could be explored. From an economical point of view, sunflower seed cake (SSC) seems to be underutilized as they can be an excellent source of nutraceuticals and functional food ingredients (Sielicka e Małecka, 2017). Its high protein content makes it interesting for livestock feed production. In addition to the high protein content, the SSC is rich in phenolic compounds (1–4 % of the total mass), being the 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) the predominant component (Weisz *et al.*, 2009a; Zardo *et al.*, 2017). These phenolic compounds significantly affect the sunflower proteins quality for animal feeding and their removal is, therefore, one of the main issues concerning the production of more attractive and valued sunflower protein products (González-

Pérez e Vereijken, 2007). Phenolic compounds have been associated with beneficial effects on human health attributed to their strong antioxidant activity (Balasundram *et al.*, 2006). Utilization of plant extracts, as an alternative to chemical or synthetic antimicrobials and antioxidants, is an increasing trend in the food industry. The extracts can be used to combat foodborne pathogens and to inhibit lipid oxidation, extending shelf life (Franco Codevilla *et al.*, 2015).

Lipid oxidation is one of the most important deteriorating processes in the oil industry, resulting in losses of oils nutritional value as well as changes in color, flavor and other physiological properties (W¹Sowicz *et al.*, 2004). In order to avoid lipid oxidation in vegetable oils, synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tertiary butyl hydro-quinone (TBHQ) are commonly used. However, the use of synthetic antioxidants has been associated with several health side effects and toxicity (Taghvaei e Jafari, 2015). Despite of the controversial discussion regarding synthetic antioxidants toxic effects, it is interesting to search for natural alternatives.

Recently, researches have been carried out concerning the use of natural plant extracts with antioxidant activities in edible oils (Taghvaei e Jafari, 2015). Sunflower seeds polyphenols such as caffeic, chlorogenic and ferulic acids have been reported in many studies to exert high antioxidative activity, which is beneficial from a technological and biofunctional point-of-view (De Leonardis *et al.*, 2003; De Leonardis *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2009; Muhammad Anjum *et al.*, 2012).

The primary lipid oxidation products are the hydroperoxides, which are unstable and readily decomposed to form mixtures of volatile aldehyde compounds, commonly named as secondary oxidative products (Abdelazim *et al.*, 2013). The primary and secondary oxidation products can be evaluated by measuring the peroxide value and the p-anisidine value, respectively. The oxidative stability of oils and fats, added with antioxidants, can be determined during storage under normal or accelerated conditions (Ramadan e Mörsel, 2004). Accelerated oxidation tests are conducted at high temperatures in order to shorten the duration of the experiments.

It has been reported that phenolic compounds present in plants have protective effects against pathogen attacks. These compounds are biodegradable and renewable alternatives to the use of synthetic antimicrobials (Cushnie e Lamb, 2005). In recent years, polyphenols have received a great deal of attention, due to their diverse biological functions as discussed by Zuk *et al.* (2014), Bajko *et al.* (2016) and Martínez *et al.* (2017), among others. The mechanism of this action is mainly associated with the ability to inhibit the proteolytic enzyme activity, to disrupt the synthesis of nucleic acids and to increase the permeability of the cell wall to exogenous substances (Cushnie e Lamb, 2005).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* application of the phenolic extract obtained from sunflower seed cake to detain the lipid oxidation reaction in soybean oil and to act as an antimicrobial agent against selected fungi.

4.3.2 *Material and methods*

The soybean oil used in the experiments, supplied by Oleoplan S.A. (Veranópolis, Brazil), was extracted using hexane. The oil was degummed and was free from any kind of antioxidants.

The fungi used for the tests belong to the genus *Aspergillus* and are of the *niger* and *flavus* species, which are deposited in the cultures bank of the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, ICTA - UFRGS.

4.3.2.1 *Phenolics compounds extract*

Natural antioxidants used in this work were extracted from the sunflower seed cake, according to the previous study carried out by Zardo *et al.* (2017). 10 g of sunflower seed cake were kept under constant stirring in a 43 % ethanol in water solution at 70 °C for 1 min of ultrasound pretreatment and 9 minutes of diffusion. The extract was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom 804, Fisatom, SP, Brazil) at 50 °C until a concentration of 10 g of GAE/L was reached. After, it was stored at -20 °C for further use.

4.3.2.2 *Determination of total phenolic content*

Determination of total phenolic content was performed using the Folin-Ciocalteu colorimetric method, according to Singleton *et al.* (1999) with some modifications. A mixture of 850 µL of distilled water, 200 µL of sunflower seed cake extract in an appropriated dilution, 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (5 %, v/v) and 850 µL of sodium carbonate buffer (3 %, w/v) were placed in test tubes. After 1 h of reaction in the dark, the absorbance was measured at 765 nm. Quantitation was carried out using curves constructed with gallic acid in the range of 10 to 90 µg/mL and the total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents per liter of sunflower seed cake extract (mg GAE/ L).

4.3.2.3 *Evaluation of lipid oxidation*

The stability of soybean oil was evaluated by adding different concentrations of natural and synthetic antioxidants. These antioxidants were compared using two different tests: accelerated storage and thermal oxidation. The sample preparation for both tests is described as follow.

Each treatment was carried out by placing approximately 75 g of oil in an opened aluminum container (7 cm diameter and 2.5 cm height). Five samples of oil added by different antioxidants concentration were submitted to the accelerated storage test: 100 ppm of BHT; 50 ppm BHT/50ppm TPC; 100, 500 and 1000 ppm of TPC. A control sample, without any antioxidant, was used for comparison. The BHT antioxidant solution, was prepared dissolving it in ethanol. For better homogenization of the extracts in the oil, each sample was subjected to 30 seconds of ultrasound treatment (VC 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA).

The accelerated oxidation was carried out in the dark in an oven at 65 ± 2 °C. Aliquots of samples (6 g) were collected in amber flasks after 1, 3, 5, 9 and 14 days and stored at 5 °C until analysis. The thermo-oxidation treatments were carried out in an oven at 180 ± 5 °C for 210 min. Aliquots of samples (6 g) were collected in amber flasks after 30, 90, 150 e 210 min. The experiments were performed in duplicate.

4.3.2.4 Peroxide value

The peroxide value was determined according to the official methods of (American Oil Chemists, 1993) with some modifications. Briefly, the oil sample (3 g) was dissolved in glacial acetic acid (9 ml) and chloroform (6 ml) (3:2 v/v). Then, 0.6 mL of a saturated KI solution was added and the mixture was kept in the dark for 5 min. After, 45 mL of distilled water and 0.6 mL of 1 % starch indicator solution in water were added. The mixture was titrated against sodium thiosulfate (0.01 N) until the blue color disappeared. The peroxide value (mEq of oxygen/kg) was calculated using the following equation:

$$\text{Peroxide value (meq } O_2/\text{kg oil)} = ((A - B) \times N \times 1000)/w \quad (4.6)$$

where A is the volume of Na_2SO_3 solution spent in the titration in mL; B is the volume of Na_2SO_3 spent in the titration of the blank in mL; N is the normality of Na_2SO_3 solution and w is the weight of the oil sample in g. The analysis were performed in duplicate.

4.3.2.5 P-anisidine value

The p-anisidine value was determined according to the standard method of (American Oil Chemists e Firestone, 1998) with some modifications. To prepare solution A, 500 mg of each oil sample was weighted into a 10 mL volumetric flask and the volume was filled with isooctane. The absorbance of this solution its was measured at 350 nm against an isooctane blank, obtaining the absorbance A_1 . An aliquot of 5 ml of solution A and 5 ml of isooctane were transferred to 2 separate test tubes and 1 ml of 0.25 % w/v solution of p-anisidine in acetic acid (0.125 g of p-anisidine in 50 mL of glacial acetic acid) was added to each tube. After 10 minutes, the absorbance (A_2) was measured at 350 nm against isooctane containing p-anisidine as blank. The p-anisidine value was calculated according to Equation 4.7:

$$p - \text{anisidine value} = 10 \times (1.2 \times (A_2 - A_1))/m \quad (4.7)$$

4.3.2.6 Conjugated dienes and trienes

For the conjugated dienes and trienes value determination, a methodology based on AOCS (American Oil Chemists, 1993) was used, which consists in the oil dilution in isooctane, followed

by an absorbance measurement in a spectrophotometer. From redilutions of solution A with isooctane, the absorbances were measured at wavelengths of 232 and 270 nm for dienes and trienes, respectively, against an isooctane blank. The absorbances were within the ideal reading range of 0.2 to 0.8.

4.3.2.7 *Antifungal test*

The sunflower extract ability of inhibit fungal spore germination was tested through the technique described by Martínez *et al.* (2017), with some modifications. The activity was performed against the fungi *Aspergillus niger* and *A. flavus*. A suspension containing 10^4 spores/mL of each fungus was inoculated into concave plates containing YEST solution (2 % yeast extract, 20 % sucrose, pH 6.5) and different extract concentrations (25, 15 and 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) to obtain a final volume of 100 μL . The plates were placed in petri dishes and incubated at 25 °C for 36 hours under controlled relative humidity (80-90 %). As a control, the extract was replaced by the same volume of water. The spores were observed under optical microscope and those that presented germ tube length greater than their radius were considered germinated. Four counts of 100 spores were performed per replicate.

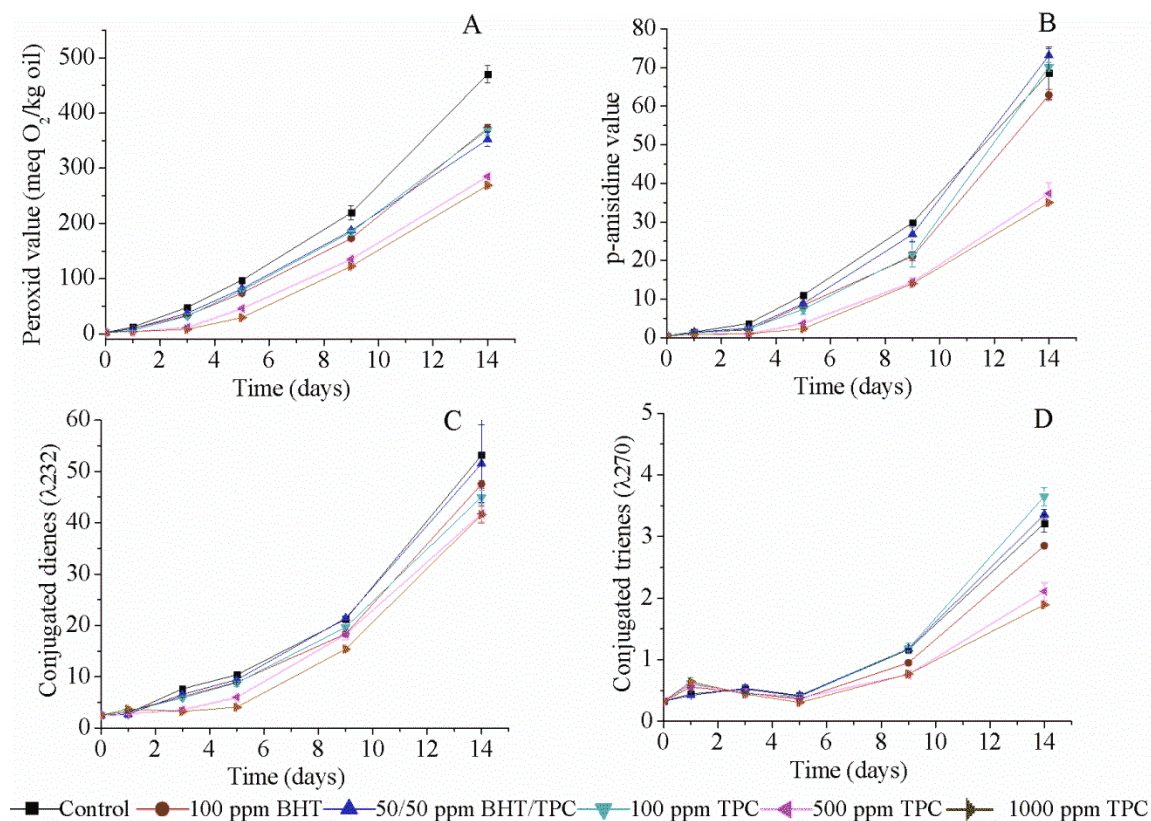
4.3.3 *Results and discussion*

4.3.3.1 *Accelerated storage*

Figure 4.12 shows the compounds formation in the oxidation of the soybean oil samples over time. Different concentrations of TPC, BHT and a combination of both antioxidants were analyzed during the heating process at 65 °C for 14 days.

As can be seen in Figure 4.12A, the peroxide value of soybean oil samples increased during the accelerated storage test for all treatments, showing the oxidation progression. This increase in peroxide value is attributed to the formation of hydroperoxides, i.e. primary oxidation products (Franco *et al.*, 2018). The control sample presented the highest increase in peroxide value, reaching a maximum value of 470 meq O_2/kg oil. Samples with antioxidants BHT and TPC lower peroxide values than the control throughout the experiment, revealing good antioxidant efficacy in the stabilization of soybean oil. There were no significant differences between the samples with 100 ppm of BHT, 50/50 ppm of BHT/TPC and 100 ppm of TPC, being the difference to the control around 24 % of peroxide value after 14 days of experiment. These results demonstrate that the natural antioxidant presented the same antioxidant effect as the synthetic (BHT) when used in the same concentration and could be replaced without any loss of stability. It can also be observed, that there was no synergistic effect between the two antioxidants in the sample containing 50/50 ppm BHT/TPC.

Figure 4.12 Accelerated storage test: A) Peroxide value, B) p-anisidine value, C) Conjugated dienes, and D) Conjugated trienes, measured in soybean oil during storage time at 65 °C.



Samples containing 500 and 1000 ppm of TPC showed the highest oxidative inhibitions along the 14 days of the experiment; these samples had final peroxide values around 40 % lower than the control sample. Agregán *et al.* (2017) also verified similar results using aqueous extracts of seaweeds to inhibit the oxidation of canola oil under accelerated storage conditions at 60 °C during 16 days.

According to the quality parameters stipulated by the Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) (Brazil, 2005), a soybean oil with a peroxide value higher than 10 meq O₂/kg oil is considered unfit for consumption. The control sample reached a peroxide value of 12 ± 1 meq O₂/kg oil in the first day of storage, while all other samples had a peroxide value below limit. After 3 days, only the sample containing 1000 ppm of TPC had a peroxide value lower than 10 meq O₂/kg oil (8.16 ± 0.14 meq O₂/kg oil). From the fifth day on, all samples were above limit.

Diene value (Figure 4.12C) also represent the formation of hydroperoxides and increased over time. The initial diene value of the soybean oil was 2.5, reaching the value of 53 ± 10 after 14 days of experiment for the control sample. There was no significant difference between the control sample and samples containing 100 ppm of BHT and TPC and the mixture of 50/50 ppm. After the third day of treatment, the samples containing 500 and 1000 ppm TPC had a lower diene content

than the other samples. Formation of high contents of conjugated dienes may be related to the presence of higher contents of polyunsaturated fatty acids (Iqbal e Bhanger, 2007).

Changes in p-anisidine value, which represent the secondary oxidation products, reflecting the magnitude of aldehyde formation during the oxidative degradation of oil (Chemat *et al.*, 2011), are shown in Figure 4.12B. The control p-anisidine value reached a maximum of 73.1 ± 1.8 after 14 days of storage from an initial value of 0.53 ± 0.04 . An increase in the p-anisidine value was noted during storage. As in the peroxide value analysis, the results of samples containing 100 ppm of BHT and TPC and the mixture of 50/50 ppm did not presented significant differences between them. An inhibitory effect against secondary lipid oxidation was observed in samples with 500 and 1000 ppm of TPC, presenting the lowest p-anisidine value, around 50 % lower than the control sample.

Conjugated trienes may be produced by dehydration of conjugated diene hydroperoxides (Iqbal e Bhanger, 2007) and are considered secondary oxidation products. Figure 4.12D shows that the conjugated triene values were stable until the fifth day, when they started increasing. Once again, the samples containing higher amounts of TPC (500 and 1000 ppm) presented lower values for secondary oxidation products. Franco *et al.* (2018) found similar results testing antioxidants extracted from peanut skin to prevent oxidative processes during soybean oil storage. They found that the natural antioxidant concentration had a logarithmic effect on the lipid oxidation.

The protection offered by the sunflower seed cake extract is comparable with, or in some cases better than, that of the widely used synthetic antioxidant BHT. The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which can play an important role in adsorbing and neutralising free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides (Osawa, 1994).

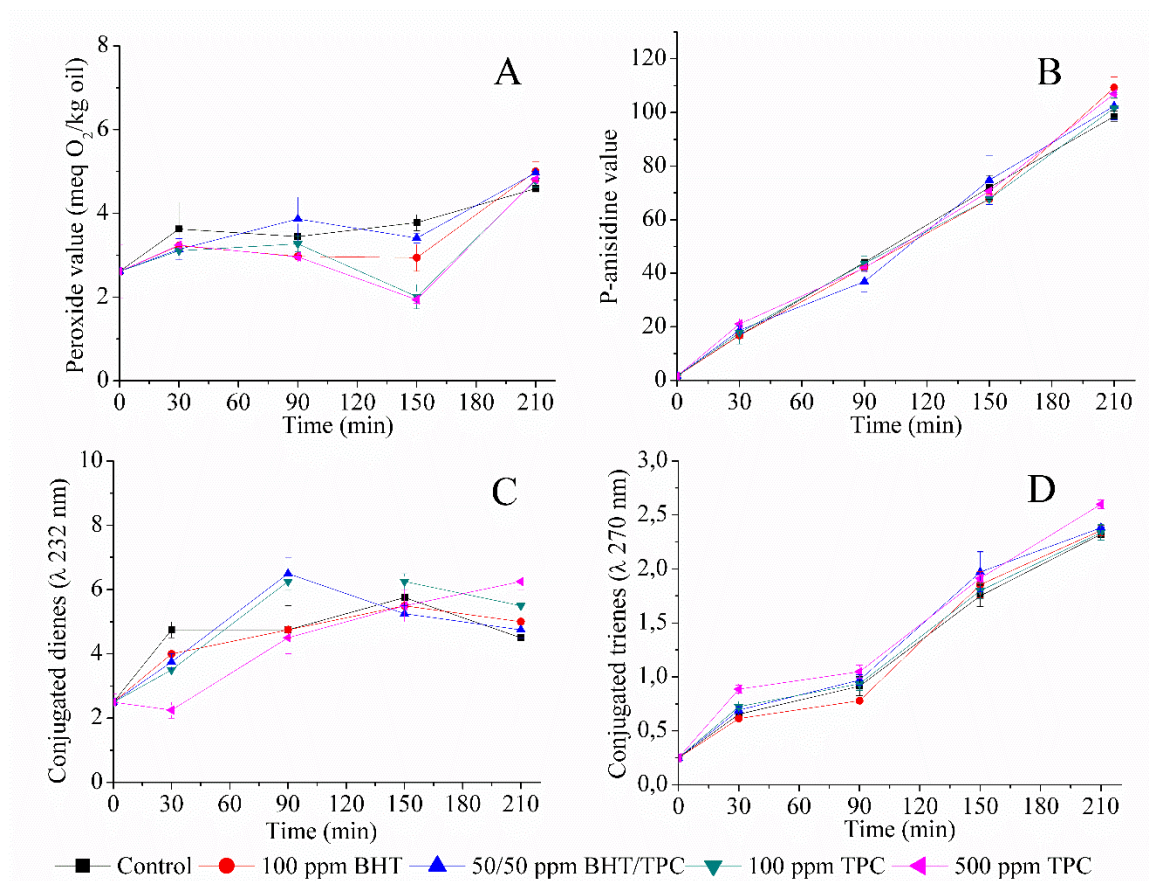
4.3.3.2 Thermo-oxidation

Figure 4.13 shows the oxidation changes of the soybean oil samples with different antioxidants concentrations during a heating process at 180 °C for 210 min. Since the protective effect offered using 1000 ppm of TPC was comparable to the samples with 500 ppm under accelerated storage, experiments with 1000 ppm were not performed for thermo-oxidation.

As shown in Figure 4.13A, in the first 30 min of treatment, the peroxide value was constant for the sample with 500 ppm of TPC and increased for the remaining treatments. After 90 min of treatment, the peroxide value remains between 5 and 7 meq O₂/kg of oil until the end of the treatment. This can be explained by the instability that hydroperoxides exhibit at high temperatures, converting, almost immediately after their formation, into oxidation by-products or other degradation products (Sulieman *et al.*, 2006; Kiran e Sundresan, 2015). This is corroborated by the lower peroxide value during frying (180 °C) compared to heating (65 °C). The results show that the

peroxide value is not a reliable indicator to monitor the oil quality, especially when subjected to such extreme conditions, which is in agreement with literature reports (Abdulkarim *et al.*, 2007).

Figure 4.13 Thermo-oxidation test results: A) Peroxide value, B) p-anisidine value, C) Conjugated dienes, and D) Conjugated trienes measured in oil during storage time at 180 °C.



Regarding the conjugated dienes, it is observed in Figure 4.13C that these compounds presented a low increase only in the first 30 min of treatment, ranging from 2.6 to 3.2. Values were between 2 and 3.78 until 150 min, increasing at time of 210 min to values around 4.8. A low increase in conjugated dienes can be explained due to their conversion as observed for the peroxide value.

The p-anisidine value (Figure 4.13B), which determines the secondary oxidation compounds content, showed a more significant increase during the treatment at 180 °C than at 65 °C. It is seen a linear increase in the p-anisidine value for all samples; this happened because the less stable primary oxidative products (hydroperoxides) decomposed to form aldehydic compounds (Herchi *et al.*, 2016). No significant differences ($p > 0,05$) were observed in p-anisidine value among the different treatments, ranging from 1.6 to 109.0.

For the conjugated trienes (Fig 4.12D), a similar behavior concerning p-anisidine value analysis was observed. The analysis of conjugated trienes also evaluates the formation of secondary oxidation compounds from the conjugated dienes. Choe and Min (2007) related that the synthetic

and natural antioxidant can decrease oil oxidation, but they become less effective at frying temperature.

In the present work, the low TPCs antioxidant efficacy after 210 minutes of the experiment can be justified by the insufficient amount of phenolic compounds added. Farag *et al.* (2007) tested the concentrations of 400, 800, 1600 and 2400 ppm of TPC extracted from crude olive leaf as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating (180 °C) and found a significant antioxidant effect only at concentrations higher than 800 ppm.

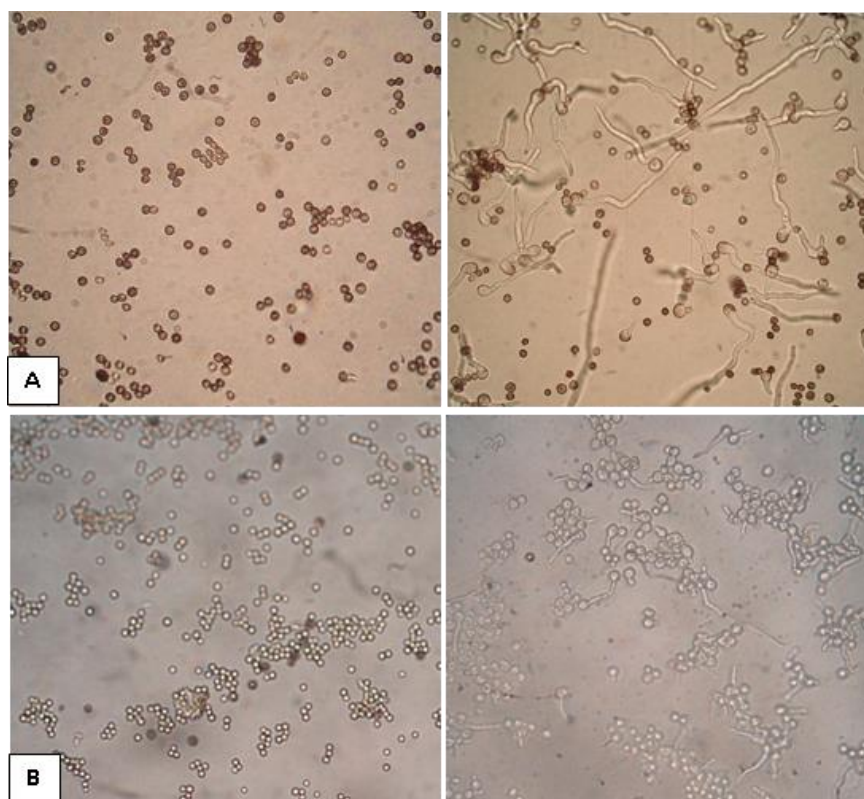
4.3.3.3 Antifungal effect

Aspergillus niger and *Aspergillus flavus* were incubated for 36 hours in concave plates containing YEST solution in the presence of different concentrations of TPC and then analyzed by optic microscopy. Figure 4.14 illustrates the antifungal activity of 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of TPC solution; spores incubated in water (control) (right side) germinated producing hyphae while a complete inhibition of the spore germination was observed for both fungi when TPC was present (left side).

Figure 4.14 Sunflower extract effect on spore germination of *Aspergillus niger* (A) and *A. flavus* (B) after 36 hours of incubation in YES broth at 25 °C and TPC concentration of 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Images on the right side correspond to the inoculated samples without the extract (control).

Observation under optical microscope (increase of 40X).



All the concentrations used (25, 15 and 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were efficient in inhibiting the spore germination of both fungi tested, *Aspergillus niger* and *A. flavus*. The reduction can be considered

of 100 %, once it was not possible to observe the formation of germ tubes in the treated samples (Figure 4.14). The development of these structures in the control treatment was notable after 36 hours of cultivation. No morphological changes were observed. It has been suggested that the TPC present in the sunflower seed cake extract composed mainly of chlorogenic acid, rapidly changes the permeability of the cell membrane of fungal spores, causing loss of their viability (Martínez et al., 2017). Lou *et al.* (2011) in an investigation against pathogenic microorganisms suggested that chlorogenic acid bound to the outer membrane, disrupts the membrane, exhausts the intracellular potential, and releases cytoplasm macromolecules, which lead to cell death.

Previous viability tests and vital dye staining analysis demonstrated that chlorogenic acid, the main phenolic in sunflower seed cake, induces fungal cell lysis. Its fungicidal activity involves an early membrane permeabilization of the spores. These tests showed that the antifungal activity of CGA against phytopathogenic fungi is relevant in horticulture and agriculture, highlighting the potential of CGA-enriched wastes and by-products to be used as biofungicides (Martínez *et al.*, 2017).

Considering the growing interest in replacing the synthetic fungicides by natural antifungals, the results reported here suggests evidence that the CGA-enriched extracts could be considered biofungicides to be used in foods and crop protection. Further studies are required to prove the efficacy of the antifungal action of the TPC present in the sunflower seed cake.

4.3.4 Conclusion

The present work aimed to investigate the use of phenolic extract from sunflower seed cake as an inhibitory of soybean oil oxidation and as antifungal in two types of fungi: *Aspergillus niger* and *A. flavus*.

The addition of the TPC extract to the oil showed efficacy in delaying both primary and secondary oxidative changes during accelerated storage at 65 °C. In the thermo-oxidation test, at 180 °C, it was observed the rapid formation of secondary oxidation compounds, which resulted from the high lipid oxidation. For this condition, it was verified that, to control lipid oxidation, additions of higher amounts of antioxidants would be required.

The antifungal application of the extract demonstrates a potential use to contain spore germination, requiring further studies to prove its effectiveness as an antifungal.

Based on the results, it is possible to conclude that the incorporation of sunflower seed cake extract, not only provided additional protection to vegetable oils, but also improved their nutritional values.

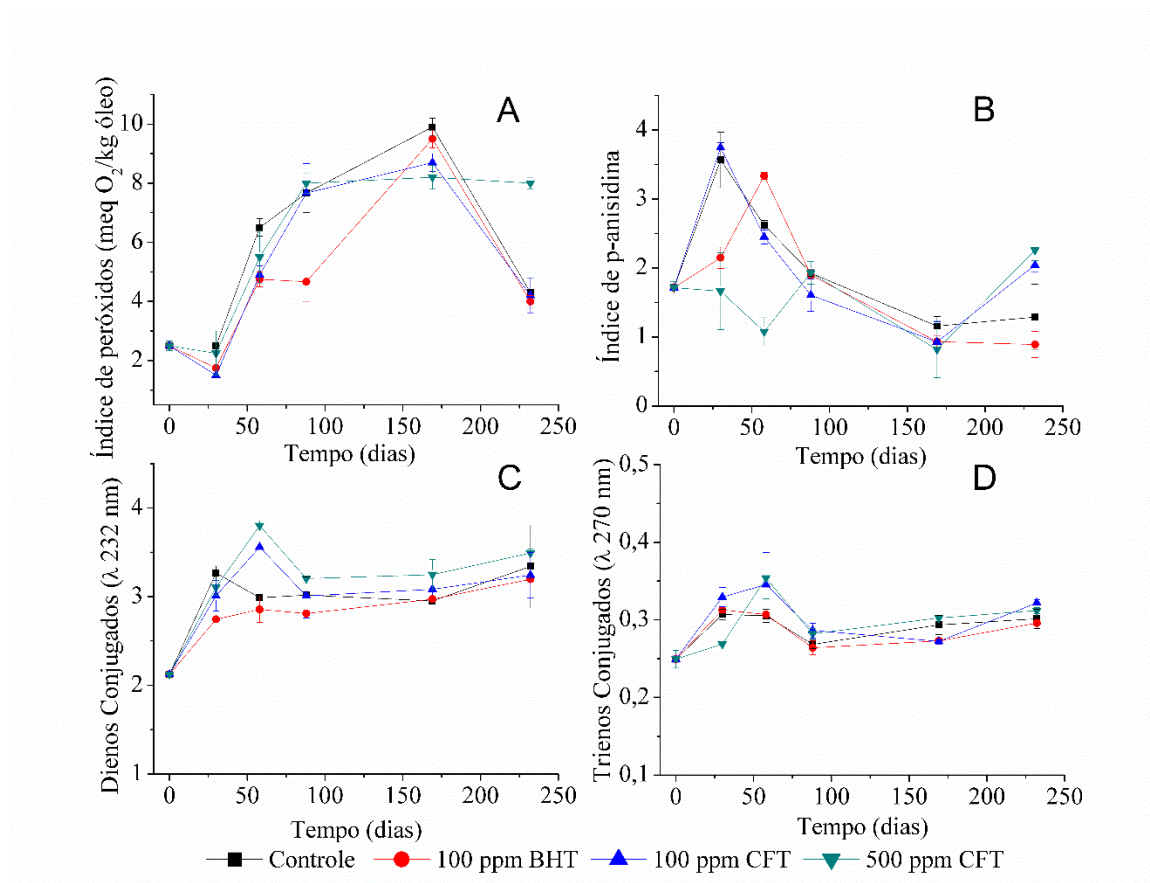
4.4 Resultados adicionais

Nesta seção serão discutidos alguns resultados de experimentos que não foram incluídos nos artigos pois apresentaram incertezas em suas conclusões; são apresentados, contudo, as possíveis justificativas para os resultados encontrados.

4.4.1 Teste de estabilidade do óleo de soja em temperatura ambiente

O efeito antioxidante do extrato fenólico obtido da torta de semente de girassol foi avaliado através do teste de estabilidade do óleo de soja nas condições de armazenamento a 25 °C durante 232 dias. Os tratamentos realizados e os respectivos resultados estão apresentados na Figura 4.14.

Figura 4.14 Teste de estabilidade do óleo de soja em temperatura ambiente: A) Índice de peróxidos, B) Índice de p-anisidina, C) Dienos conjugados, e D) Trienos conjugados medidos durante estocagem a 25 °C.



Na Figura 4.14 A pode ser observado um aumento do índice de peróxidos para todos os tratamentos até um valor de aproximadamente 9 meq O₂/kg de óleo após 169 dias de estocagem, com uma diminuição de seus valores para aproximadamente 4, com exceção da amostra contendo 500 ppm de CFT. Para o teste de dienos conjugados (Figura 4.14C) também se percebeu um aumento de seu teor de 2 para aproximadamente 3 a partir do dia 30, mantendo-se constante para

todos os tratamentos até o final do experimento. Para os testes que medem os compostos de oxidação secundários não se verificaram alterações de seus níveis para qualquer tratamento.

Resultados divergentes aos obtidos neste estudo foram encontrados na literatura. Sayyari e Farahmandfar (2017) avaliaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos totais extraídos da planta *Salix aegyptiaca L.* na estabilização do óleo de girassol quando adicionado de 1200 ppm destes antioxidantes naturais assim como de 100 ppm do antioxidante sintético TBHQ. O experimento foi conduzido durante 60 dias de estocagem em frascos âmbar destampados e a 25 °C. Para o índice de peróxidos, esses autores verificaram que a amostra contendo o extrato natural apresentou uma taxa de formação de peróxidos bastante reduzida em relação ao controle, revelando boa eficácia para estabilização de óleos. Outro estudo de estabilização de óleos com compostos fenólicos extraídos da planta *Biarum bovei* foi realizado por Farahmandfar e Ramezanizadeh (2018). Neste estudo, diferentes concentrações de compostos fenólicos (0, 200, 800, e 1400 ppm), assim como 100 ppm de BHT, foram adicionados ao óleo de canola durante 60 dias a 20 °C. Ao analisar os resultados foi constatado que todos os tratamentos apresentaram eficácia na redução da oxidação lipídica deste óleo, sendo que quanto maior a concentração utilizada, maior foi o efeito antioxidante observado.

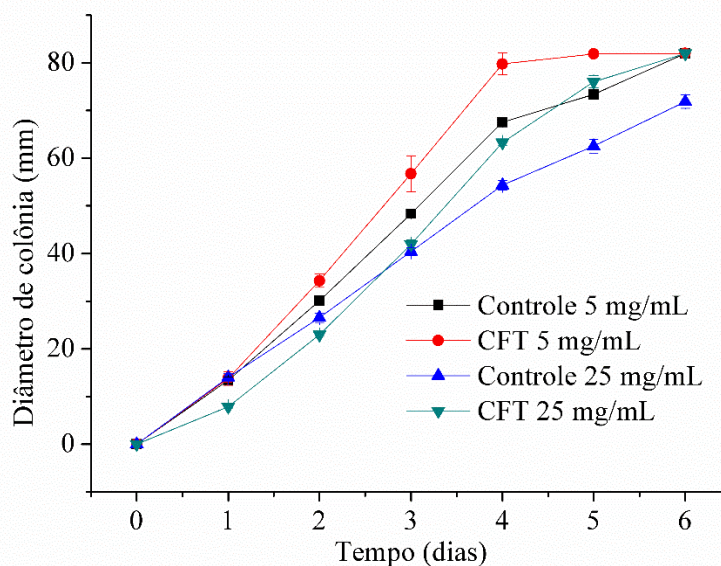
Ao analisar os resultados deste teste com os demais experimentos deste estudo e em comparação com estudos publicados na literatura, verifica-se a existência de incoerência entre os resultados. Como hipótese para essa diferença, indica-se uma falha no preparo da amostra que pode ter prejudicado a dispersão dos compostos fenólicos na amostra de óleo.

Como descrito na Seção 3.6 dos materiais e métodos, a adição dos compostos fenólicos extraídos da torta de semente de canola foi feita através de um extrato aquoso, apresentando imiscibilidade em óleo. Para favorecer a dispersão no óleo dos compostos fenólicos presentes na fase aquosa, a solução foi submetida a um tratamento com ultrassom até a formação de uma emulsão. Para o caso dos tratamentos sob aquecimento (estocagem acelerada – 65 °C e termoxidação – 180 °C), a água presente foi rapidamente evaporada. Para o tratamento a 25 °C não ocorreu a evaporação da água e, após algum tempo do preparo da emulsão, as fases foram se separando novamente, resultando em um sistema bifásico. Supõe-se que os compostos fenólicos presentes no extrato tenham ficado retidos na fase aquosa (até por que possuem caráter polar) e, com isso, não estavam mais disponíveis para atuarem como antioxidantes no óleo. Como sugestão para evitar a formação desta solução bifásica, propõe-se utilização destes compostos fenólicos na forma de um pó solúvel em óleo, podendo este ser atomizado ou liofilizado, ou adicionado de um emulsificante, conforme realizado por Farahmandfar e Ramezanizadeh (2018).

4.4.2 Avaliação do efeito do extrato fenólico de torta de girassol sobre crescimento micelial dos fungos *Aspergillus niger*

O efeito do extrato fenólico extraído da torta da semente do girassol sobre o crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger* foi investigado e os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 4.15.

Figura 4.15 Avaliação do crescimento do fungo *Aspergillus niger* durante 6 dias de cultivo a 25 °C em meio BDA na presença das diferentes concentrações de compostos fenólicos totais (5 e 25 mg/mL)



Para o tratamento com 5 mg/mL de compostos fenólicos totais no meio de cultura não se verificou efeito positivo para inibição do crescimento, sendo que, a partir do dia 2 do experimento, as colônias com a presença de extrato fenólico apresentaram diâmetros maiores que o crescimento controle.

No tratamento contendo 25 mg/mL de compostos fenólicos, observa-se que os diâmetros de colônia medidos nos dias 1 e 2 foram menores que as amostras sem a presença de extrato, indicando com isso indícios de inibição de crescimento fúngico do extrato fenólico durante os 2 dias iniciais de tratamento. A partir do terceiro dia de experimento, observa-se uma inversão nos diâmetros das colônias, ou seja, o tratamento com a presença de compostos fenólicos passou a apresentar diâmetro de colônia maior que o seu tratamento controle.

Esse comportamento de crescimento fúngico pode ser explicado por duas razões:

- primeiramente pela oxidação dos compostos fenólicos; os compostos fenólicos, por serem considerados antioxidantes, reagem facilmente com o oxigênio (Embuscado, 2015). Como a colônia de fungos se desenvolve na superfície do meio de cultivo e, portanto, está exposta

diretamente à atmosfera, os compostos fenólicos são rapidamente oxidados perdendo, com isso, sua atividade antifúngica;

- outro fator que pode ter estimulado o crescimento fúngico está relacionado à composição do extrato fenólico obtido da torta de semente de girassol; além dos compostos fenólicos, também estão presentes outros compostos químicos como, por exemplo, carboidratos, proteínas e micronutrientes, os quais podem contribuir como substrato para o metabolismo fúngico, ocasionando seu rápido crescimento. O girassol apresenta em sua composição os açúcares sacarose, rafinose, glicose, galactose e frutose em ordem de maior para menor concentração, totalizando 44,56 mg/g de girassol em base seca (Baümler *et al.*, 2016), os quais são facilmente extraídos junto aos compostos fenólicos.

Observa-se também que os controles das amostras que contém 25 mg/mL de compostos fenólicos apresentaram diâmetros de colônia inferiores aos controles das amostras contendo 5 mg/mL. Esse fato pode ser justificado pela metodologia de preparo das amostras, visto que, nas amostras controle, o volume de extrato fenólico que foi adicionado foi substituído por água, diluindo com isso a concentração de substrato do meio de cultivo.

Em decorrência desses resultados sugere-se fortemente, para trabalhos futuros, o estudo da purificação deste extrato fenólico, visando à obtenção de uma solução de compostos fenólicos sem a presença de outros compostos químicos que podem interferir na eficácia de sua aplicação.

Capítulo 5. Considerações finais

Na primeira parte deste trabalho foram estudadas as extrações dos compostos fenólicos das tortas de semente de girassol e canola utilizando-se a tecnologia de ultrassom como auxiliar de extração. Neste estudo foram avaliadas as condições de extração: temperatura, concentração de etanol, razão de solvente/amostra e aplicação de ultrassom, sendo que as condições ótimas de extração foram determinadas através da metodologia de superfície de resposta.

Os resultados obtidos para ambas as tortas analisadas ajustaram-se satisfatoriamente a um modelo polinomial de segunda ordem. A concentração de etanol e a temperatura foram os fatores que apresentaram os efeitos mais significantes para o rendimento da extração dos compostos fenólicos. O ultrassom apresentou eficácia apenas para a extração de compostos fenólicos da torta de girassol. O efeito do ultrassom se mostrou mais considerável em temperaturas mais baixas, sendo que, em temperaturas mais altas, o efeito da temperatura preponderou sobre o efeito do ultrassom. Com isso, percebe-se que os compostos fenólicos presentes nas tortas de canola e girassol podem ser facilmente extraídos, resultando num concentrado proteico de maior valor nutricional para a alimentação animal. Ainda se verificou uma elevada solubilidade desses compostos em solvente aquoso, possibilitando o desenvolvimento de tecnologias de extração com reduzido uso de solvente.

Em contrapartida à redução do conteúdo de compostos fenólicos das tortas, obteve-se um extrato rico em compostos fenólicos que pode ser potencialmente utilizado como fonte de compostos bioativos em substituição aos sintéticos. Nesse contexto, a segunda etapa deste trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de aplicação dos compostos fenólicos presentes nesses extratos como alternativas naturais aos produtos de origem sintética. Para esse estudo, foi escolhido o extrato obtido da torta de semente de girassol, sendo testada sua capacidade estabilizante de óleos e antifúngica.

No estudo da capacidade antioxidante do extrato em óleo de soja, obtiveram-se resultados bastante satisfatórios no teste de estocagem acelerada a 65 °C, onde constatou-se que concentrações mais elevadas de compostos fenólicos foram mais eficientes na redução da oxidação lipídica ao longo de todo período de estocagem. Em comparação ao antioxidante sintético BHT, quando utilizados na mesma concentração de 100 ppm, os compostos fenólicos apresentaram resultados de formação de compostos de oxidação no óleo similares. Através deste teste verificou-se o sucesso na substituição do antioxidante sintético BHT pelos compostos presentes no extrato fenólico. Para o teste de termoxidação a 180 °C, apenas nos primeiros 30 min de teste foi verificado uma redução no índice de peróxidos para o tratamento com 500 ppm de compostos fenólicos, não se verificando

diferenças entre os demais tratamentos e análises realizadas. Neste experimento observa-se uma elevada formação de compostos secundários de oxidação em relação aos compostos primários, o que pode ser explicado pela formação de compostos secundários de oxidação quase que simultânea à formação de produtos primários, devido às altas temperaturas e a presença de oxigênio a que as amostras foram submetidas. Em um terceiro teste de estocagem em condições normais de armazenamento durante 242 dias, a 25 °C, em frascos tampados e ao abrigo de luz, não foram verificadas diferenças entre os diversos tratamentos dos testes realizados. Este resultado deve estar associado a uma má dispersão dos compostos fenólicos no óleo tratado, e com isso, não oferecendo proteção contra oxidação.

No estudo da capacidade antifúngica do extrato, foram avaliados o efeito do extrato de girassol sobre a germinação de esporos de *Aspergillus niger* e *A. flavus* após 36 horas de incubação em caldo YES a 25 °C e sobre o crescimento micelial do fungo *Aspergillus niger*. Nenhuma das amostras contendo compostos fenólicos apresentaram germinação dos esporos, enquanto que as amostras controle germinaram. Este resultado contribui para o efeito antifúngico dos compostos fenólicos, porém não comprovam este efeito por si só. No teste de crescimento micelial, o crescimento do fungo *Aspergillus niger* em meio contendo 5 e 25 mg/mL de compostos fenólicos durante 6 dias, geraram resultados incoerentes e de difícil interpretação.

As seguintes conclusões gerais podem ser tiradas do presente trabalho:

- os compostos fenólicos das tortas das sementes de girassol e canola são de fácil extração, gerando um concentrado proteico mais puro e de maior valor agregado, assim como um extrato com propriedades bioativas;
- a aplicação da tecnologia de ultrassom contribuiu para a extração dos compostos fenólicos da torta de semente de girassol, podendo ser utilizada para reduzir o tempo e temperatura de extração e nesse contexto reduzir o gasto energético geral do processo de extração;
- a aplicação do extrato fenólico da torta de semente de girassol como estabilizante do óleo de soja apresentou efeito antioxidante similar ao sintético (BHT), podendo aumentar sua eficácia quando utilizado em maiores concentrações. Esses compostos também apresentaram indícios de ação antifúngica, indicando potencial aplicação como agente antifúngico natural em alimentos.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho dividiu-se basicamente em dois objetivos: no estudo da extração dos compostos fenólicos totais das tortas das sementes de canola e girassol e no estudo da aplicação deste extrato fenólico como antioxidante e antifúngico naturais alternativos aos conservantes sintéticos.

A extração dos compostos fenólicos das tortas de girassol e canola foi atingido com êxito, obtendo com isso um concentrado proteico com baixo teor de compostos fenólico e consequente maior valor nutritivo. O concentrado proteico pode ser utilizado diretamente na alimentação animal e humana, se obtido de forma adequada, mediante completa remoção do etanol. Entretanto, o extrato contendo os compostos fenólicos ainda não é utilizado em larga escala na indústria e o estudo de sua potencial aplicação se faz bastante relevante. Como próximo passo para a implementação industrial de um processo de extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais, sugere-se um estudo de viabilidade energética e econômica. Neste estudo seriam investigados e comparados diferentes processos de extração, por batelada ou contínuo, onde se avaliariam gastos com implantação física de cada processo, gastos com solvente e energia, levando em conta o rendimento e a qualidade do produto final. Para a extração em contracorrente destes compostos fenólicos, sugere-se que este estudo seja realizado em uma planta piloto para correta estimativa de um processo industrial.

A aplicação do extrato como alternativa natural aos antioxidantes e antifúngicos sintéticos apresentou alguns inconvenientes que motivam a realização de estudos futuros para complementação das conclusões e consolidação de sua aplicação a nível industrial.

A principal dificuldade observada na aplicação do extrato fenólico foi a presença de impurezas em sua composição, interferindo na obtenção de alguns resultados. A purificação deste extrato com o objetivo de se obter somente compostos fenólicos em sua composição é de significativa importância para sua valorização. A partir dessa necessidade, trabalhos bastante interessantes podem ser realizados como estudos envolvendo as técnicas de separação por membranas, de adsorção ou outras tecnologias de separação. Os principais compostos químicos presentes e mais difíceis de serem retirados do extrato são os açúcares. Por possuírem propriedades similares aos compostos fenólicos como solubilidade, polaridade e tamanho de partícula, sua separação exige um estudo bastante elaborado.

Ainda com relação ao extrato fenólico, após desenvolver uma técnica eficaz de purificação dos compostos fenólicos, é importante que esses compostos antioxidantes se encontrem disponíveis para aplicação em formato de fácil manipulação, ou seja, em forma de pó ou solução líquida e com

estabilidade suficiente para suportar condições mínimas de armazenamento. Para atender a essas condições, a microencapsulação de compostos fenólicos é uma técnica potencial a ser estudada. A microencapsulação pode ser realizada em solução líquida ou com a formação de pó através das tecnologias de atomização ou liofilização, entre outras, sempre utilizando material de parede adequado para finalidade que se deseja.

Referências Bibliográficas

ABD-ELGHANY, M. E.; AMMAR, M. S.; HEGAZY, A. E. Use of olive waste cake extract as a natural antioxidant for improving the stability of heated sunflower oil. *World Appl Sci J*, v. 11, n. 1, p. 106-113, 2010.

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. SPE, p. 260-268, 2008. ISSN 1516-3598.

ABDELAZIM, A. A.; MAHMOUD, A.; RAMADAN-HASSANIEN, M. F. Oxidative stability of vegetable oils as affected by sesame extracts during accelerated oxidative storage. *Journal of food science and technology*, v. 50, n. 5, p. 868-878, 2013. ISSN 0022-1155.

ABDULKARIM, S. M. et al. Frying quality and stability of high-oleic Moringa oleifera seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*, v. 105, n. 4, p. 1382-1389, 2007/01/01/2007. ISSN 0308-8146.

ADEYINKA, A.; RICHARD, F. Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: A review. **Int. J. Biotechnol. Food Sci**, v. 3, n. 3, p. 31-35, 2015.

AGREGÁN, R. et al. Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. **Food Research International**, v. 99, p. 986-994, 2017. ISSN 0963-9969.

AHMAD-QASEM, M. H. et al. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 17, p. 120-129, 2013. ISSN 1466-8564.

AIDER, M.; BARBANA, C. Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 21-39, 2011.

AKOH, C. C. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. CRC press, 2017. ISBN 1498744877.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785-788, 8/1/ 2009. ISSN 0308-8146.

ALU'DATT, M. H. et al. Optimisation and characterisation of various extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity in olive seeds. **Natural product research**, v. 25, n. 9, p. 876-889, 2011. ISSN 1478-6419.

AMADO, I. R. et al. Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. **Food chemistry**, v. 165, p. 290-299, 2014. ISSN 0308-8146.

AMERICAN OIL CHEMISTS, S. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. AOCS press, 1993.

AMERICAN OIL CHEMISTS, S.; FIRESTONE, D. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. AOCS press, 1998.

AMORIM, E. P. et al. Correlações e análise de trilha em girassol. **Bragantia**, v. 67, n. 2, p. 307-316, 2008. ISSN 0006-8705.

ANDREASEN, M. F. et al. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4090-4096, 2001. ISSN 0021-8561.

ANTOLOVICH, M. et al. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.

ANVISA. **Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007** 2007.

AOAC. **Fat (total, saturated, unsaturated, and monounsaturated) in cereal products, Method 996.01**. USA: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, AOAC International 2000.

_____. **Determination of Protein Content in Food, Method 945.18-B**. In: **Official Methods of Analysis, AOAC International Publisher**. GAITHERSBURG. 2005a.

_____. **Solids (Total) and moisture in flour, Method 925.10**. Gaithersburg: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition 2005b.

ARAGAO, G. M. F.; CORRADINI, M. G.; PELEG, M. A phenomenological model of the peroxide value's rise and fall during lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 12, p. 1143, 2008. ISSN 0003-021X.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolics from *Annona crassiflora* Mart.(Araticum) Fruits Using Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, p. 1-11, 2016. ISSN 1936-9751.

ASNAASHARI, M.; TAJIK, R.; KHODAPARAST, M. H. H. Antioxidant activity of raspberry (*Rubus fruticosus*) leaves extract and its effect on oxidative stability of sunflower oil. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 5180-5187, 2015. ISSN 0022-1155.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 8// 2013. ISSN 0260-8774.

BAE, I. K. et al. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469-475, 4/1/ 2015. ISSN 0308-8146.

BAJKO, E. et al. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 471-479, 2016. ISSN 0023-6438.

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.

BARCHAN, A. et al. The effects of sol-vents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, n. 11, p. 399-412, 2014.

BARIZÃO, É. O. et al. Optimization of antioxidant compounds extraction from flesh of new developed apple cultivar using response surface methodology. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1407-1415, 2013. ISSN 1936-9751.

BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 1, p. 1-15, 2013. ISSN 1438-2377.

BARTNICK, D.; MOHLER, C.; HOULIHAN, M. **Methods for the production of food grade extracts**: Google Patents 2004.

BAUMERT, A. et al. Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family? **Phytochemistry**, v. 66, n. 11, p. 1334-1345, 2005. ISSN 0031-9422.

BAÜMLER, E. R.; CARRÍN, M. E.; CARELLI, A. A. Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 190-197, 2016/06/01/ 2016. ISSN 0260-8774.

BELL, J. M. Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 689-697, 21 March 2011 1993.

BERLAN, J.; MASON, T. J. Sonochemistry: from research laboratories to industrial plants. **Ultrasonics**, v. 30, n. 4, p. 203-212, 1992/01/01 1992. ISSN 0041-624X.

BETALLELUZ-PALLARDEL, I. et al. Phenolic compounds from Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum*) tubers display protection against soybean oil oxidation. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 3, p. 271-280, 2012. ISSN 1082-0132.

BOCHI, V. C.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food chemistry**, v. 176, p. 234-243, 2015. ISSN 0308-8146.

BOMFIM, M. A. D.; SILVA, M. M. C.; SANTOS, S. F. D. Potencialidades da utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa**, v. 3, n. 4, p. 15-26, 2010-04-08 2009.

BOUSSETTA, N. et al. Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. **Industrial Crops and Products**, v. 52, n. 0, p. 347-353, 1// 2014. ISSN 0926-6690.

_____. Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 0, p. 690-696, 8// 2013. ISSN 0926-6690.

BRADSTREET, R. B. **The Kjeldahl method for organic nitrogen**. Elsevier, 2015. ISBN 1483258599.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 1/18/ 2014. ISSN 0731-7085.

BUCIĆ-KOJIĆ, A. et al. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 236-242, 2007. ISSN 0260-8774.

BÖTTCHER, C. et al. Analysis of phenolic choline esters from seeds of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* by capillary liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 44, n. 4, p. 466-476, 2009. ISSN 1096-9888.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2003.

CACCAMESE, S.; AZZOLINA, R.; DAVINO, M. Separation of cis and trans isomers of naturally occurring hydroxycinnamic acids by high-pressure liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 12, n. 8, p. 545-547, 1979. ISSN 0009-5893.

CAI, R.; ARNTFIELD, S. D. A rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of sinapine and sinapic acid in canola seed and meal. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 9, p. 903-910, 2001/09/01 2001. ISSN 0003-021X.

Canola Council of Canada. Oil & meal, 2016. Disponível em: < <http://www.canolacouncil.org/oil-and-meal/what-is-canola/> >. Acesso em: 20/02/2016.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Girassol: derivados protéicos**. Embrapa-CNPSo, 1994.

CARTEA, M. E. et al. Phenolic compounds in Brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 251-280, 2010.

CASTRO, A. M. D.; CASTILHO, L. D. R.; FREIRE, D. M. G. Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflower residual cakes for use as raw materials for fermentation processes. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 140-148, 5// 2016. ISSN 0926-6690.

CHANG, S. K. C. Protein analysis. In: (Ed.). **Food analysis**: Springer, 2010. p.133-146. ISBN 1441914773.

CHEMAT, F.; ZILL E, H.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 7// 2011. ISSN 1350-4177.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543-550, 4/1/ 2015. ISSN 0308-8146.

CHESSON, A. A Review: Maceration in Relation to the Post-harvest Handling and Processing of Plant Material. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 48, n. 1, p. 1-45, 1980. ISSN 1365-2672.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 5, n. 4, p. 169-186, 2006. ISSN 1541-4337.

_____. Chemistry of deep-fat frying oils. **Journal of food science**, v. 72, n. 5, 2007. ISSN 1750-3841.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000. ISSN 1097-0010.

CONAB. **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: Terceiro levantamento, dez/2015**. Brasília. 3 2015.

CONTAMINE, R. F. et al. Power measurement in sonochemistry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 2, n. 1, p. S43-S47, // 1995. ISSN 1350-4177.

CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2008a. ISSN 1466-8564.

_____. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2008b. ISSN 1466-8564.

CORREIA, I. M. S. Extração e pirólise do óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) visando a produção de biocombustíveis. 2009.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999. ISSN 0893-8512

1098-6618.

CRITES, G. D. Domesticated sunflower in fifth millennium BP temporal context: new evidence from Middle Tennessee. **American Antiquity**, p. 146-148, 1993. ISSN 0002-7316.

CUNNIF, P. A. **Official methods of analysis of AOAC International Arlington: Association of Official Analytical Chemists**: CD-Rom 1998.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005. ISSN 0924-8579.

DA LUZ, L. P. **Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. 1998. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DAHMOUNE, F. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 166, p. 585-595, 1/1/ 2015. ISSN 0308-8146.

DAI, J. et al. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 837-847, 2009. ISSN 0278-6915.

DALL'AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. Origem e histórico do girassol. **Girassol no Brasil. Londrina: EMBRAPA Soja**, p. 1-14, 2005.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2009. ISBN 8536323345.

DAS PURKAYASTHA, M. et al. Removing Antinutrients from Rapeseed Press-Cake and Their Benevolent Role in Waste Cooking Oil-Derived Biodiesel: Conjoining the Valorization of Two Disparate Industrial Wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 45, p. 10746-10756, 2013/11/13 2013. ISSN 0021-8561.

_____. Physicochemical and Functional Properties of Rapeseed Protein Isolate: Influence of Antinutrient Removal with Acidified Organic Solvents from Rapeseed Meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7903-7914, 2014/08/06 2014. ISSN 0021-8561.

DAVIDOV-PARDO, G.; AROZARENA, I.; MARÍN-ARROYO, M. R. Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 2, p. 211-220, 2011. ISSN 1438-2377.

DE CASTRO, C. et al. **A cultura do girassol**. Embrapa-CNPSO, 1996.

DE LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V.; DI DOMENICO, N. A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus*). **European journal of lipid science and technology**, v. 107, n. 4, p. 220-227, 2005. ISSN 1438-9312.

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.

DEMURIN, Y.; SKORIC, D.; KARLOVIC, D. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. **Plant Breeding**, v. 115, n. 1, p. 33-36, 1996. ISSN 1439-0523.

EDWARDS, J.; JENSEN, B.; WALES, N. S. **Canola Growth & Development**. Department of Primary Industries, 2011. ISBN 1742562124.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Tecnologia de produção - Girassol. 2016a.

_____. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA TRIGO. **Definição da Canola**, 2016b.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015/10/01/ 2015. ISSN 1756-4646.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. **Revista Contexto & Saúde**, v. 11, n. 20, p. 93-102, 2013. ISSN 2176-7114.

ESCLAPEZ, M. D. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2011. ISSN 1866-7910.

EVANS, J. C.; KODALI, D. R.; ADDIS, P. B. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 1, p. 47-51, 2002. ISSN 0003-021X.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION (FAOSTAT). 2014.

FARAG, R. S.; MAHMOUD, E. A.; BASUNY, A. M. Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. **International journal of food science & technology**, v. 42, n. 1, p. 107-115, 2007. ISSN 0950-5423.

FARAHMANDFAR, R.; RAMEZANIZADEH, M. H. Oxidative stability of canola oil by Biarum bovei bioactive components during storage at ambient temperature. **Food science & nutrition**, v. 6, n. 2, p. 342-347, 2018. ISSN 2048-7177.

FELICI, P. H. N. et al. Balanço energético das culturas de girassol e soja para produção de biocombustível. **II Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, p. 25, 2006.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. M.; PÉREZ-VICH, B.; VELASCO, L. Sunflower. In: (Ed.). **Oil crops**: Springer, 2009. p.155-232. ISBN 0387775935.

FERRARI, C. K. B. OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ALIMENTOS E SISTEMAS BIOLÓGICOS: MECANISMOS GERAIS E IMPLICAÇÕES NUTRICIONAIS EP MECANISMOS GERAIS E IMPLICAÇÕES NUTRICIONAIS E PATOLÓGICAS TOLÓGICAS. **Rev. nutr**, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.

FERRERES, F. et al. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1209-1220, 2009. ISSN 0278-6915.

_____. Metabolic and bioactivity insights into *Brassica oleracea* var. *acephala*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8884-8892, 2009. ISSN 0021-8561.

_____. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 549-558, 2007. ISSN 0308-8146.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. N. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987-9003, 2013. ISSN 0021-8561.

FOUNDATIONS, B. N. **Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance; the report of the British Nutrition Foundation's Task Force**: London: Chapman & Hall 1994.

FRANCO CODEVILLA, C. et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, 2015. ISSN 0100-8307.

FRANCO, D. et al. Optimization of antioxidants extraction from peanut skin to prevent oxidative processes during soybean oil storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 1-8, 2018/02/01/ 2018. ISSN 0023-6438.

FRANKEL, E. N. **Lipid oxidation**. Elsevier, 2014. ISBN 085709792X.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**. NBL Editora, 2009. ISBN 8521313829.

GAZZOLA, A. et al. A cultura do girassol. **Piracicaba–SP. Junho de**, 2012.

GAZZONI, D. L. et al. Balanço energético da cultura da canola para a produção de biodiesel. **Espaço Energia**, v. 11, p. 24-28, 2009.

GODOY, M. G. et al. Chapter 12 - Agricultural Residues as Animal Feed: Protein Enrichment and Detoxification Using Solid-State Fermentation A2 - Pandey, Ashok. In: LARROCHE, C. e SOCCOL, C. R. (Ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**: Elsevier, 2018. p.235-256. ISBN 978-0-444-63990-5.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R. et al. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—A response surface approach. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 2176-2184, 2014. ISSN 1350-4177.

GONZÁLEZ-GARCÍA, J. et al. Sonochemical treatment of water polluted by chlorinated organocompounds. A review. **Water**, v. 2, n. 1, p. 28-74, 2010.

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. ISSN 0021-8561.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; VEREIJKEN, J. M. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 12, p. 2173-2191, 2007. ISSN 1097-0010.

GORINSTEIN, S. et al. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. **Food chemistry**, v. 74, n. 3, p. 309-315, 2001. ISSN 0308-8146.

GRAINGER, C. GIA methane: increasing fat can reduce methane emissions. **GIA Newsletter. Department of Primary Industries**, 2008.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, n. 6, p. 539-546, 1978. ISSN 0003-021X.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014/12/01/ 2014. ISSN 0956-7135.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2007. 704-704 ISBN 019856869X.

HAMILTON, R. J. chemistry of rancidity in foods. **Rancidity in foods/edited by JC Allen and RJ Hamilton**, 1983.

_____. **Developments in oils and fats**. Springer, 1995. ISBN 0751402052.

HARBAUM, B. et al. Identification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Pak Choi Varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC–ESI-MS n and NMR and Their Quantification by HPLC–DAD. **J. of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8251-8260, 2007. ISSN 0021-8561.

HERCHI, W. et al. Heating effects on physicochemical characteristics and antioxidant activity of flaxseed hull oil (*Linum usitatissimum* L). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 36, n. 1, p. 97-102, 2016. ISSN 0101-2061.

HERTOG, M. G. L. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. 1993. ISSN 0163-5581.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9–10, p. 937-942, 9// 1999. ISSN 0278-6915.

HRAŠ, A. R. et al. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food chemistry**, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000. ISSN 0308-8146.

HROMÁDKOVÁ, Z.; KOŠT'ÁLOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1062-1068, 9// 2008. ISSN 1350-4177.

IBARZ, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. **Unit operations in food engineering**. Crc Press, 2002. ISBN 1420012622.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 6/15/ 2011. ISSN 0308-8146.

INANÇ, T.; MASKAN, M. The potential application of plant essential oils/extracts as natural preservatives in oils during processing: a review. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012. ISSN 2159-5828.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2007/01/01/ 2007. ISSN 0308-8146.

Jl, J.-B. et al. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 5, p. 455-462, 7// 2006. ISSN 1350-4177.

JIA, Z.; DUMONT, M.-J.; ORSAT, V. Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. **Food Bioscience**, v. 15, p. 87-104, 9/1/ 2016. ISSN 2212-4292.

JOSLYN, M. **Methods in food analysis: Applied to plant products**. Elsevier, 2012. ISBN 0323146813.

JUNG, M. Y.; YOON, S. H.; MIN, D. B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, n. 1, p. 118-120, 1989. ISSN 0003-021X.

KACHRIMANIDOU, V. et al. Integrated sunflower-based biorefinery for the production of antioxidants, protein isolate and poly (3-hydroxybutyrate). **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 106-113, 2015. ISSN 0926-6690.

KADAM, S. U. et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 308-316, 3// 2015. ISSN 1350-4177.

KAHL, R.; KAPPUS, H. [Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E]. **Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung**, v. 196, n. 4, p. 329-338, 1993. ISSN 0044-3026.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat science**, v. 36, n. 1-2, p. 169-189, 1994. ISSN 0309-1740.

KARRE, L.; LOPEZ, K.; GETTY, K. J. K. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science**, v. 94, n. 2, p. 220-227, 6// 2013. ISSN 0309-1740.

KAYA, Y. Sunflower. In: (Ed.). **Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume 2**: Springer, 2014. p.281-315. ISBN 1461495717.

KAYA, Y.; JOCIC, S.; MILADINOVIC, D. Sunflower. In: (Ed.). **Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 1**: Springer, 2012. p.85-129. ISBN 1461403553.

KENNEDY, J. E. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. **Nature reviews cancer**, v. 5, n. 4, p. 321-327, 2005. ISSN 1474-175X.

KHAN, M. K. et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 851-858, 3/15/ 2010. ISSN 0308-8146.

KHATTAB, R. et al. Determination of sinapic acid derivatives in canola extracts using high-performance liquid chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 2, p. 147-155, 2010. ISSN 0003-021X.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

KING, A. M. Y.; YOUNG, G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 2// 1999. ISSN 0002-8223.

KIRAN, C. R.; SUNDRESAN, A. Thermal degradation studies on Edible Oil during Deep Fat Frying Process. 2015.

KIRK, J. R. **Biological availability of nutrients in processed foods**: ACS Publications 1984.

KOSKI, A. et al. Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 2, p. 110-114, 2003. ISSN 1438-2377.

KOZLOWSKA, H. et al. Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. In: (Ed.). **Canola and Rapeseed**: Springer, 1990. p.193-210. ISBN 1461367441.

KRISHNASWAMY, K. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 2, p. 441-455, 2013. ISSN 1935-5130.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 334-336, 1982. ISSN 0021-8561.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; GOLC WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LEE, C.-H. et al. Antioxidant Activity of Brown Soybean Ethanolic Extracts and Application to Cooked Pork Patties. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 3, p. 359, 2016.

LEE, J.; CHAN, B. L. S.; MITCHELL, A. E. Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS). **Food chemistry**, v. 215, p. 301-310, 2017. ISSN 0308-8146.

LEE, J.; WROLSTAD, R. E. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 7, p. 564-573, 2004. ISSN 1750-3841.

LEITE, R. D. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. D. **Girassol no Brasil**. Embrapa soja, 2005. ISBN 8570330057.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, n. 7, p. 731-738, 8// 2004. ISSN 0963-9969.

LIRA, M. A. et al. **Avaliação das potencialidades da cultura do girassol, como alternativa de cultivo no semiárido nordestino**. Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN: 40 p. 2011.

LIU, Q. et al. Profile and distribution of soluble and insoluble phenolics in Chinese rapeseed (*Brassica napus*). **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 616-622, 2012.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004. ISSN 0022-3166.

LOU, Z. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of food science**, v. 76, n. 6, p. M398-M403, 2011. ISSN 0022-1147.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIET, A. **Fruit phenolics**. CRC press, 1990. ISBN 0849349680.

MAIA, L. A.; M.S., R.; E.M.A, A. **Cultura da Canola**. Viçosa: UFV, 1999. 50p.

- MAIER, T. et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 551-559, 2/1/ 2009. ISSN 0308-8146.
- MANDARINO, J. M. G. Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol. **EMBRAPA-CNPSO. Documentos**, 1992.
- _____. Derivados protéicos do girassol. **Reunião nacional de pesquisa do girassol**, v. 12, p. 8-10, 1997.
- MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. **Embrapa Soja. Documentos**, 2001.
- MARTINEZ, E.; DUVNJAK, Z. Enzymatic degradation of chlorogenic acid using a polyphenol oxidase preparation from the white-rot fungus *Trametes versicolor*; ATCC 42530. **Process biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1835-1841, 2006. ISSN 1359-5113.
- MARTÍNEZ, G. et al. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017. ISSN 0048-3575.
- MASON, T. J.; CINTAS, P. **Sonochemistry**. Blackwell, Oxford, 2002.
- MASON, T. J.; PANIWNKYK, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, n. 3, p. S253-S260, 1996.
- 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. ISSN 0021-8561.
- MAŠKOVIĆ, P. Z. et al. Optimization of the extraction process of antioxidants from orange using response surface methodology. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 5, p. 1436-1443, 2016. ISSN 1936-9751.
- MERKL, R. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. **Czech J Food Sci**, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2010.
- MIN, D. B.; BOFF, J. M. Lipid oxidation of edible oil. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, p. 335-364, 2002. ISSN 0891-8961.
- MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28-41, 2/15/ 2014. ISSN 0959-6526.

MOHDALY, A. A. A. et al. Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 952-959, 2011. ISSN 0926-6690.

MOHIDEEN, F. W. **Comparison of Thermally Pasteurized and Ultrasonically Pasteurized Blueberry Juice (*Vaccinium Corymbosum*) and an Investigation of Blueberry Juice Effect on Lipid Oxidation During Microencapsulation of Poly-unsaturated Fish Oils**. 2011. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science by Fathima Waheeda Mohideen B. Sc, University of Peradeniya

MOJERLOU, Z.; ELHAMIRAD, A. Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds from olive cake. **Journal of food science and technology**, v. 55, n. 3, p. 977-984, 2018. ISSN 0022-1155.

MORELLI, L. L. L.; PRADO, M. A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1144-1149, 2012. ISSN 1350-4177.

MORTON, L. W. et al. Chemistry And Biological Effects Of Dietary Phenolic Compounds: Relevance To Cardiovascular Disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 152-159, 2000. ISSN 1440-1681.

MOSSINI, S. A. G.; ARROTÉIA, C. C.; KEMMELMEIER, C. Effect of neem leaf extract and Neem oil on *Penicillium* growth, sporulation, morphology and ochratoxin A production. **Toxins**, v. 1, n. 1, p. 3-13, 2009.

MOURAD, A. L. Principais culturas para obtenção de óleos vegetais combustíveis no Brasil. **ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL**, 2006.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001. ISSN 0308-8146.

MUHAMMAD ANJUM, F. et al. Nutritional and therapeutic potential of sunflower seeds: a review. **British Food Journal**, v. 114, n. 4, p. 544-552, 2012. ISSN 0007-070X.

MUTHUKUMARAN, S. et al. Application of ultrasound in membrane separation processes: a review. **Reviews in chemical engineering**, v. 22, n. 3, p. 155-194, 2006. ISSN 2191-0235.

NACZK, M. et al. Antioxidant capacity of phenolics from canola hulls as affected by different solvents. 2005, Oxford University Press, 2005. p.57-66.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography. A**, v. 1054, p. 95-111, 2004. ISSN 0021-9673.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 1, p. 41-44, 3// 2003. ISSN 0960-8524.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Editora Manole Ltda, 2006. ISBN 852041978X.

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

OSAWA, T. **Novel Natural Antioxidants for Utilization in Food and Biological Systems, in Postharvest Biochemistry of Plant Food Materials in the Tropics Uritani.I**, p. 241-251, 1994.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954-970, 5// 2013. ISSN 0963-9969.

PANOZZO, L. E. Qualidade de sementes, características agronômicas e produtividade de híbridos de canola em diferentes épocas de semeadura e colheita em Viçosa-MG. 2012.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 147-154, 4// 2008. ISSN 1466-8564.

PEDROSA, M. M. et al. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 4, p. 459-464, 2000. ISSN 1097-0010.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; CHEMAT, F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 593-606, 2013/06/01/ 2013. ISSN 0956-7135.

POIANA, M.-A. Enhancing oxidative stability of sunflower oil during convective and microwave heating using grape seed extract. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 9240-9259, 2012.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. H. **Antioxidants in food: practical applications**. CRC press, 2001. ISBN 0849312221.

RAMADAN, M. F.; MÖRSEL, J. T. Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 1, p. 35-43, 2004. ISSN 1438-9312.

RASO, J. et al. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 5, n. 4, p. 157-162, 1999. ISSN 1350-4177.

REIS, S. F.; RAI, D. K.; ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1991-1998, 2012. ISSN 0308-8146.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996. ISSN 0891-5849.

RICHTER, E. K. et al. Characterization of rapeseed (*Brassica napus*) oils by bulk C, O, H, and fatty acid C stable isotope analyses. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8048-8055, 2010. ISSN 0021-8561.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003. ISSN 0021-8561.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited Amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022-3029, 2013. ISSN 0021-8561.

RODRIGUES, R. A. F. Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcapsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de cafe crioconcentrado. 2004.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, n. 2, p. 119-128, 9/19/ 2003. ISSN 0021-9673.

SACCHI, K. L.; BISSON, L. F.; ADAMS, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, n. 3, p. 197-206, 2005. ISSN 0002-9254.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, v. 171, p. 144-152, 3/15/ 2015. ISSN 0308-8146.

SALGADO, P. R. et al. Production and characterization of sunflower (< i> Helianthus annuus L.</i>) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, 2012. ISSN 0023-6438.

SAN JOSÉ ALONSO, J. et al. Combustion of rapeseed oil and diesel oil mixtures for use in the production of heat energy. **Fuel Processing Technology**, v. 87, n. 2, p. 97-102, 1// 2006. ISSN 0378-3820.

SANCHEZ-MALDONADO, A. F. Mode of action, interaction and recovery of plant secondary metabolites for potential applications as food preservatives. 2014.

SARKIS, J. R. **Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de tecnologias elétricas no gergelim**. 2014. (Doutorado). Departamento de Engenharia Química (PPGEQ), UFRGS

SARKIS, J. R. et al. Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 170-177, 5// 2015. ISSN 1466-8564.

_____. Evaluation of the Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Seed and Nut Cakes from the Edible Oil Industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 10, p. 1773-1782, 2014. ISSN 0003-021X.

_____. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. **Separation and Purification Technology**, v. 122, n. 0, p. 506-514, 2/10/ 2014. ISSN 1383-5866.

SAYYARI, Z.; FARAHMANDFAR, R. Stabilization of sunflower oil with pussy willow (*Salix aegyptiaca*) extract and essential oil. **Food science & nutrition**, v. 5, n. 2, p. 266-272, 2017. ISSN 2048-7177.

SEHGAL, C. M.; WANG, S. Y. Threshold intensities and kinetics of sonoreaction of thymine in aqueous solutions at low ultrasonic intensities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 22, p. 6606-6611, 1981. ISSN 0002-7863.

SEILER, G. J.; GULYA, T. J.; MAREK, L. F. Collection and evaluation of wild perennial *Helianthus pumilus* achenes for oil concentration and fatty acid composition. 2012. p.711-716.

SHAH, M. A.; BOSCO, S. J. D.; MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 21-33, 2014. ISSN 0309-1740.

SHAHIDI, F. **Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology**. Springer Science & Business Media, 1990. ISBN 0442002955.

_____. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**. The American Oil Chemists Society, 1997. ISBN 0935315772.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: Chemical, sensory and nutritional significance. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 69, n. 9, p. 917-924, 1992/09/01 1992. ISSN 0003-021X.

_____. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC press, 2003. ISBN 0203508734.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. **Lipid Oxidation: Measurement Methods**. 2005. ISBN 9780471678496.

SIELICKA, M.; MAŁECKA, M. Enhancement of Oxidative Stability of Flaxseed Oil Through Flaxseed, Evening Primrose and Black Cumin Cake Extracts. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 4, 2017. ISSN 1745-4549.

SIES, H. **Oxidative stress**. Elsevier, 2013. ISBN 1483289117.

SIGER, A. et al. Identification and antioxidant activity of sinapic acid derivatives in *Brassica napus* L. seed meal extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 10, p. 1130-1138, 2013. ISSN 1438-9312.

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.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIMIC, M. G.; JOVANOVIĆ, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: (Ed.): ACS Publications, 1994. ISBN 1947-5918.

SINGH, B.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum spp.*) using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 294-308, 2012// 2012. ISSN 0975-8402.

SINGH, J.; BARGALE, P. C. Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. **Journal of food engineering**, v. 43, n. 2, p. 75-82, 2000. ISSN 0260-8774.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. ISSN 0076-6879.

SONDHEIMER, E. On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 74, n. 1, p. 131-138, 3// 1958. ISSN 0003-9861.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 7// 2010a. ISSN 0924-2244.

_____. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 7// 2010b. ISSN 0924-2244.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 7// 2007. ISSN 0260-8774.

STATSOFT. **STATISTICA (data analysis software system)** 2012.

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 237-256, 2000. ISSN 0031-9422.

SULIEMAN, A. B. D. E. R. M.; EL-MAKHZANGY, A.; RAMADAN, M. F. Antiradical performance and physicochemical characteristics of vegetable oils upon frying of French fries: a preliminary comparative study. **Journal of Food Lipids**, v. 13, n. 3, p. 259-276, 2006. ISSN 1745-4522.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002. ISSN 0021-8561.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. **Journal of Food Science and Technology**, India, v. 52, n. 3, p. 1272-1282, revised 06/21/accepted 2015. ISSN 0022-1155

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, 2011. ISSN 1557-4571.

TEH, S.-S.; BIRCH, E. J. Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 346-353, 1// 2014. ISSN 1350-4177.

THIYAM, U. et al. Antioxidative effect of the main sinapic acid derivatives from rapeseed and mustard oil by-products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 3, p. 239-248, 2006. ISSN 1438-9312.

THIYAM-HOLLÄNDER, U.; ESKIN, N. A. M.; MATTHÄUS, B. **Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition**. CRC Press, 2012. ISBN 1466513861.

THIYAM-HOLLÄNDER, U. et al. Identification and quantification of canolol and related sinapate precursors in indian mustard oils and canadian mustard products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 12, p. 1664-1674, 2014. ISSN 1438-9312.

THOO, Y. Y. et al. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 290-295, 5/1/ 2010. ISSN 0308-8146.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100-109, 9// 2015. ISSN 0165-9936.

TOMM, G. O. **Tecnologia para cultivo de canola no sudoeste de Goiás**. Caramuru Alimentos, 2003.

_____. Cultivo de canola. **Passo Fundo: Embrapa Trigo**, 2007.

TOMM, G. O.; LEITE, R. M. V. B. D. C. Desenvolvimento tecnológico de girassol e canola para a produção de biocombustíveis. **Rede Biodiesel, Embrapa**, 2014.

TOMM, G. O. et al. Tecnologia para produção de canola no Rio Grande do Sul. **Embrapa Trigo**, 2009. ISSN 1518-6512 113.

TOMÁS-BARBERAN, F. A.; FERRERES, F.; GIL, M. I. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 23, 2000. p.739-795. ISBN 1572-5995.

TONISSI, R. H. D. et al. **ALIMENTOS E ALIMENTAÇÃO ANIMAL**. Mato Grosso do Sul: UFGD, 2013.

TORLEY, P. J.; BHANDARI, B. R. Ultrasound in food processing and preservation. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, v. 167, p. 713, 2004. ISSN 0891-8961.

TYAGI, V. K.; VASISHTHA, A. K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 4, p. 499-506, 1996. ISSN 0003-021X.

VELASCO, J. N.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 623-632, 2004. ISSN 0308-8146.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 2001.

_____. Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 25, p. 94-95, 2015. ISSN 1350-4177.

VUONG, Q. V. et al. Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of Carica papaya leaf aqueous extracts. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 3, p. 104-111, 9// 2013. ISSN 2210-8033.

VUORELA, S.; MEYER, A. S.; HEINONEN, M. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8202-8207, 2004. ISSN 0021-8561.

WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F. Antioxidants: science, technology, and applications. **Bailey's industrial oil and fat products**, 2005. ISSN 047167849X.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and Identification of an Antioxidative Component in Canola Meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994/06/01 1994. ISSN 0021-8561.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 8, p. 817-822, 1994. ISSN 0003-021X.

WANG, J. et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804-810, 1/15/ 2008. ISSN 0308-8146.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006. ISSN 0924-2244.

WANG, Q.-E. et al. Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). **Biochemical engineering journal**, v. 21, n. 3, p. 285-292, 2004. ISSN 1369-703X.

WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. **Methods to access quality and stability of oils and fat-containing foods**. The American Oil Chemists Society, 1995. ISBN 0935315586.

WATERHOUSE, A. L. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 0471142913.

_____. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2002. ISSN 0471142913.

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-MS n. **Food chemistry**, v. 115, n. 2, p. 758-765, 2009a. ISSN 0308-8146.

_____. 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/ 2009b. ISSN 0308-8146.

WOERFEL, J. B. Extraction. **Practical handbook of soybean processing and utilization**, p. 65-92, 1995.

WONG, B. Y.; TAN, C. P.; HO, C. W. Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “Dukung Anak”(Phyllanthus niruri). **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 325-330, 2013. ISSN 1985-4668.

WONG, W. H. et al. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 238-248, 2015. ISSN 0926-6690.

WISOWICZ, E. et al. Oxidation of lipids in food. **Pol J Food Nutr Sci**, v. 13, p. 87-100, 2004.

YANG, M. et al. Influence of microwaves treatment of rapeseed on phenolic compounds and canolol content. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1956-1963, 2014. ISSN 0021-8561.

YANG, S.-C. et al. Identification and determination of phenolic compounds in rapeseed meals (*Brassica napus* L.). **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 4, n. 01, p. 14, 2015.

ZARDO, I. et al. Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. **Waste and Biomass Valorization**, 2017/08/05 2017. ISSN 1877-265X.

ZHANG, Q. et al. An economical and efficient technology for the extraction of resveratrol from peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by multi-stage countercurrent extraction. **Food Chemistry**, v. 179, p. 15-25, 7/15/ 2015. ISSN 0308-8146.

ZHANG, Y. et al. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 656-662, 2010. ISSN 0308-8146.

ZHOU, X.; BELTRANENA, E.; ZIJLSTRA, R. T. Effects of feeding canola press-cake on diet nutrient digestibility and growth performance of weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 208-215, 1// 2016. ISSN 0377-8401.

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Marcha de absorção de macronutrientes na cultura do girassol. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 425-434, 2010. ISSN 0100-0683.

ZUK, M. et al. Bactericidal activities of GM flax seedcake extract on pathogenic bacteria clinical strains. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 70, 2014. ISSN 1472-6750.

ŞAHİN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 595-602, 2013. ISSN 1350-4177.

ŽILIC, S. et al. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel. **Helia**, v. 33, n. 52, p. 75-84, 2010. ISSN 2197-0483.