

# EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE SEMENTES DE GIRASSOL

## XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA

A. C. P. SOUZA<sup>1</sup>, L. D. F. MARCZAK<sup>2</sup> e J. R. SARKIS<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química  
E-mail para contato: ana.cardinale@hotmail.com

**RESUMO** – A busca por resíduos agroindustriais como fontes de compostos funcionais e nutricionais tem se intensificado nos últimos anos e, nesse contexto, o presente trabalho visa estudar os subprodutos do processamento de sementes de girassol. Compostos fenólicos desse resíduo foram extraídos e a metodologia de superfície de resposta foi utilizada para se obter a condição ótima de extração. A influência da temperatura (25 – 90°C), da razão sólidos/solvente (0,02 – 0,11 g/mL) e da concentração de etanol (20 – 80%) foi avaliada através de um planejamento fatorial  $2^3$  incluindo seis pontos axiais e seis repetições no ponto central. Os teores de fenólicos totais e de flavonoides foram quantificados por espectrometria. A análise estatística dos valores obtidos mostrou que as variáveis de processo exercem uma influência significativa sobre as variáveis de resposta sendo que os modelos obtidos apresentaram uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa para um nível de confiança de 95%.

## 1. INTRODUÇÃO

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

As tortas são os subprodutos do processo de extração industrial do óleo de girassol por prensagem mecânica; apresentam um alto valor nutricional com teor de proteína entre 15 e 50 %, sendo utilizadas como ração animal, especialmente para ruminantes e peixes (Ramachandran, Singh *et al.*, 2007). Entretanto, esses subprodutos podem ter diversas aplicações, como ingrediente funcional, como aditivo em alimentos fortificados e como antioxidante natural para alimentos (Weisz, Kammerer *et al.*, 2009). Entre outras aplicações das tortas estão a produção de enzimas, antibióticos, biopesticidas, vitaminas e outros produtos bioquímicos (Ramachandran, Singh *et al.*, 2007).

O crescente interesse nos compostos fenólicos está associando às suas propriedades

antioxidantes; vários estudos mostram os benefícios à saúde humana proporcionada por uma dieta rica nesses compostos. Esses compostos estão incluídos na categoria de desativadores de radicais livres e apresentam uma grande gama de efeitos biológicos incluindo ações antioxidantes, antiviral, antimicrobiana, antitumoral e atividade antibacteriana (Haminiuk, Maciel *et al.*, 2012). A disponibilidade de compostos fenólicos em resíduos agroindustriais foi objeto de uma revisão realizada por Moure *et al.* (2010). Entre os resíduos que têm sido estudados como fontes destes compostos podem ser citadas: cascas de trigo sarraceno (Watanabe, Ohdhita *et al.*, 1997), bagaço de oliva (Sheabar e Neeman, 1988), sementes e bagaço de uva ( Lu e Foo, 1997) entre outros.

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

Ainda que ocorra a remoção dos tocoferóis e parte dos fosfolipídios no processo de extração do óleo, o alto teor de polifenóis nos resíduos da produção de óleo demonstra que o processo de extração não diminui o teor desses compostos, pois dificilmente os ácidos fenólicos se solubilizam na fase lipídica (Matthäus, 2002). Desta forma, a recuperação de compostos fenólicos de tortas de girassol é bastante relevante, pois os extratos obtidos apresentam notável atividade antioxidante e o valor nutricional dos concentrados e isolados proteicos é mantido ou melhorado.

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

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima e reagentes**

As tortas de girassol utilizadas nos experimentos foram fornecidas pela empresa Vital Âtman (São Paulo, Brasil) provenientes do processo de produção do óleo de girassol através da etapa de prensagem a frio das sementes. Um quilo de torta de girassol foi liofilizado por 12h (Liofilizador LS6000, Terroni, Brasil) e, em seguida, o farelo foi homogeneizado passando em uma peneira com abertura de malha de 2,38 mm e armazenado em sacos plásticos e mantidas a temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . O padrão de Epicatequina foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e o ácido gálico da empresa Vetec (São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da empresa Merck Millipore Brasil (São Paulo, Brasil) e para a extração dos compostos foi utilizado o álcool etílico PA adquirido da empresa Vetec (São Paulo, Brasil).

### **2.2 Extração dos compostos fenólicos**

O processo de extração foi realizado em um vaso de vidro Pyrex (7,5 cm de diâmetro externo e 10 cm de altura) encamisado e conectado a um banho de água (Lauda, modelo T, Alemanha) no qual a temperatura foi ajustada de acordo com o tratamento e mantida constante durante cada ensaio.

Durante a extração, a célula de vidro foi colocada sobre um agitador magnético (Fisatorm, modelo 706 A) e conectada por intermédio do encaixe superior, a um condensador que por sua vez, foi conectado a um banho de água (Lauda, modelo RM 12, Alemanha) mantido na temperatura de 5 °C, a fim de evitar a evaporação da solução extratora. De acordo com as condições estabelecidas no planejamento fatorial, um determinado volume de etanol foi adicionado dentro da célula de vidro com aproximadamente 1 g de torta de girassol e submetido a agitação por 40 min. O tempo de extração foi determinado através de testes preliminares no qual foi realizada uma cinética de extração de 2 h, na temperatura de 58 °C, na razão sólidos/solvente de 1:9 e concentração de etanol de 48%. Durante esse período, foi observado que os teores de compostos fenólicos permaneceram constantes a partir de 40 min de extração. Após as extrações, as amostras foram centrifugadas (Cientec, modelo CT 5000R, Brasil) por 20 min, a 6000 rpm e a temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi coletado em uma proveta e seu volume foi ajustado utilizando a solução extratora. O extrato contendo os compostos fenólicos foi, então, armazenado refrigerado até a realização das análises.

## 2.3 Planejamento Fatorial

Para analisar a influência de diferentes condições de extração de compostos fenólicos da torta de girassol, foi realizado um planejamento composto central, que consiste em um fatorial  $2^3$  incluindo seis pontos axiais e seis repetições no ponto central (totalizando 20 ensaios). As variáveis independentes escolhidas foram temperatura ( $X_1$ ), razão sólidos/solvente ( $X_2$ ) e concentração de etanol ( $X_3$ ). Os níveis de temperatura, razão sólidos/solvente e a concentração de etanol estão mostrados na Tabela 1. As respostas avaliadas estatisticamente foram o teor de fenólicos totais ( $Y_1$ ) e o teor de flavonoides ( $Y_2$ ). Os experimentos foram realizados de maneira aleatória com a finalidade de minimizar os erros decorrentes de fatores externos. Para a análise dos dados obtidos experimentalmente foi utilizada a metodologia de superfície de resposta através do software Statistica® versão 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa OK, USA). O modelo polinomial de segunda ordem foi estabelecido para a modelagem dos dados experimentais de acordo com a Equação 1 e os coeficientes de regressão ( $\beta$ 's) foram obtidos.

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Na Equação 1,  $\beta_n$  são os coeficientes de regressão;  $Y_i$  a variável de resposta e  $X_i$  são as variáveis independentes. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada variável de resposta a um nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). As variáveis estatisticamente não significativas foram desconsideradas obtendo assim modelos de regressão reduzidos. Para verificar a adequação dos modelos reduzidos, os dados experimentais foram comparados com os valores preditos calculando-se o erro médio através da Equação 2, onde  $E$  é o erro médio,  $n$  é o número de dados experimentais,  $y_{exp}$  são os dados experimentais e o  $y_{cal}$  são os valores preditos pelo modelo.

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{exp} - y_{cal}|}{y_{exp}} \quad (2)$$

Tabela 1 – Planejamento Fatorial Composto Central

Variáveis independentes		Níveis				
	Variáveis codificadas	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	25	38	58	77	90
Razão sólidos/solvente (g/mL)	X <sub>2</sub>	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11
Concentração de etanol (%)	X <sub>3</sub>	20	32	50	68	80

## 2.4 Análises das variáveis de resposta

### 2.4.1 Fenólicos Totais

A metodologia de avaliação dos compostos fenólicos presente nos extratos foi adaptada de Waterhouse (2002). Em resumo, 40 µL de extrato foram adicionados a 3,2 mL de água destilada e 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu; a mistura foi agitada e deixada no escuro por 5 min. Após esse período, à solução foi adicionada 600 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio e agitada em vortex (Phoenix Luferco, modelo AP 56, Brasil). As medidas de absorvância foram feitas após 1 h em um espectrofotômetro (Pró-Análise, modelo UV 1600, Brasil) em 765 nm. Os teores de fenólicos totais foram determinados através de uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão (50 - 500 g/L, R<sup>2</sup>=0,9968) e os resultados sendo expressos em equivalente de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg EAG/g).

### 2.4.2 Flavonoides Totais

A metodologia de avaliação dos flavonoides foi adaptada de Yang, Liu *et al.* (2009). Para tanto, adicionou-se a 250 µL de extrato 1,7 mL de água destilada e 75 µL de solução de nitrito de sódio 5% em seguida a mistura foi levemente agitada e deixada no escuro por 5 min. Após esse período, foi adicionada à solução 150 µL de solução de cloreto de alumínio 10%, sendo essa solução agitada e deixada no escuro por 6 min. Em seguida, foi adicionada a solução 0,5 mL de NaOH 1 mol/L e agitada em vortex (Phoenix Luferco, modelo AP 56, Brasil) e as medidas de absorvância foram realizadas no comprimento de onda de 510 nm. Os teores de flavonoides totais foram determinados através de uma curva de calibração utilizando como padrão a epicatequina (50 – 500 mg/L, R<sup>2</sup>=0,9956). Os resultados foram expressos em equivalente de epicatequina por grama de amostra em base seca (EE mg/g).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análises das variáveis de resposta

Através da metodologia de superfície de resposta foi avaliada a influência das três variáveis em estudo, temperatura (25 – 90 °C), a razão sólidos/solvente (0,02 – 0,11) e a concentração de etanol (20

– 80%) sobre os teores de fenólicos totais e flavonoides totais extraídos da torta de girassol. Os valores obtidos para os 20 experimentos estão apresentados na Tabela 2, assim como o desvio padrão para as triplicatas das análises realizadas no espectrofotômetro. Os resultados apresentados nessa tabela mostram que o teor de fenólicos totais ficou na faixa de 8,1 – 14,1 mg EAG/g e a quantidade de flavonoides na faixa de 7,5 – 22,4 mg EE/g de torta.

Tabela 2 – Planejamento composto central das variáveis independentes ( $X_1$  e  $X_2$  e  $X_3$ ) e os resultados experimentais das variáveis de resposta para fenólicos totais e flavonoides totais.

Temperatura (°C)	Razão sólidos/solvente (g/mL)	EtOH (%)	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EE/g)
38 (-1)	0,09 (1)	32 (-1)	14,1 ± 0,4	16,7 ± 0,5
77 (1)	0,09 (1)	32 (-1)	11,0 ± 0,1	22,4 ± 0,8
38 (-1)	0,04 (-1)	32 (-1)	8,8 ± 0,4	8,7 ± 0,2
77 (1)	0,04 (-1)	32 (-1)	8,1 ± 0,2	11,1 ± 0,2
38 (-1)	0,09 (1)	68 (1)	11,32 ± 0,09	18,2 ± 0,4
77 (1)	0,09 (1)	68 (1)	10,7 ± 0,4	15,7 ± 0,4
38 (-1)	0,04 (-1)	68 (1)	11,0 ± 0,2	9,9 ± 0,1
77 (1)	0,04 (-1)	68 (1)	10,9 ± 0,3	7,5 ± 0,2
25 (-1,68)	0,07 (0)	50 (0)	12,1 ± 0,2	11,02 ± 0,09
90 (1,68)	0,07 (0)	50 (0)	7,1 ± 0,2	9,0 ± 0,1
58 (0)	0,02 (-1,68)	50 (0)	10,2 ± 0,3	21,3 ± 0,3
58 (0)	0,11 (1,68)	50 (0)	9,8 ± 0,4	8,43 ± 0,06
58 (0)	0,07 (0)	20 (-1,68)	12,3 ± 0,2	11,7 ± 0,1
58 (0)	0,07 (0)	80 (1,68)	10,5 ± 0,2	9,79 ± 0,04
58 (0)	0,07 (0)	50 (0)	13,6 ± 0,2	12,08 ± 0,07
58 (0)	0,07 (0)	50 (0)	11,6 ± 0,2	10,6 ± 0,2
58 (0)	0,07 (0)	50 (0)	11,4 ± 0,1	10,01 ± 0,07
58 (0)	0,07 (0)	50 (0)	12,2 ± 0,2	10,99 ± 0,03
58 (0)	0,07 (0)	50 (0)	11,6 ± 0,3	12,17 ± 0,09
58 (0)	0,07 (0)	50 (0)	12,1 ± 0,3	10,4 ± 0,3

A partir dos resultados apresentados na Tabela 2, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com a finalidade de avaliar a significância estatística de cada uma das variáveis de processo e suas interações a um nível de confiança de 95%. Foram calculados os efeitos dos fatores lineares e quadráticos e das interações, assim como o erro puro, o coeficiente t e a significância estatística (p), conforme a Tabela 3. Além disso, foi realizada a modelagem dos dados experimentais para o teor de fenólicos totais e flavonoides totais através da Equação 1 sendo os coeficiente de determinação e o valor de F para os modelos reduzidos apresentados na Tabela 3. Os modelos apresentaram regressão significativa, uma vez que o  $F_{\text{calculado}}$  foi superior ao  $F_{\text{tabelado}}$  para ambas variáveis de resposta. O modelo explicou 72,20% e 92,57% da variação do teor de fenólicos totais e flavonoides totais observadas ( $R^2 = 0,7270$  e  $0,9257$ ), respectivamente e a falta de ajuste desses

modelos não foram significativas.

Os valores dos efeitos estimados indicam quanto cada fator influencia a resposta estudada. Quanto maior o seu valor, maior é a influencia. O valor de t indica a grandeza da variável em relação ao seu desvio. Portanto, quanto maior o valor de t maior é a probabilidade de a variável ser significativa.

Tabela 3 – Magnitude dos efeitos dos fatores sobre os teores de fenólicos totais e flavonoides totais

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t (5)	Coefficiente p
<b>Fenólicos totais</b>				
Média	11,94	0,27	44,15	0,01
T (L)	-1,89	0,42	-4,47	0,01
T (Q)	-1,29	0,41	-3,70	0,01
R (L)	-	0,42	-3,05	0,03
R (Q)	-1,52	0,41	-2,98	0,03
R (L) x C <sub>etanol</sub> (L)	-1,22	0,55	3,71	0,01
F <sub>calculado</sub>	7,46	F <sub>tabelado</sub>	2,96	
R <sup>2</sup>	0,7220			
E (%)	6,74			
<b>Flavonoides totais</b>				
Média	11,22	0,26	43,96	0,01
R (L)	-8,38	0,48	-17,35	0,00
R (Q)	3,43	0,47	7,34	0,00
C <sub>etanol</sub> (L)	-1,60	0,48	-3,30	0,02
T (L) x C <sub>etanol</sub> (L)	-3,28	0,63	-5,20	0,00
F <sub>calculado</sub>	46,47	F <sub>tabelado</sub>	3,06	
R <sup>2</sup>	0,9257			
E (%)	7,24			

L – efeito linear Q – efeito quadrático

T – temperatura R- razão sólidos/solvente C<sub>etanol</sub> – concentração de etanol

Os erros médios (calculados pela Equação 2) foram de 6,74% e 7,24% para fenólicos totais e flavonoides totais, respectivamente. De acordo com Neto, Scarminio e Bruns (1995), valores de erro médio abaixo de 10% indicam um ajuste adequado para propósitos práticos.

### 3.1.1 Fenólicos totais

Dentre os fatores significativos, a temperatura apresentou o menor valor p e o maior valor t, mostrando ser a variável que mais influencia no teor de fenólicos totais. Os efeitos dos fatores lineares (L), quadráticos (Q) e das interações, assim como a significância estatística (p) foram calculados, conforme a Tabela 3. Observa-se que os fatores lineares (L) e quadráticos (Q) da temperatura (T) e da razão sólidos/solvente (R) bem como a interação entre a concentração de etanol (C<sub>etanol</sub>) e a razão

sólidos/solvente foram significativos para o nível de confiança de 95%. Mazza e Cacace (2003) apresentaram resultados semelhantes para os teores de fenólicos totais e antocianinas extraídas de groselhas pretas. Nesse estudo, eles verificaram que a temperatura e a razão sólidos/solvente exerceram efeitos lineares e quadráticos negativos. Isso significa que o aumento da temperatura e da razão sólidos/solvente provoca um decréscimo da variável de resposta.

As superfícies de contorno do modelo reduzido são apresentadas na Figura 1. A Figura 1 (a) mostra a variação do teor de fenólicos totais em função da temperatura e da razão sólidos/solvente. Observa-se que o aumento da temperatura e da razão sólidos/solvente provoca uma diminuição do teor de fenólicos totais. A maior concentração de compostos fenólicos foi obtida na temperatura de 46 °C.

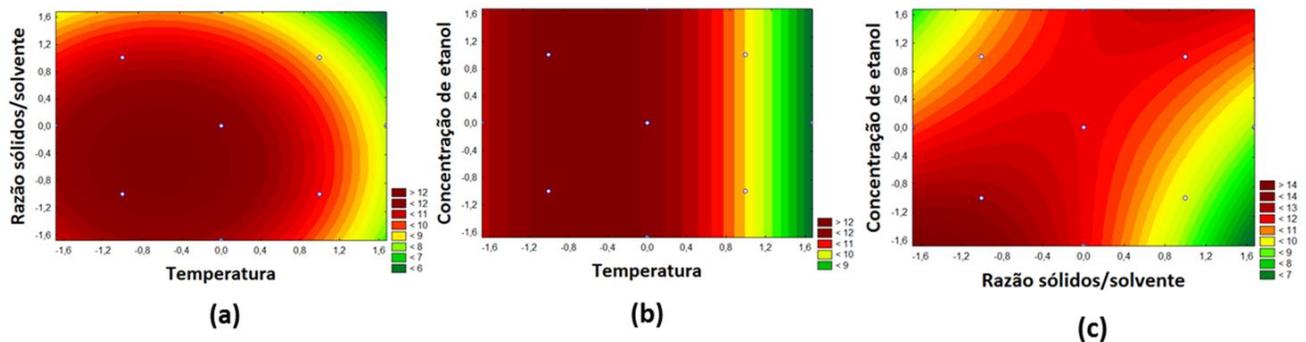


Figura 1 – Superfícies de contorno para o teor de fenólicos totais (a) da temperatura e razão sólidos/solvente, (b) da concentração de etanol e temperatura e (c) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol em valores codificados.

Na Figura 1 (b) é visualizada a superfície de contorno para as variáveis independentes concentrações de etanol e temperatura. Observa-se que o teor de fenólicos totais não é influenciado pela concentração de etanol. A variável de resposta atinge valores máximos para temperaturas na faixa entre 25 e 50°C em toda a faixa de concentração de etanol estudada. A Figura 1 (c) mostra a variação do teor de fenólicos totais em função da concentração de etanol e da razão sólidos/solvente. Nessa figura é possível observar que o teor de fenólicos totais é influenciado pela interação entre esses dois parâmetros. A maior concentração de compostos fenólicos foi obtida com maiores volumes de solvente e menores concentrações de etanol.

### 3.1.2 Flavonoides Totais

Para os teores de flavonoides totais, os efeitos significativos, para um nível de 95% de confiança, são os dos fatores lineares e quadráticos da razão sólidos/solvente, o fator linear da concentração de etanol e a interação deste com a temperatura, conforme pode ser observado na Tabela 3. Gan e Latiff (2011) avaliaram os teores de flavonoides extraídos da vagem *Parkia speciosa* para diferentes razões de sólidos/solvente, temperaturas e tempo de extração. Nesse estudo, eles mostraram que apenas os fatores lineares e quadráticos da variável razão sólidos/solvente apresentaram significância a um nível de confiança de 95 %.

As superfícies de contorno do modelo reduzido são apresentadas na Figura 2. A Figura 2 (a)

mostra a variação do teor de flavonoides em função da razão sólidos/solvente e da concentração de etanol; observa-se que os teores de flavonoides não é influenciada pela temperatura. A Figura 2 (b) mostra a variação do teor de flavonoides em função da razão sólidos/solvente e temperatura; observa-se uma região de máximo da variável de resposta para menores razões sólidos/solvente em ambas as superfícies de contorno, o que também foi observado para fenólicos totais.

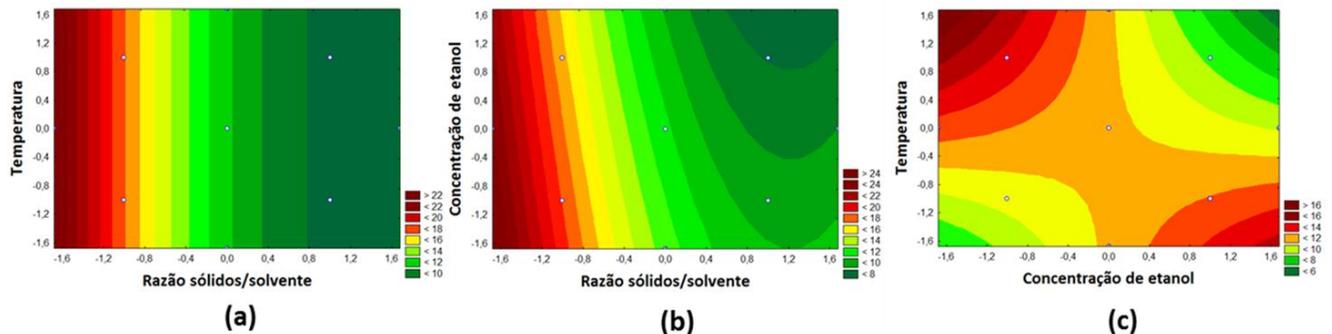


Figura 2 – Superfícies de contorno para o teor de flavonoides (a) da razão sólidos/solvente e concentração de etanol, (b) da razão sólidos/solvente e temperatura e (c) da concentração de etanol e temperatura em valores codificados.

Na Figura 2 (c) é visualizada a superfície de contorno para as variáveis independentes concentrações de etanol e temperatura; observa-se que para menores concentrações de etanol o aumento da temperatura aumenta o teor de flavonoides. Ademais, verifica-se que para temperaturas menores o aumento da concentração de etanol aumenta o teor de flavonoides totais.

## 4. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a melhor condição de extração de compostos fenólicos da torta de girassol através da metodologia de superfície de resposta. O processo foi otimizado com relação à temperatura (25 – 90 °C), a razão sólidos/solvente (0,02 – 0,11 g/mL) e a concentração de etanol (20 – 80%). Os modelos desenvolvidos por todas as respostas apresentaram uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa para um nível de confiança de 95%. Os teores de fenólicos totais ficaram na faixa de 8,1 – 14,1 mg EAG/g de torta e de acordo com a análise estatística realizada, apenas a temperatura, a razão sólidos/solvente e a interação deste com a concentração de etanol foram significativas; essa análise apresentou um coeficiente de determinação de 0,7270 e o erro médio foi de 6,74%. Os teores de flavonoides, por sua vez, ficaram na faixa de 7,5 – 22,4 mg EE/g de torta. A análise estatística mostrou que apenas a razão sólidos/solvente e a interação da temperatura com a concentração de etanol foram significativas. O modelo apresentou um coeficiente de determinação de 0,9257 e um erro médio de 7,24%.

## 6. REFERÊNCIAS

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

- CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *J. agric. food chem.*, v. 50, n. 21, p. 5939-5946, 2002.
- CASTRO, C. D. et al. *A cultura do girassol*. Londrina: EMBRAPA - CNPSO, 1997.
- GAN, C.-Y.; LATIFF, A. A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food chem.*, v. 124, n. 3, p. 1277-1283, 2011.
- HAMINIUK, W. I. C. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview: *J. food sci. technol.* 27: p. 2023-2044, 2012.
- LU, Y.; YEAP FOO, L. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food chem.*, v. 65, n. 1, p. 1-8, 1999
- MATTHÄUS, B. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. *J. agric. food chem.*, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002
- MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food chem.*, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Ed. Unicamp, p. 299, 1995
- PRASAD, K. N. et al. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food chem.*, v. 128, n. 4, p. 1121 – 1127, 2011
- RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresour. technol.*, v. 98, n. 10, p. 2000-2009, 2007
- SHEABAR, F. Z.; NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 65, n. 6, p. 990-993, 1988.
- WATANABE, M.; OHSHITA, Y.; TSUSHIDA, T. Antioxidant Compounds from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) Hulls. *J. agric. food chem.*, v. 45, n. 4, p. 1039-1044, 1997/04/01 1997
- WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*. WROLSTAD, R. E. New York. Supplement 6: 1-8 p. 2002.
- WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. *Food chem.*, v. 115, n. 2, p. 758-765, 2009
- YANG, J.; LIU, R. H.; HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. : *LWT - Food sci. technol.* 42: p. 1 – 8, 2009.