



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

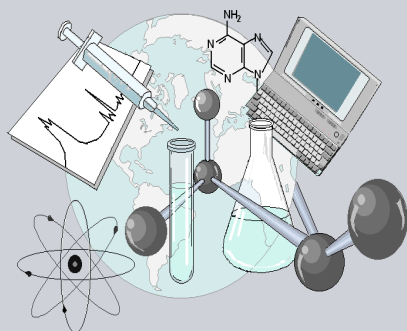
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“ANÁLISE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM ÓLEOS DE  
GIRASSOL E GERGELIM OBTIDOS POR EXTRAÇÃO  
ENZIMÁTICA EM MEIO AQUOSO”**

Dissertação apresentada por  
**Suellen Andressa Oenning Ribeiro**  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de  
Química do Centro de Ciências  
Exatas da Universidade Estadual de  
Maringá como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre  
em Química

**CEE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, MAIO/2015**

SUELLEN ANDRESSA OENNING RIBEIRO

**ANÁLISE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM ÓLEOS DE  
GIRASSOL E GERGELIM OBTIDOS POR EXTRAÇÃO  
ENZIMÁTICA EM MEIO AQUOSO**

Dissertação apresentada por **Suellen Andressa Oenning Ribeiro** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Makoto Matsushita.

Maringá  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R484a Ribeiro, Suellen Andressa Oenning  
Análise de compostos bioativos em óleos de girassol e gergelim obtidos por extração enzimática em meio aquoso / Suellen Andressa Oenning Ribeiro. - Maringá, 2015.  
xv, 65 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Makoto Matsushita.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Óleo de girassol - Extração - Tecnologia limpa. 2. Óleo de gergelim - Extração - Tecnologia limpa. 3. Enzimas. 4. Oleaginosas. 5. Tecnologia limpa. 6. Química de alimentos. I. Matsushita, Makoto, 1952-, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547.7

GV5-002650



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Suellen Andressa Oenning Ribeiro**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 08 de maio de 2015.

**COMISSÃO JULGADORA:**

Prof. Dr. Makoto Matsushita  
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau  
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafe  
Membro - UTFPR

Dedico

Aos Oenning, minha base.

Em especial, à Sueli Oenning,  
Nathália Oenning e Bárbara Oenning.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Sueli Oenning e Antonio Ribeiro, e irmãs, Nathália Oenning e Bárbara Oenning, pelo incentivo, apoio e motivação.

Aos amigos Diogo Almeida, Fernando Domingues, Érika Bernardo, Janaina Rodrigues, Bruna Curtolo, Diego Rodrigues, André Cazetta, Brenno Oliveira, Eliza Rotta e Luiz Puppim, por todo apoio, ajuda, amizade e por estarem sempre presentes durante toda esta trajetória.

Aos amigos da Atlético de Exatas e Alexandre Peghinelli, por fazerem estes anos de mestrado valerem ainda mais a pena.

Aos companheiros de laboratório, Antonio Nicácio, Ana Beatriz Zanqui, Laura Mardigan, Polyana Batoqui e aos demais que de alguma forma contribuíram com o trabalho.

Aos professores Dr. Jesui Vergilio Visentainer, Dr. Benício Alves de Abreu Filho e Dr. Vitor de Cinque Almeida por disponibilizarem equipamentos de seus respectivos grupos de pesquisa, sem os quais parte da realização deste trabalho não seria possível.

Ao professor Dr. Makoto Matsushita pela orientação.

À Capes pelo suporte financeiro.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

*(Arthur Schopenhauer)*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE EQUAÇÕES</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
2.1 Oxidação Lipídica .....	2
2.2 Antioxidantes em Óleos Vegetais .....	3
2.3 Tocoferóis .....	6
2.4 Fitosteróis .....	8
2.5 Ácidos Graxos .....	9
2.6 Métodos Convencionais de Extração de Óleos Vegetais .....	10
2.7 Extração via Enzimática em Meio Aquoso .....	12
2.7.1 Parede Celular Vegetal e Enzimas .....	13
2.8 Grãos Oleaginosos .....	14
2.8.1 Girassol .....	14
2.8.2 Gergelim .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
3.1 Objetivo Geral .....	16
3.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
4.1 Amostragem .....	17
4.2 Composição Proximal .....	17
4.2.1 Umidade e Cinzas .....	17
4.2.2 Proteína Bruta .....	18
4.2.3 Lipídios Totais (Extração com Solventes) .....	19
4.2.4 Carboidratos .....	19
4.3 Extração do Óleo por Prensagem .....	20
4.4 Extração do Óleo via Enzimática em Meio Aquoso .....	20



4.4.1 Planejamento Fatorial.....	21
4.5 Capacidade Antioxidante .....	23
4.6 Tocoferóis e Fitoesteróis .....	24
4.7 Ácidos Graxos.....	25
4.8 Análise Estatística.....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
5.1 Composição Proximal .....	27
5.2 Extração de Óleos Vegetais.....	28
5.2.1 Extração via Enzimática em Meio Aquoso.....	28
5.2.2 Análise de Variância (ANOVA) .....	32
5.2.3 Extração dos Óleos por Metodologias Convencionais.....	35
5.3 Capacidade Antioxidante .....	35
5.4 Tocoferóis e Fitoesteróis.....	37
5.5 Ácidos Graxos.....	42
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica.....	2
Figura 2. Mecanismo de ação para alguns tipos de antioxidantes .....	3
Figura 3. Reações dos principais ensaios de determinação da capacidade antioxidante em óleos vegetais .....	4
Figura 4. Estrutura química do tocoferol e tocotrienol .....	7
Figura 5. Estrutura química dos principais esteróis e estanois.....	8
Figura 6. Dessaturação e alongação esquemática dos ácidos graxos da série n-3 e n-6 .....	10
Figura 7. Estrutura do oleossoma .....	12
Figura 8. Superfície de resposta para a extração do óleo de girassol via enzimática em meio aquoso.....	33
Figura 9. Superfície de resposta para a extração do óleo de gergelim via enzimática em meio aquoso.....	34
Figura 10. Tocoferol e fitosteróis identificados no óleo de girassol obtido por extração enzimática em meio aquoso .....	39
Figura 11. Tocoferol e fitosteróis identificados no óleo de gergelim obtido por extração enzimática em meio aquoso .....	40
Figura 12. Cromatograma dos ácidos graxos quantificados no óleo de girassol extraído via enzimática em meio aquoso .....	44
Figura 13. Cromatograma dos ácidos graxos quantificados no óleo de gergelim extraído via enzimática em meio aquoso .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento fatorial $2^3$ com ponto central para a extração dos óleos de girassol e gergelim via enzimática em meio aquoso .....	22
Tabela 2. Composição proximal dos grãos de girassol e gergelim .....	27
Tabela 3. Planejamento fatorial experimental $2^3$ com ponto central e rendimento do processo de extração dos óleos de girassol e gergelim via enzimática em meio aquoso.....	30
Tabela 4. Comparação do rendimento de extração via enzimática em meio aquoso dos óleos de girassol e gergelim obtidos em diferentes tempos de extração .....	31
Tabela 5. Análise de variância para a resposta rendimento de extração do óleo de girassol via enzimática em meio aquoso.....	32
Tabela 6. Análise de variância para a resposta rendimento de extração do óleo de gergelim via enzimática em meio aquoso.....	33
Tabela 7. Rendimento, em %, dos processos de extração dos óleos dos grãos de girassol e gergelim obtidos por diferentes metodologias.....	35
Tabela 8. Capacidade antioxidante do óleo de girassol e gergelim extraído por diferentes metodologias pelo método de DPPH.....	36
Tabela 9. Capacidade antioxidante do óleo de girassol e gergelim extraído por diferentes metodologias pelo método de L-ORAC .....	37
Tabela 10. Quantificação de tocoferóis e fitosteróis em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de óleo de girassol.....	38
Tabela 11. Quantificação de tocoferóis e fitosteróis em $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de óleo de gergelim.....	38
Tabela 12. Quantificação absoluta (em $\text{mg } \text{g}^{-1}$ de lipídios totais) dos ácidos graxos dos óleos de girassol.....	43
Tabela 13. Quantificação absoluta (em $\text{mg } \text{g}^{-1}$ de lipídios totais) dos ácidos graxos dos óleos de gergelim.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16:0 – Ácido Palmítico

18:0 – Ácido Esteárico

18:1n-9 – Ácido Oléico

18:2n-6 – Ácido Linoléico

18:3n-3 – Ácido Alfa-Linolênico

20:5n-3 – Ácido Eicosapentaenóico

22:5n-3 – Ácido Docosapentaenóico

22:6n-3 – Ácido Docosahexaenóico

AAPH – 2,2-azobis (amidinopropano) dihidrocloreto

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico

AGMI – Ácidos Graxos Monoinsaturados

AGPI – Ácidos Graxos Poliinsaturados

AGS – Ácidos Graxos Saturados

ANOVA – Análise de Variância (*Do inglês: Analysis of Variance*)

AOAC – Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (*Do inglês: Association of Official Analytical Chemists*)

BSFTA – N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Do inglês: Food and Agriculture Organization*)

FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico (*Do inglês: Ferric Reducing Antioxidant Power*)

GC – Cromatógrafo à Gás (*Do inglês: Gas Chromatography*)

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade (*Do inglês: High Density Lipoprotein*)

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (*Do inglês: Low Density Lipoprotein*)

L-ORAC – Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio – Fração Lipofílica (*Do inglês: Lipophilic-Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

LT – Lipídios Totais

MS – Espectrometria de Massas (*Do inglês: Mass Spectrometry*)

m/v – massa/volume

n-3 – Ácidos Graxos da Série Ômega-3

n-6 – Ácidos Graxos da Série Ômega-6

NT – Nitrogênio Total

PB – Proteína Bruta

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORAC – Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (*Do inglês: Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

RMCD –  $\beta$ -ciclodextrina randomicamente metilada (*Do inglês: Randomly Methylated  $\beta$ -cyclodextrin*)

TEAC – Capacidade Antioxidante Equivalente Trolox (*Do inglês: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Porcentagem de nitrogênio total .....	18
Equação 2. Teor de proteína bruta.....	19
Equação 3. Teor de carboidratos .....	20
Equação 4. Curva de calibração (ensaio de DPPH).....	23
Equação 5. Curva de calibração (ensaio de L-ORAC) .....	24
Equação 6. Quantificação de tocoferóis e fitosteróis.....	25
Equação 7. Quantificação de ácidos graxos .....	26
Equação 8. Modelo e coeficiente de regressão da extração via enzimática do óleo de girassol .....	33
Equação 9. Modelo e coeficiente de regressão da extração via enzimática do óleo de gergelim.....	34

## RESUMO

A qualidade e bioatividade dos óleos vegetais estão relacionadas a presença de compostos como ácidos graxos, fitosteróis, tocoferóis e antioxidantes naturais, na qual as quantidades podem variar de acordo com o tipo de processo da extração do óleo, sendo que os métodos mais comuns utilizam solventes tóxicos. Este estudo teve por objetivo avaliar uma tecnologia limpa de extração dos óleos dos grãos de girassol e de gergelim via enzimática em meio aquoso, comparando-a com metodologias convencionais, como prensagem e extração com solventes, em relação a capacidade antioxidante e a composição em tocoferóis, fitosteróis e ácidos graxos. Para a extração enzimática foram utilizadas três enzimas: Pectinex Ultra SPL, Celluclast 1.5L e Alcalase 2.4L e avaliados três fatores: concentração das enzimas (6%, 8% e 10%), proporção amostra:água (1:6, 1:8 e 1:10) e tempo de extração (4, 6 e 8 horas) através de um planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central. Os rendimentos das extrações dos óleos variaram dependendo do método empregado, sendo maiores na extração por solventes, 55,05% e 59,97%, seguidos da prensagem 36,77% e 42,00%, e via enzimática 36,60% e 40,93%, para os óleos de girassol e gergelim, respectivamente. As melhores condições para a extração com enzimas para os grãos de girassol foram com 10% de cada enzima, proporção amostra:água 1:6 e 8 horas de extração e as mesmas condições para os grãos de gergelim, com exceção do tempo de extração, 16 horas. Ambos óleos vegetais extraídos pela metodologia enzimática apresentaram maiores conteúdos em fitosteróis totais, 183 e 249 mg  $100\text{ g}^{-1}$  de óleo de girassol e gergelim, respectivamente, assim como as maiores capacidades antioxidantes frente ao radical peroxila, 371  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$  de óleo de girassol e 350  $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$  de óleo de gergelim. Quanto ao radical DPPH o óleo de girassol extraído por prensagem e o óleo de gergelim extraído com o uso de enzimas apresentaram as capacidades mais elevadas. O conteúdo em tocoferóis apresentou diferença significativa apenas para o óleo de girassol, na qual a metodologia por prensagem possibilitou maior extração do  $\alpha$ -tocoferol, enquanto para o óleo de gergelim não houve diferença significativa no conteúdo de  $\gamma$ -tocoferol, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), entre os métodos de

extração. A quantificação absoluta dos ácidos graxos demonstrou que os principais ácidos graxos para as duas oleaginosas foram: ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1n-9) e linoleico (18:2n-6). A extração via enzimática demonstrou o menor teor de AGS, o maior somatório em ômega-3 (n-3), a melhor razão de n-6/n-3 e uma das melhores de AGPI/AGS para o óleo de girassol. A mesma metodologia proporcionou, para o óleo de gergelim, a maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ômega-6 (n-6) e uma razão n-6/n-3 menor que o método de extração por solventes. Visando a obtenção de óleos vegetais com alta qualidade, a extração enzimática em meio aquoso demonstrou-se uma metodologia capaz de extrair além do óleo, compostos bioativos de grande importância à saúde, sem o uso de solventes, obtendo ao final óleos com uma qualidade superior aos obtidos por metodologias convencionais.

Palavras-chave: enzimas, oleaginosas, tecnologia limpa.



## ABSTRACT

The quality and bioactivity of vegetable oils are related to the presence of compounds such as fatty acids, phytosterols, tocopherols and natural antioxidants, which amounts may vary according to the type of oil extraction process, wherein the most common methods use toxic solvents. This study aimed to evaluate a clean technology for oil extraction from sunflower and sesame grains by enzymatic aqueous extraction, comparing it with conventional methods, such as pressing and solvent extraction, in relation to the antioxidant capacity, tocopherols, phytosterols and fatty acids composition. For enzymatic extraction three enzymes were used: Pectinex Ultra SPL, Celluclast 1.5L and Alcalase 2.4L and evaluated three factors: enzyme concentration (6%, 8% and 10%), sample/water ratio (1/6, 1/8 and 1/10) and extraction time (4, 6 and 8 hours) using a 2<sup>3</sup> factorial design with center point. The extraction yields of oils varied depending on the method, being higher in solvent extraction, 55.05% and 59.97%, followed by pressing 36.77% and 42.00%, and 36.60% and 40.93% by enzymatic for sunflower oil and sesame, respectively. The best conditions for the extraction with enzymes for sunflower grain were 10% each enzyme, sample/water ratio 1/6 and 8 hours of extraction and the same conditions for sesame grain, except for the extraction time, 16 hours. Both vegetable oils extracted by enzymatic methodology showed higher contents of total phytosterols, 183 and 249 mg 100 g<sup>-1</sup> of sunflower and sesame oil, respectively, as well as the higher antioxidant capacity against peroxy radical, 371 μmol Trolox g<sup>-1</sup> of sunflower oil and 350 μmol Trolox g<sup>-1</sup> of sesame oil. As for the DPPH radical, sunflower oil extracted by pressing and sesame oil extracted by using enzymes showed the highest capacity. The content of tocopherols showed a significant difference only for sunflower oil, in which the methodology by pressing allowed the higher extraction of α-tocopherol, while for the sesame oil there was no significant difference in γ-tocopherol content, by Tukey test (p <0.05) between the extraction methods. The absolute quantification of the fatty acid showed that the major fatty acids in both oils were: palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (18:1n-9) and linoleic (18:2n-6). The extraction by enzyme showed the lowest level of saturated fatty acids (SFA), the largest sum of omega-3 (n-

3), the best ratio of n-6/n-3 and one of the best PUFA/SFA to sunflower oil. The same methodology provided for the sesame oil, the greatest amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and omega-6 (n-6) and a ratio n-6/n-3 lower than the solvent extraction method. Aimed at obtaining vegetable oils with higher quality, enzymatic aqueous extraction demonstrated a methodology capable of extracting beyond oil, bioactive compounds of great importance to health, without using solvents, getting to the final oils with superior quality when compared to the oils extracted by conventional methods.

Keywords: enzymes, oilseeds, clean technology.

# 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais produtos extraídos de plantas são os óleos vegetais, sendo que aproximadamente dois terços são usados em produtos alimentícios, fazendo assim parte integrante da dieta humana (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

Os óleos vegetais geralmente apresentam uma grande variedade de compostos bioativos como ácidos graxos essenciais, fitosteróis, carotenóides e antioxidantes naturais, tais como os tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol) e tocotrienóis (HUANG & PRIOR, 2005). Muitos dos componentes encontrados naturalmente nestes óleos têm propriedades benéficas à saúde. Além disso, a presença destes compostos está relacionada à atributos de qualidade, especialmente à bioatividade e estabilidade oxidativa (CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011).

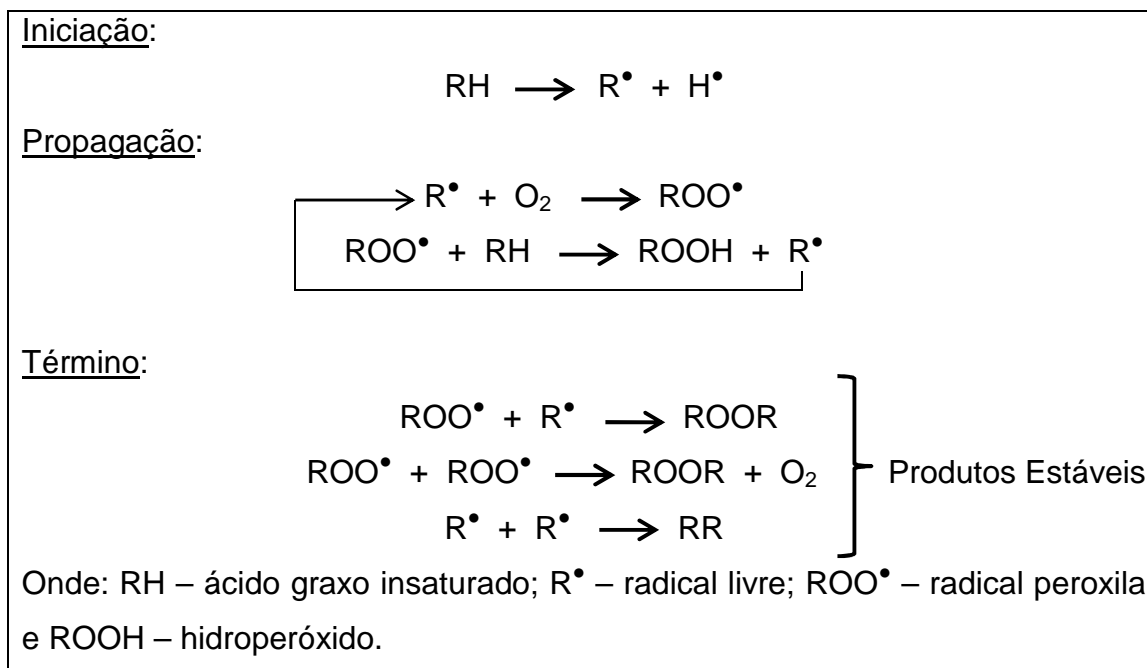
Considerando a preocupação mundial em relação aos danos causados ao meio ambiente e ao desenvolvimento de processos que sejam ecologicamente corretos, a extração via enzimática em meio aquoso apresenta-se como alternativa às metodologias que utilizam solventes tóxicos para extração de óleos vegetais, atendendo aos princípios da química verde (PRADO, 2003) como um processo sustentável. Portanto, essa tecnologia limpa de extração necessita ser estudada visando futuras aplicações industriais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Oxidação Lipídica

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (SILVA et al., 1999; KUBOW, 1993).

Os lipídios podem ser oxidados por diferentes caminhos: reações hidrolíticas, oxidação enzimática, fotooxidação e autooxidação (principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras) (BERGER & HAMILTON, 1995). A autooxidação dos lipídios está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas: iniciação, propagação e término. Farmer et al. (1942) propuseram uma sequência de reações inter relacionadas para explicar este processo (Figura 1).



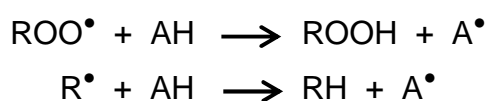
**Figura 1.** Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica.

Fonte: Jorge e Ramalho, 2006.

Para evitar a autoxidação de óleos e gorduras há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz) que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais no óleo, evitando ao máximo o contato com oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (JORGE & GONÇALVES, 1998).

## 2.2 Antioxidantes em Óleos Vegetais

A presença de compostos com ação antioxidante nos vegetais é atribuída ao processo evolutivo destas espécies como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação UV necessária à fotossíntese. Assim, os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres (SCOTTI et al., 2007), doadores de átomos de hidrogênio promovendo a remoção ou inativação de radicais livres formados, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC & JAVANOVIC, 1994). Frankel (1980) apresentou o seguinte mecanismo de ação (Figura 2):



Onde:  $\text{ROO}^\bullet$  e  $\text{R}^\bullet$  – radicais livres;  $\text{AH}$  – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e  $\text{A}^\bullet$  – radical inerte.

**Figura 2.** Mecanismo de ação para alguns tipos de antioxidantes.

Fonte: Jorge e Ramalho, 2006.

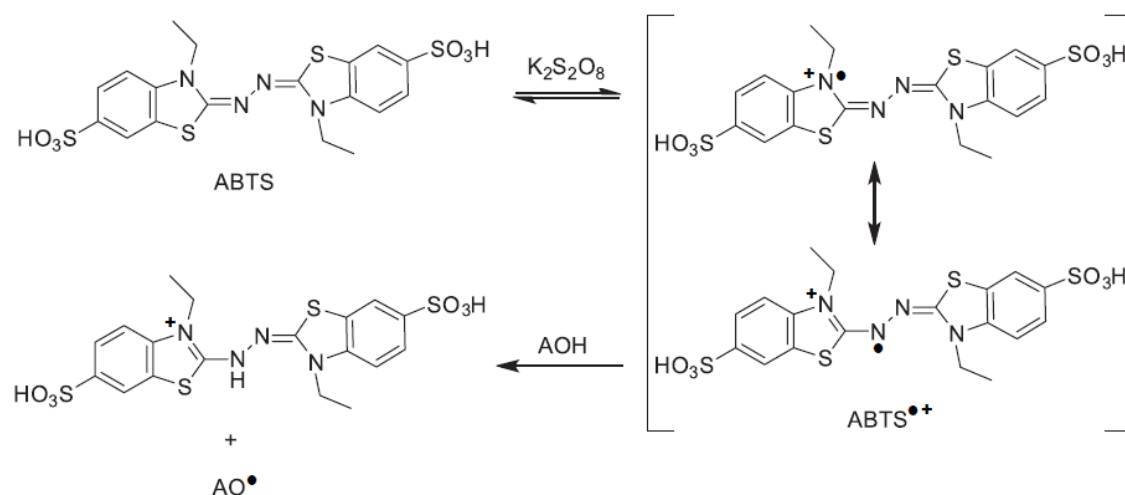
Os antioxidantes naturais de óleos vegetais apresentam potencial efeito na prevenção de doenças crônicas, pois são capazes de proteger sistemas biológicos contra a ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio,

responsáveis por danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (SZYDLOWSKA-CZERNIAK, et al., 2008; RAMADAN & MOERSEL, 2006).

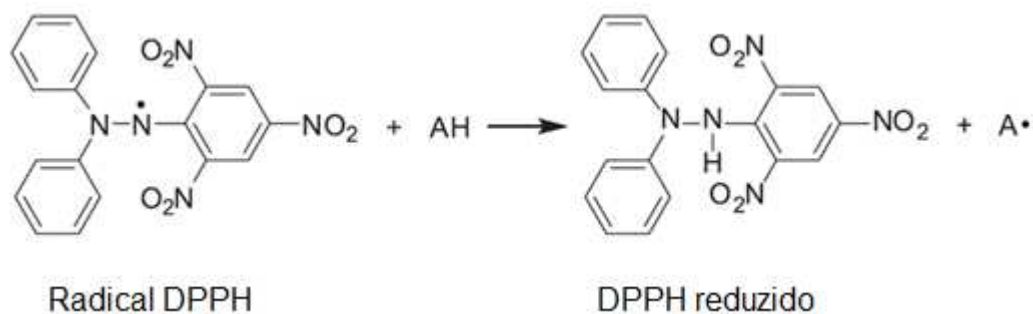
Além de apresentarem bioatividade no organismo humano, os antioxidantes naturais protegem os óleos vegetais contra a ação de radicais livres que iniciam e perpetuam a peroxidação lipídica, que consiste na principal forma de degradação dos óleos vegetais e em importante fonte de prejuízos para a indústria de alimentos (CHAIYASIT, et al., 2007).

Diferentes métodos têm sido utilizados para a determinação da capacidade antioxidante em óleos vegetais, como os ensaios da TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), também conhecido como ensaio do radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico) (PELLEGRINI, et al., 2003), do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) (ESPÍN, et al., 2000; TUBEROSO, et al., 2007), do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (SZYDLOWSKA-CZERNIAK, et al., 2008) e da ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (SZYDLOWSKA-CZERNIAK, et al., 2008; MIRALIAKBARI & SHAHIDI, 2008) (Figura 3). Embora Prior et al. (2005) tenha sugerido que apenas os ensaios de TEAC e ORAC são passíveis de adaptação para os compostos lipofílicos, houveram adaptações de protocolos para outros ensaios (ESPÍN, et al., 2000; JIMENEZ-ALVAREZ, et al., 2008).

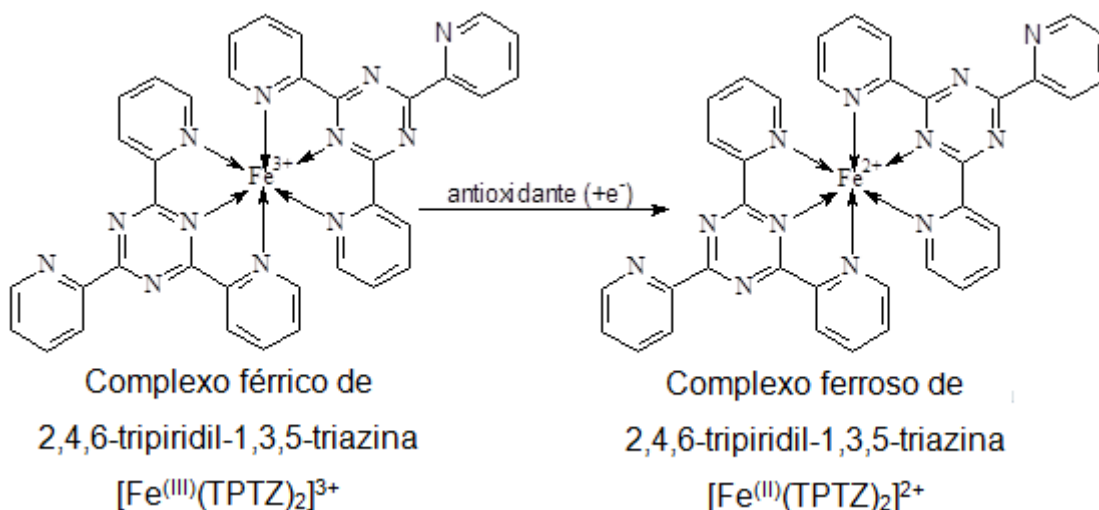
a) Formação do  $ABTS^{\bullet+}$  pelo persulfato de potássio e sua redução por um antioxidante (AOH):



b) Redução do radical livre DPPH pela ação de um antioxidante (AH):

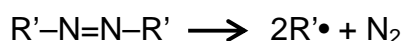


c) Redução do complexo férrico  $[\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$  a ferroso  $[\text{Fe}^{(\text{II})}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$  pela ação de antioxidante:

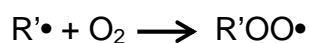


d) Reação do radical peroxila na presença de um composto antioxidante e fluoresceína:

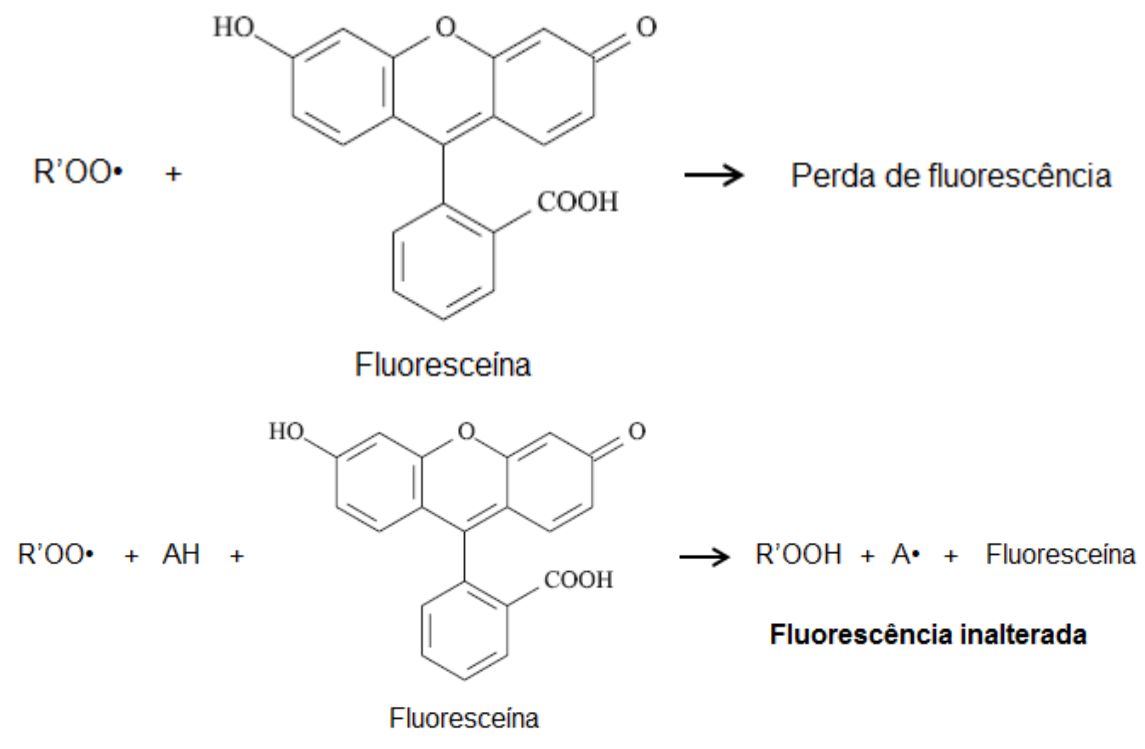
d.1) Decomposição a  $37^\circ\text{C}$  do AAPH (2,2-azobis(amidinopropano) dihidrocloreto) e formação de radicais alquilas ( $\text{R}\cdot$ )



d.2) Conversão do radical alquila ( $\text{R}\cdot$ ), na presença de oxigênio, em radical peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ )



d.3) Alteração da fluorescência da fluoresceína na ausência de um composto antioxidante (AH)



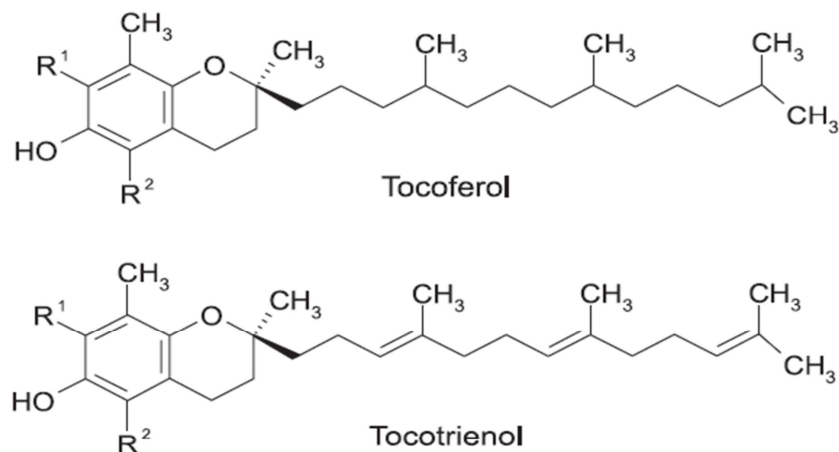
**Figura 3.** Reações dos principais ensaios de determinação da capacidade antioxidante em óleos vegetais.

Fonte: Oliveira et al., 2014; Molyneux, 2004; Rufino et al., 2006; Banerjee et al., 2008.

## 2.3 Tocoferóis

O termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - (alfa, beta, gama e delta, respectivamente) tocoferóis e tocotrienóis (CHUN, et al., 2006). Tanto tocoferóis como tocotrienóis ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol (Figura 4) (SHEPPARD, et al., 1992).





Tocopherol / Tocotrienol	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
α-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-	H	CH <sub>3</sub>
γ-	CH <sub>3</sub>	H
δ-	H	H

**Figura 4.** Estrutura química do tocoferol e tocotrienol.

Fonte: Cerqueira et al., 2007.

A vitamina E tem sido extensivamente estudada em diversas áreas do conhecimento, uma vez que trata-se de um antioxidante natural, sendo o α-tocoferol considerado o mais biologicamente ativo e o γ-tocoferol, dentre os outros, o melhor antioxidante (ANDRES et al., 2011, YADA et al., 2011, LÓPEZ-ORTIZ et al., 2008) e desempenha papéis especialmente importantes na reprodução normal e em mecanismos antioxidantes de tecidos animais e vegetais (AZZI & STOCKER, 2000).

Os óleos vegetais comestíveis, além de possuírem altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, apresentam grande consumo em nível mundial, constituindo-se, portanto, nos alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E para a população (EITENMILLER, 1997).

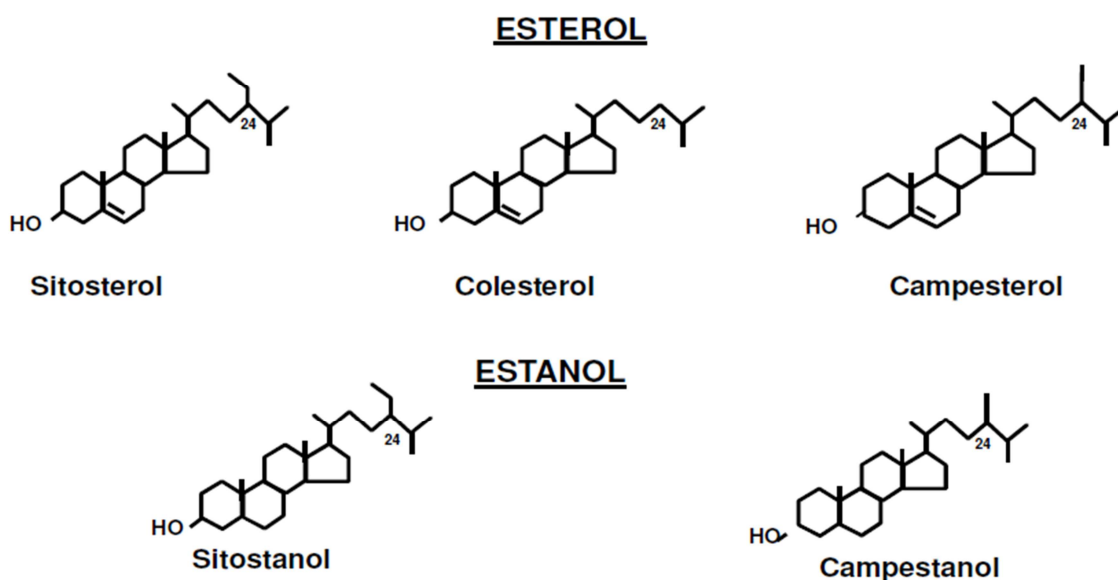
Embora a deficiência não represente um problema de significância nutricional, a ingestão de vitamina E tem despertado interesse e preocupação uma vez que compõe juntamente com a vitamina C, β-caroteno, selênio e flavonóides, o grupo denominado antioxidantes alimentares. Este grupo tem sido frequentemente associado à prevenção de doenças neurodegenerativas,

aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (BIERI, 2002; BRON & AMIS, 2002; TRABER, 2001).

## 2.4 Fitosteróis

Fitosteróis são esteróis presentes em vegetais e seu conteúdo varia de acordo com o vegetal em questão, as condições climáticas onde este se desenvolveu e especialmente a forma de extração e refino do óleo (ZANQUI, 2014).

Estruturalmente, apresentam uma dupla ligação na posição 5 e são classificados em esteróis e estanolis. Este último é produzido artificialmente por hidrogenação do esterol (LAW, 2000). O  $\beta$ -sitosterol é o mais abundante nos alimentos, seguido do campesterol e estigmasterol (OSTLUND, 2002). Os fitosteróis diferem do colesterol (origem animal) por possuírem adicionalmente um grupamento etila ou metila na cadeia do carbono 24 (BERGMANN et al., 2005).



**Figura 5.** Estrutura química dos principais esteróis e estanolis.

Fonte: Ilha, 2009.

As propriedades terapêuticas dos fitosteróis estão sendo estudadas, como a redução da absorção do colesterol LDL e diminuição de problemas cardiovasculares (MARTINS et al., 2004; ANVISA, 2008). Estudos mostraram que a ingestão de fitosteróis, além de diminuir o colesterol ruim, não afeta os níveis de colesterol bom (MOREAU et al., 2002).

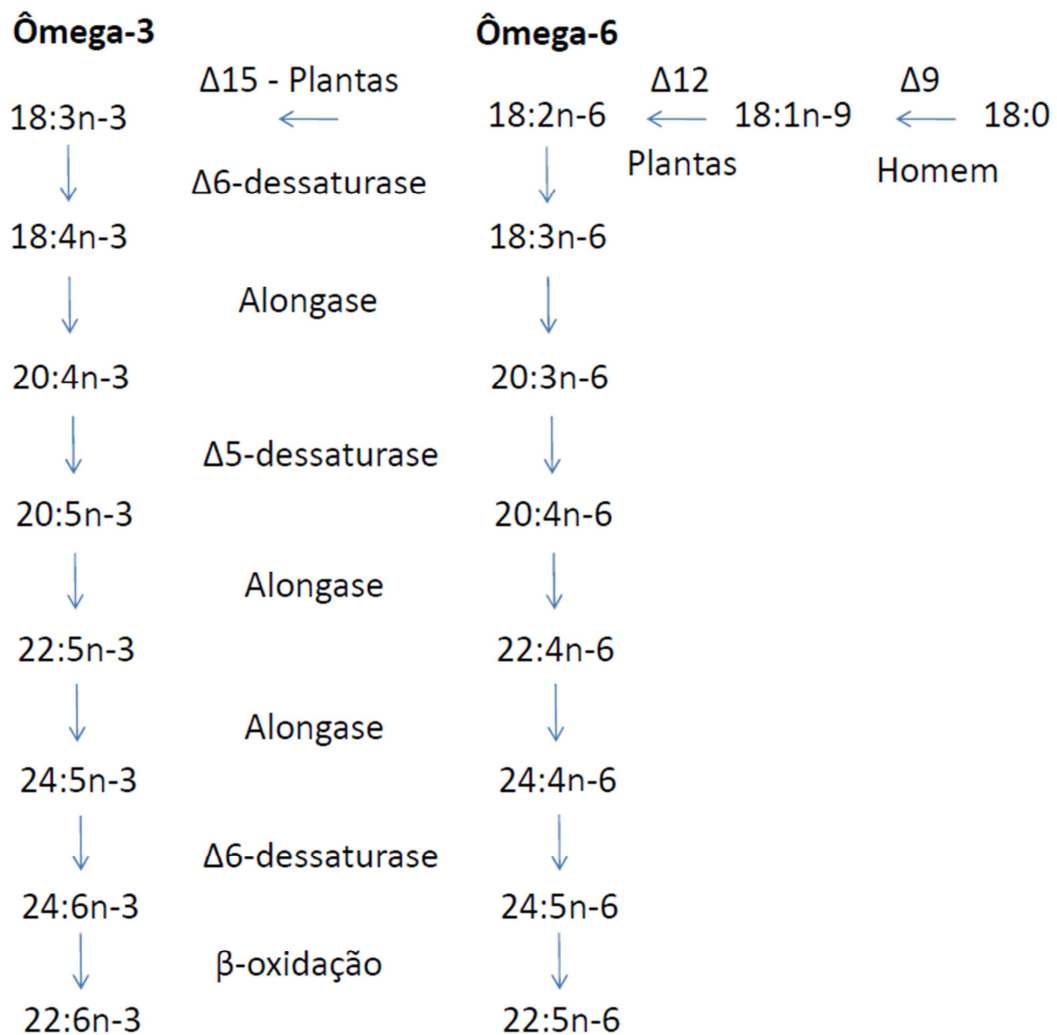
A determinação destes compostos é essencial para a avaliação analítica da qualidade e possível adulteração de óleos vegetais, pois cada óleo apresenta fitosteróis específicos (MOREAU et al., 2002; MOREDA, 2000).

## 2.5 Ácidos Graxos

A composição em ácidos graxos saturados e insaturados nos alimentos vem sendo amplamente estudada, devido as suas implicações à saúde humana e a necessidade de melhor compreensão de como estes elementos atuam no metabolismo (LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2015; CARBONERA et al., 2014; SCODITTI et al., 2014; SARGI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; SIMOPOULOS, 2011; CARVALHO et al., 2010).

Os ácidos graxos poliinsaturados abrangem as famílias de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, na qual são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoléico (18:2n-6) e alfa-linolênico (18:3n-3) por ação de enzimas alongase e dessaturase (Figura 6) (MARTIN et al., 2006). No organismo da classe dos mamíferos, também pode ocorrer a síntese de ácidos graxos monoinsaturados, sendo o principal substrato o ácido esteárico (18:0), precursor do ácido oléico (18:1n-9), através da ação da enzima  $\Delta 9$  dessaturase (NAKAMURA & NARA, 2004; BRENNER & PELUFO, 1966).

Em humanos, os ácidos linoléico e alfa-linolênico, considerados estritamente essenciais, são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, funções cerebrais, transmissão de impulsos nervosos, além de participarem da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (YEHUDA et al., 2002; YODIM et al., 2000).



**Figura 6.** Dessaturação e alongação esquemática dos ácidos graxos da série n-3 e n-6.

Fonte: Innis, 2003.

## 2.6 Métodos Convencionais de Extração de Óleos Vegetais

Os processos de extração de óleos comumente empregados em indústrias e laboratórios são por adição de solventes ou por prensagem. A prensagem é um método mais simples, na qual promove o esmagamento dos grãos onde apenas parte do óleo é removida, não obtendo um elevado rendimento de extração, sendo utilizado especialmente para a extração de óleos a partir de grãos com alto teor de lipídios, tais como girassol, gergelim,

canola, amendoim, entre outros, e principalmente quando se busca um óleo livre de contaminação por solventes (MARIANO, 2008).

As vantagens em utilizar a prensagem são: facilidade de transporte de equipamento (miniprensa), baixo consumo de energia, pequena área de ocupação, mão de obra não especializada e simplicidade na instalação (OLIVEIRA & VIEIRA, 2004). No entanto, ao final do processo o óleo bruto pode conter partículas sólidas e necessita passar por uma filtragem em um equipamento chamado filtro-prensa. Após este processo, a torta é encaminhada para o um novo processo de extração com solventes, enquanto o óleo extraído filtrado segue para as etapas de purificação (RAMALHO & SUAREZ, 2013).

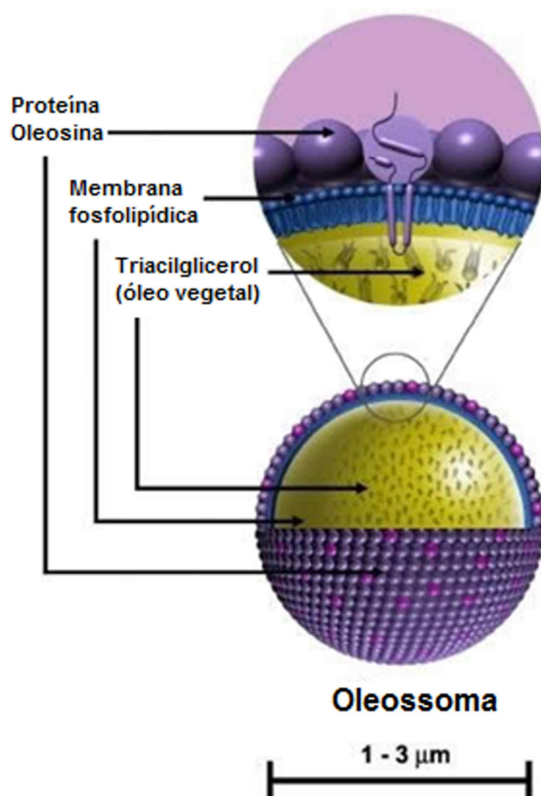
A extração por meio solventes geralmente utiliza compostos de característica apolar, sendo mais empregado o hexano. Apesar desta metodologia convencional apresentar rendimentos de extração superiores a 95%, o processo apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de eliminação do solvente ao término da extração, uso de fontes não renováveis (solventes derivados do petróleo), cuidados especiais na sua manipulação (líquidos de alta volatilidade e inflamabilidade), toxicidade dos solventes, necessidade de tratamento dos resíduos e alteração da qualidade original do produto no que diz respeito a alguns compostos importantes como antioxidantes e vitaminas lipossolúveis, principalmente devido à alta temperatura alcançada em algumas etapas (PARMENTIER et al., 2004; TURATTI, 1999).

Embora no Brasil a extração de óleos seja obtida, quase em sua totalidade, através do uso de solventes, a busca por óleos de alta qualidade tem levado os pesquisadores a encontrar técnicas seguras para extração de componentes desejados e ao mesmo tempo, reduzindo a degradação térmica e a contaminação com solventes (CORSO, 2008).

## 2.7 Extração via Enzimática em Meio Aquoso

A extração via enzimática em meio aquoso consiste no uso de enzimas que hidrolisam a parede celular e das membranas dos oleossomas (Figura 7), onde estão armazenados os lipídios na forma de vesículas no citoplasma celular, visando a liberação do óleo para o meio aquoso (BOTANECO, 2014). O óleo é separado da água por centrifugação resultando em um produto praticamente isento de fosfatídeos e conseqüentemente, com baixa turbidez (NASCIMENTO, 2004; COURI & FREITAS, 2001; FREITAS et al., 1998).

Esta tecnologia desponta como uma alternativa potencial para a extração de óleos vegetais, uma vez que o uso de solventes derivados de petróleo deverá ser substituído, no futuro, por processos tecnológicos mais sustentáveis, para atender às exigências dos órgãos governamentais de proteção ao meio ambiente (PARMENTIER, 2004).



**Figura 7.** Estrutura do oleossoma.

Fonte: Botaneco, 2014.

## 2.7.1 Parede Celular Vegetal e Enzimas

A célula vegetal é composta por dois tipos distintos de paredes, a parede celular primária e a secundária. As primárias consistem principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas. Já as paredes secundárias também apresentam compostos de celulose e hemicelulose, porém estão muitas vezes impregnados de lignina. Além dos polissacarídeos, a parede das células vegetais contém centenas de proteínas diferentes que estão dispostas e conectadas de uma forma muito bem organizada através de ligações (TAIZ & ZIEGER, 2002).

Tendo em vista que a parede celular é composta de diferentes polissacarídeos ligados a uma proteína estrutural, o extrato enzimático deve conter enzimas com diferentes atividades (celulases, hemicelulases, pectinases, amilases e proteases) (FREITAS et al., 1996).

Muitos micro-organismos desempenham um importante papel na conversão da biomassa vegetal produzindo verdadeiros coquetéis enzimáticos capazes de degradar os componentes da parede celular. Esse complexo de enzimas é necessário devido à elevada recalcitrância da biomassa, sendo que esses coquetéis enzimáticos possuem celulases, hemicelulases, pectinases, ligninases, alcalases e outras enzimas acessórias atuando de forma sincronizada e sinérgica no processo de degradação (FARINAS, 2011).

Embora o custo das enzimas ainda seja elevado, os trabalhos publicados recentemente constataam que o controle dos principais parâmetros que afetam esta técnica, tempo de extração, pH, temperatura e concentração das enzimas, podem viabilizar o custo da extração (ZHANG et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2008; SOTO et al., 2007).

Algumas pesquisas têm associado o processo de pré-irradiação ultrassônica a sementes de amêndoa e damasco (SHARMA & GUPTA, 2006) e do pinhão manso (SHAH et al., 2004), para aumentar o rendimento de extração e a qualidade do óleo quando extraído com enzimas. Um outro processo também associado ao uso de enzimas é a extração com fluido supercrítico (REZAEI & TEMELLI, 2000). Estas associações têm apresentado potencial para o desenvolvimento de novos procedimentos de extração que pretendem

tornar a extração enzimática de óleos vegetais viável economicamente (MARIANO, 2008).

## **2.8 Grãos Oleaginosos**

### **2.8.1 Girassol**

O grão de girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma oleaginosa que apresenta ampla capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, podendo ser cultivado em praticamente todo o território nacional, desde o Rio Grande do Sul até o hemisfério norte, no Estado de Roraima. Atualmente, é cultivado comercialmente principalmente nos Estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Paraná, Bahia e Ceará (EMBRAPA, 2015).

Um dos principais destinos da produção dos grãos de girassol é a indústria de óleo comestível (EMBRAPA, 2015), uma vez que esta oleaginosa apresenta elevado conteúdo em óleo, cerca de 50% de sua composição. O óleo de girassol possui baixa concentração de ácidos graxos saturados como o palmítico (16:0) e esteárico (18:0), e alta concentração de ácidos graxos insaturados, principalmente o linoléico (18:2n-6) e oléico (18:1n-9) (BRASIL, 2005), sendo uma excelente fonte de ácido linoléico, no qual embora seja essencial ao desempenho das funções fisiológicas do organismo humano, não é sintetizado pelo mesmo (SALGIN et al., 2006; PIIRONEN et al., 2000; HUI, 1996).

O óleo de girassol apresenta alto conteúdo de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), antioxidante natural, quando comparado a outros óleos comestíveis (PIIRONEN et al., 2000), sendo de suma importância que esta fração antioxidante seja preservada, pois a estabilidade oxidativa é um parâmetro utilizado para avaliar a qualidade dos óleos e gorduras e refletem a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento e armazenamento do produto (NIMET, 2009).



## 2.8.2 Gergelim

O grão de gergelim (*Sesamum indicum* L.) é cultivado no Brasil principalmente no Nordeste do país e no Centro-Sul (SLUSZZ & MACHADO, 2012). Dentre as diferentes áreas de aplicação desta oleaginosa (uso do óleo e dos grãos), pode-se destacar a gastronomia (BELTRÃO et al., 2013), a produção de biocombustíveis (SARVE et al., 2015; SAYDUT et al., 2008), aplicação na área farmacêutica (JEEVANA & SREELAKSHMI, 2011; INSYS THERAPEUTICS, 2006), assim como na produção de cosméticos (MARUNO, 2009) e no combate a pragas (FARIA et al., 2010).

O óleo extraído do grão de gergelim possui grande resistência à rancificação devido a presença de compostos fenólicos, como sesamol e tocoferóis. Após a extração, obtém-se o farelo desengordurado, no qual apresenta alto teor protéico (CORSO, 2008), podendo ser utilizado para nutrição animal e humana (FINCO et al., 2011; PRIMO, 2008; MAIA et al., 1999).

Estudos mostram que o consumo do óleo de gergelim por pacientes com hipertensão tem um efeito aditivo na redução da pressão arterial (SANKAR et al., 2004), auxiliam na melhoria efetiva da hiperglicemia (SANKAR et al., 2011) e na redução na incidência de certos tipos de câncer (MIYAHARA et al., 2001).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar uma tecnologia limpa de extração dos óleos dos grãos de girassol e de gergelim via enzimática em meio aquoso.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Comparar os óleos de girassol e gergelim obtidos por extração via enzimática em meio aquoso e por metodologias convencionais, como prensagem e extração com solventes.

Determinar a capacidade antioxidante de ambos os óleos vegetais frente aos radicais DPPH e peroxila.

Identificar e quantificar: tocoferóis, fitosteróis e ácidos graxos dos óleos por cromatografia em fase gasosa.

Analisar a composição proximal (umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais e carboidratos) dos grãos de girassol e gergelim.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Amostragem**

Os grãos de girassol e gergelim foram adquiridos no comércio local de Maringá-PR. A amostragem foi obtida pelo método do quarteamento sobre 1,5 kg do produto até obter três porções de 500 g como amostra. Os grãos foram trituradas em moinho analítico, homogeneizadas e peneiradas, sendo reservada apenas a fração com granulometria menor que 16 mesh. Em seguida, as farinhas obtidas foram embaladas à vácuo e estocadas sob refrigeração para posteriores análises.

### **4.2 Composição Proximal**

A composição proximal de um alimento exprime a proporção de componentes em 100 g de produto considerado e consiste basicamente nas determinações de umidade ou voláteis, cinzas ou resíduo mineral, proteína bruta, lipídios totais e carboidratos.

#### **4.2.1 Umidade e Cinzas**

As análises de umidade e cinzas foram realizadas conforme técnicas da AOAC (CUNNIFF, 1998). Aproximadamente 3,0 g das amostras foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados em mufla a 600°C e devidamente tarados e pesados em balança analítica ( $\pm 0,1$  mg). Estes foram levados à estufa e mantidos a 105°C por 4 horas, sendo então transferidos para um dessecador, resfriados por 30 minutos e pesados. As operações de aquecimento e resfriamento se repetiram até peso constante. O teor de umidade foi determinado por diferença de massas.

Para a determinação do teor de cinzas, as amostras foram colocadas em mufla a 600°C por aproximadamente 6 horas ou até a obtenção de uma cinza clara, sinal da ausência completa de matéria orgânica. Após, os cadinhos foram colocados em dessecador por cerca de 30 minutos. O teor de cinzas na amostra foi determinado gravimetricamente por diferença de massas.

#### 4.2.2 Proteína Bruta

A análise do teor de proteína bruta na amostra foi conduzida conforme Cunniff (1998). Este método consiste de três etapas: (a) digestão das amostras, (b) destilação da amônia e (c) titulação.

A quantidade de nitrogênio total na amostra foi dosada e através de uma conversão apropriada foi obtida a quantidade de proteína bruta na amostra. Para tanto, foram pesados 100 – 300 mg ( $\pm 0,1$  mg) de amostra e transferidos para tubos digestores. A estes foram adicionados cerca de 2,0 g de mistura catalítica (100,0 partes de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, 1,0 parte de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 0,8 partes de selênio metálico em pó) e 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Estes tubos foram colocados no digestor (Büchi, Suíça) à temperatura ambiente, sendo esta elevada gradativamente na ordem de  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  até atingir  $350^\circ\text{C}$ . O tempo total de digestão foi de aproximadamente 6 horas.

Resfriados à temperatura ambiente, os tubos foram acoplados ao destilador (Büchi, Suíça), onde através da reação com NaOH 40% todo o nitrogênio contido na amostra foi transformado em  $\text{NH}_3$  e coletado em um erlenmeyer contendo 30,0 mL de ácido bórico 4% e 5 gotas de indicador (mistura de vermelho de metila e verde de bromocresol). A solução resultante foi titulada com solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

O teor de proteína bruta foi calculado através das seguintes equações:

Equação 1:

$$\%N = \frac{V \cdot N \cdot f \cdot 14 \cdot 100}{M}$$

Sendo: %N = porcentagem de nitrogênio total da amostra; V = volume de HCl gasto na titulação; M = concentração da solução padrão de HCl; f = fator de correção do padrão; m = massa da amostra (mg).

Equação 2:

$$\%PB = \%N \cdot FE$$

Sendo: %PB = porcentagem de proteína bruta contida na amostra; FE = fator específico (FE girassol = 5,46 e FE gergelim = 5,30).

### **4.2.3 Lipídios Totais (Extração com Solventes)**

Os lipídios totais foram extraídos segundo método proposto por Bligh & Dyer (1959). Foram pesados cerca de 3,0 g ( $\pm 0,1$  mg) de amostra e adicionados 12,0 mL de água para correção da umidade conforme o método. Na sequência foram adicionados 30,0 mL de metanol e 15,0 mL de clorofórmio e as amostras foram levadas à agitação magnética por 5 minutos. Após, foram adicionados mais 15 mL de clorofórmio e, em seguida, levadas sob agitação magnética por 2 minutos com posterior adição de 15,0 mL de água e agitação por mais 5 minutos. A mistura foi filtrada a vácuo em funil de Büchner com papel filtro quantitativo e a solução obtida transferida para funil de separação. Após separação das fases aquosa e orgânica, a fase orgânica, contendo clorofórmio e os lipídios, foi recolhida em balão de fundo chato de 250 mL, com posterior retirada do solvente em evaporador rotatório à vácuo com banho à 35°C. O teor de lipídios foi determinado gravimetricamente por diferença de massas.

### **4.2.4 Carboidratos**

O teor de carboidratos foi obtido através do cálculo da diferença entre 100 (cem) e a soma dos demais componentes químicos, conforme a Equação 3 (HOLLAND, et al., 1994).

Equação 3:

$$\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ PB} + \% \text{ LT})$$

Sendo: PB = proteína bruta; LT= lipídios totais (extração por solventes).

### **4.3 Extração do Óleo por Prensagem**

Aproximadamente 100,0 g das amostras, previamente secas em estufa com ventilação a 50°C por cerca de 14 horas, foram colocadas em um cilindro de aço inox e levadas à prensa (pem mod. PHP 30 t) sob uma pressão de 10 toneladas durante 5 horas (SANTOS et al., 2014). Os óleos obtidos foram pesados e armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados sob refrigeração para posteriores análises.

### **4.4 Extração do Óleo via Enzimática em Meio Aquoso**

Os experimentos da extração via enzimática em meio aquoso foram conduzidos conforme descrito por Santos e Ferrari (2005). Inicialmente, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico em estufa a 105°C por 45 minutos, visando provável inativação das enzimas naturais que, porventura, poderiam estar presentes e influenciar a hidrólise enzimática.

As extrações foram realizadas em duas etapas, na qual foram utilizadas 3 enzimas diferentes durante o processo: Pectinex Ultra SPL (Sigma), Celluclast 1.5L (Sigma) e Alcalase 2.4L (Sigma), sendo todas aplicadas para o grão de girassol e somente a Pectinex Ultra SPL e a Alcalase 2.4L para o grão de gergelim.

Na primeira etapa, foram pesados 5,0 g das amostras e adicionou-se água nas proporções 1:6, 1:8 e 1:10 amostra:água (m/v). O pH da mistura foi corrigido para 4,5 com solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e, em seguida, adicionou-se as enzimas Pectinex Ultra SPL e Celluclast 1.5L para o girassol e somente a

Pectinex Ultra SPL para o gergelim, nas concentrações 6%, 8% e 10% em relação a quantidade de água adicionada (v/v). Em seguida, a mistura foi mantida a 50°C e a uma agitação de 100 rpm por 4, 6 e 8 horas em incubadora shaker (modelo CT 712). Após o período de incubação, os frascos contendo as amostras foram armazenados sob refrigeração.

Na segunda etapa, o pH foi ajustado para 7,0 com adição de solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> e acrescentou-se a Alcalase 2.4L nas mesmas concentrações citadas na primeira etapa. Em seguida, as amostras foram incubadas a 55°C com agitação de 100 rpm por 4, 6 e 8 horas em incubadora shaker (modelo CT 712). Após o período de incubação, as amostras foram armazenadas sob refrigeração.

Para auxiliar a separação entre a fase aquosa e o óleo livre, a mistura foi aquecida a 60°C por 15 minutos e centrifugada por mais 15 minutos. O óleo livre foi recolhido com micropipeta e pesado para determinação do rendimento de extração.

#### **4.4.1 Planejamento Fatorial**

As extrações dos óleos de girassol e gergelim via enzimática em meio aquoso foram conduzidas a partir de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com ponto central em triplicata (Tabela 1), utilizando-se o Software Design Expert v.7.1.3, tendo como principais fatores a concentração das enzimas Pectinex Ultra SPL, Celluclast 1.5L e Alcalase 2.4L, proporção amostra:água e tempo de extração, sendo avaliada apenas uma resposta, o rendimento da extração dos óleos.

**Tabela 1.** Planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central para a extração dos óleos de girassol e gergelim via enzimática em meio aquoso.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	Enzimas	Amostra:Água	Tempo	Enzimas (%)	Amostra:Água (m/v)	Tempo (horas)
1	-1	-1	-1	6	1:6	4
2	+1	-1	-1	10	1:6	4
3	-1	+1	-1	6	1:10	4
4	+1	+1	-1	10	1:10	4
5	-1	-1	+1	6	1:6	8
6	+1	-1	+1	10	1:6	8
7	-1	+1	+1	6	1:10	8
8	+1	+1	+1	10	1:10	8
9	0	0	0	8	1:8	6
10	0	0	0	8	1:8	6
11	0	0	0	8	1:8	6



## 4.5 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante dos óleos de girassol e gergelim foram determinadas através dos ensaios de DPPH e L-ORAC.

O ensaio de atividade sequestrante do radical DPPH foi realizado conforme descrito por Masuda et al. (1999) e Brand-Williams et al. (1995) com modificações de Ma et al. (2011). 25 µL da amostra foram adicionados a 2 mL de solução metanólica de DPPH  $6,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Após uma leve agitação e 30 minutos de repouso à temperatura ambiente, a absorbância das soluções resultantes foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

A curva de calibração para o ensaio de DPPH foi construída utilizando como padrão de referência Trolox, sendo este solubilizado em metanol, nas seguintes concentrações: 0; 291,8; 572,1; 868,9; 1158,7; 1449,6; 1735,4; 2003,7; 2323,8; 2890,4 µmol Trolox  $\text{L}^{-1}$ . A equação da reta e o coeficiente de regressão obtidos para este ensaio foram:

Equação 4:

$$y = - 0,0002 \cdot x + 0,6897$$
$$R^2 = 0,990$$

A capacidade antioxidante lipofílica foi determinada pelo ensaio de L-ORAC (*Lipophilic - Oxygen Radical Absorbance Capacity*) conforme descrito por Prior et al. (2003), utilizando a β-ciclodextrina randomicamente metilada (RMCD) como intensificador de solubilidade em água para as substâncias antioxidantes lipofílicas (HUANG, et al., 2002).

Cerca de 0,05 g dos óleos de girassol e gergelim foram pesados e solubilizados em 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de solução RMCD 7% (50% acetona/50% água, v/v). Em seguida, foram adicionados à microplaca 20 µL destas amostras e 200 µL de solução de fluoresceína e levadas ao aquecimento a 37°C no espectrofluorímetro por 5 minutos. Após, foram adicionados 75 µL de AAPH ( $17,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) à microplaca e esta foi encaminhada novamente ao aparelho para efetuar a leitura do decaimento da fluorescência durante 30 minutos.

Os espectros do decaimento da fluorescência foram obtidos em espectrofluorímetro (modelo Perkin Elmer Victor X4) com filtro com comprimento de onda de excitação a 485 nm e emissão a 520 nm.

A curva de calibração foi construída utilizando como padrão de referência Trolox, sendo este solubilizado em solução de RMCD (50% acetona/50% água, v/v), nas seguintes concentrações: 4,9; 7,3; 9,7; 34,1 e 48,7  $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ . A equação da reta e o coeficiente de regressão obtidos para este ensaio foram:

Equação 5:

$$y = 0,1885.x + 2,1336$$

$$R^2 = 0,991$$

Os resultados de ambos ensaios foram expressos em capacidade antioxidante equivalente Trolox por grama de óleo.

#### **4.6 Tocoferóis e Fitoesteróis**

A determinação dos tocoferóis e fitosteróis foi feita simultaneamente por GC-MS conforme Du e Ahn (2002). Os óleos extraídos foram derivatizados de acordo com Beveridge et al., (2002), usando derivatizante BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) cujo grupo reativo é o trimetilsilano.

A análise foi procedida no Laboratório de Tecnologia Supercrítica e Equilíbrio de Fases no departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, em cromatógrafo à gás, Agilent modelo 7890A (Agilent-Technologies) equipado com coluna capilar DB-5 (5% fenil, 95% metilpolissiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme da fase estacionária (J & W Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas Agilent modelo 5975C (VL MSD), equipado com fonte de ionização por elétrons e analisador de massas do tipo quadrupolo. O sistema de aquisição de dados foi efetuado através do

software GC-MS Data Analysis que acompanha base de dados de espectros contidos na biblioteca espectral NIST MS Search version 2.0.

A vazão do gás foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (He – 5.0). As injeções foram realizadas em triplicatas, o volume de injeção foi de 2 µL e a razão de divisão da amostra (split) foi de 1/10. A temperatura do injetor e do detector foi 280°C. A temperatura da coluna foi programada a 200°C durante 8 min, seguido por rampa de 3°C min<sup>-1</sup> até atingir 235°C, por 3 min, seguida de outra rampa de 15°C min<sup>-1</sup> até 280°C por 15 min, totalizando 40,66 min. A temperatura da linha de transferência entre o CG e o MS foi de 250°C.

A quantificação dos compostos foi realizada em relação ao padrão interno 5-α-colestano (Sigma) conforme a equação, de acordo com Li et al. (2007):

Equação 6:

$$M_y = \frac{100 \cdot (PA_S) \cdot (m_{IS})}{PA_{IS} \cdot m}$$

Onde:  $M_y$  é a massa do composto de interesse (em mg do composto por 100 g de óleo),  $PA_S$  corresponde a área do pico do composto,  $PA_{IS}$  a área do pico do padrão interno,  $m_{IS}$  a massa do padrão interno (mg) e  $m$  a massa de óleo (g).

## 4.7 Ácidos Graxos

A metilação dos ácidos graxos dos lipídios totais foi realizada segundo o método descrito por Hartman & Lago (1973). Os ésteres de ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo a gás da Thermo, modelo Trace Ultra 3300, com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP – 7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de cianopropil). As vazões dos gases foram de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (H<sub>2</sub>), 30 mL min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>) e 35 e 350 mL min<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub> e para o ar sintético, respectivamente, para a chama do detector. O volume de injeção foi de 2 µL e a razão de divisão da amostra (*split*) foi de

1/80. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200°C e 240°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 165°C durante 7 min, seguido por rampa de 4°C min<sup>-1</sup> até atingir 185°C, permanecendo assim por 3 min, com outra rampa de 6°C min<sup>-1</sup> até 235°C totalizando 28 min de análise.

A identificação dos ácidos graxos foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção com padrões Sigma (EUA) e o cálculo das áreas dos picos determinadas através do software ChromQuest 5.0. A quantificação destes em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (Sigma). Os cálculos foram realizados conforme Joseph e Ackman (1992) e Visentainer (2012), utilizando-se a equação:

Equação 7:

$$M_x = \frac{A_x \cdot M_P \cdot F_{CT}}{A_P \cdot M_A \cdot F_{CEA}}$$

Onde: M<sub>x</sub> = Massa do ácido graxo X em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais, A<sub>x</sub> = Área do ácido graxo X, M<sub>P</sub> = Massa do padrão interno em miligramas, F<sub>CT</sub> = Fator de correção teórico, A<sub>P</sub> = Área do padrão interno, M<sub>A</sub> = Massa da amostra em gramas, F<sub>CEA</sub> = fator de conversão éster metílico para ácido graxo.

## 4.8 Análise Estatística

Os resultados, expressos em média ± desvio padrão, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de 95% de confiança, pelo teste de Tukey, através do Software Statistica versão 8.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição Proximal

A Tabela 2 apresenta os resultados da composição proximal (umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais e carboidratos) dos grãos de girassol e gergelim.

**Tabela 2.** Composição proximal dos grãos de girassol e gergelim.

Análises	Girassol	Gergelim
Umidade (%)	4,21 <sup>a</sup> ± 0,08	3,45 <sup>b</sup> ± 0,07
Cinzas (%)	3,42 <sup>a</sup> ± 0,02	3,02 <sup>b</sup> ± 0,03
Proteína Bruta (%)	19,31 <sup>a</sup> ± 0,27	20,21 <sup>a</sup> ± 0,64
Lipídios Totais (%)*	55,05 <sup>b</sup> ± 0,67	59,97 <sup>a</sup> ± 0,81
Carboidratos (%)	18,02 <sup>a</sup> ± 0,73	12,75 <sup>b</sup> ± 1,04

\*Extração por solventes. Média ± desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

A partir dos resultados obtidos para a composição proximal, observa-se que os principais componentes das oleaginosas foram proteína bruta, lipídios totais e carboidratos. Ambos grãos demonstraram um elevado teor de óleo.

A composição proximal do grão de girassol determinada neste estudo apresentou resultados inferiores quanto aos teores de cinzas, proteína bruta e carboidratos quando comparados aos resultados obtidos por Nimet (2009) e por Watt e Merrill (1979), citado por Carrão-Panizzi e Mandarino (2005). O grau de umidade encontrado foi próximo ao valor determinado por estes mesmos autores (4,8%). Em relação ao conteúdo em lipídios totais, o conteúdo determinado foi maior que o reportado por Nimet (2009), na qual obteve um resultado de 41,3% pela metodologia de Soxhlet. O grão de girassol possui em média, 47,3% de lipídios (O'BRIEN, 2009).

Estas pequenas variações na composição dos grãos são esperadas uma vez, que as condições do solo, precipitação pluvial, clima, radiação solar incidente na cultura e até a escolha da época de semeadura, interferem no

desenvolvimento da planta (THOMAZ et al. 2012; AGUIRREZÁBAL et al. 2001).

O teor de óleo determinado para o grão de gergelim está de acordo com o estudo realizado por Antoniassi et al. (2013), que avaliando a composição em grãos de gergelim em condições sob regime de irrigação encontrou teores de óleo variando de 47,74 a 60,71%, e sob regime de sequeiro a amplitude de variação foi de 47,08 a 53,64% (óleo extraído com éter de petróleo em aparelho Soxhlet por 16 horas).

De acordo com Egbekun & Ehieze (1997), a variação no rendimento de extração do óleo dos grãos de gergelim ocorre em função de diferenças de genótipos, condições climáticas, estágio de maturação da planta, época de colheita e método de extração usado. Were et al. (2006) relatam que a crescente disponibilidade de água durante o desenvolvimento das cápsulas de gergelim leva a um maior conteúdo de óleo nas sementes. O teor de proteína bruta foi próximo aos mencionados por Antoniassi et al. (2013), para amostras de gergelim de diferentes locais de cultivo (18,95 – 23,16%) e Corso (2008) que reportou um teor de 20,7%.

O valor de carboidratos determinado neste estudo foi menor que o obtido por Corso (2008) que obteve uma quantidade de 15,9%. Os teores de umidade e cinzas demonstraram-se abaixo dos citados nos estudos de Hahm et al. (2009) e Elleuch et al. (2007).

## **5.2 Extração de Óleos Vegetais**

### **5.2.1 Extração via Enzimática em Meio Aquoso**

A seleção das enzimas para a extração via enzimática requer o conhecimento da composição do tecido vegetal da oleaginosa a ser processada. Tendo em vista que a parede celular é composta por diferentes polissacarídeos ligados a uma proteína estrutural, o extrato enzimático deveria conter enzimas com diferentes atividades (celulases, hemicelulases, pectinases, amilases e proteases). Portanto, optou-se pelas seguintes enzimas:

Pectinex Ultra SPL (pectinase), Alcalase 2.4L (protease) e a Celluclast 1.5L (celulase).

Além da escolha dos tipos de enzimas mais adequadas a serem utilizadas, alguns parâmetros como pH e temperatura ótima das enzimas, proporção amostra:água e tempo de extração foram considerados, pois estas condições também influenciam no rendimento da extração.

Os resultados obtidos para a extração do óleo de girassol e gergelim via enzimática em meio aquoso a partir do planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central, em triplicata, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Planejamento fatorial  $2^3$  com ponto central e rendimento do processo de extração dos óleos de girassol e gergelim via enzimática em meio aquoso.

ENSAIOS	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			RENDIMENTO (%)	
	Enzimas	Amostra:Água	Tempo	Enzimas (%)	Amostra:Água (m/v)	Tempo (horas)	Girassol	Gergelim
1	-1	-1	-1	6	1:6	4	27,39	26,74
2	+1	-1	-1	10	1:6	4	29,68	29,55
3	-1	+1	-1	6	1:10	4	22,33	20,33
4	+1	+1	-1	10	1:10	4	23,12	21,96
5	-1	-1	+1	6	1:6	8	34,74	35,42
6	+1	-1	+1	10	1:6	8	36,60	36,65
7	-1	+1	+1	6	1:10	8	29,44	27,34
8	+1	+1	+1	10	1:10	8	28,27	27,61
9	0	0	0	8	1:8	6	27,63	28,98
10	0	0	0	8	1:8	6	27,34	29,12
11	0	0	0	8	1:8	6	27,26	30,04



O maior rendimento de extração dos óleos via enzimática em meio aquoso obtido, a partir do planejamento fatorial, foi de 36,60% e 36,65% para os grãos de girassol e gergelim, respectivamente, nas condições com 10% das enzimas (pectinase, celulase e protease para o girassol e apenas pectinase e alcalase para o gergelim), proporção amostra:água de 1:6 (m/v) e tempo de extração de 8 horas.

Com o intuito de aumentar o rendimento de extração dos óleos via enzimática, levando em consideração os dados já obtidos, um novo ensaio foi realizado nas seguintes condições: 10% de cada enzima (pectinase, celulase e alcalase) para ambos os grãos oleaginosos, proporção amostra:água 1:6 (m/v) e 16 horas de extração. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Comparação do rendimento de extração via enzimática em meio aquoso dos óleos de girassol e gergelim obtidos em diferentes tempos de extração.

FATORES			RENDIMENTO (%)	
Enzimas (%)	Amostra:Água (m/v)	Tempo (horas)	Girassol	Gergelim
10	1:6	8	36,60 <sup>a</sup> ± 0,56	36,65 <sup>b</sup> ± 0,18
10	1:6	16	33,52 <sup>b</sup> ± 0,72	40,93 <sup>a</sup> ± 0,55

Média ± desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

O processo enzimático com 16 horas proporcionou um rendimento de extração mais elevado, comparado ao de 8 horas, apenas para o grão de gergelim. Esse aumento pode estar relacionado ao fato de ter sido utilizado as três enzimas para esta amostra neste ensaio. Os resultados demonstrados na Tabela 4 indicam que para o girassol, nas condições analisadas: 10% de cada enzima, proporção amostra:água 1:6 e 8 horas de extração, o nível de equilíbrio entre enzima e substrato provavelmente já tenha sido alcançado, pois não foi observado aumento no rendimento de extração do óleo após alterar o apenas tempo de extração.

## 5.2.2 Análise de Variância (ANOVA)

Na Tabela 5 e Tabela 6, estão apresentados os resultados obtidos pela ANOVA para o rendimento de extração do óleo de girassol e de gergelim via enzimática em meio aquoso, respectivamente.

**Tabela 5.** Análise de variância para a resposta rendimento de extração do óleo de girassol via enzimática em meio aquoso.

Termos	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Valor F	p-valor
A	1	1,78	1,78	5,60	0,0643
B	1	79,70	79,70	251,02	< 0,0001
C	1	87,98	87,98	277,11	< 0,0001
AB	1	2,57	2,57	8,08	0,0361
Curvatura	1	5,15	5,15	16,22	0,0100
Residual	5	1,59	0,32		
Falta de ajuste	3	1,51	0,50	13,29	0,0708
Erro puro	2	0,076	0,038		
Total	10	178,75			

A = Concentração das enzimas; B = Proporção amostra:água; C = Tempo de extração.

A análise de variância para a extração via enzimática do óleo de girassol demonstrou que os termos: proporção amostra:água, tempo de extração e a interação entre concentração das enzimas e proporção amostra:água foram significativas para o modelo.

A análise dos efeitos para a amostra de girassol, considerando os níveis avaliados no planejamento fatorial, mostrou que o tempo de extração e a proporção amostra:água foram os fatores mais significativos do processo de extração com uma contribuição de 49,22 e 44,58%, respectivamente.

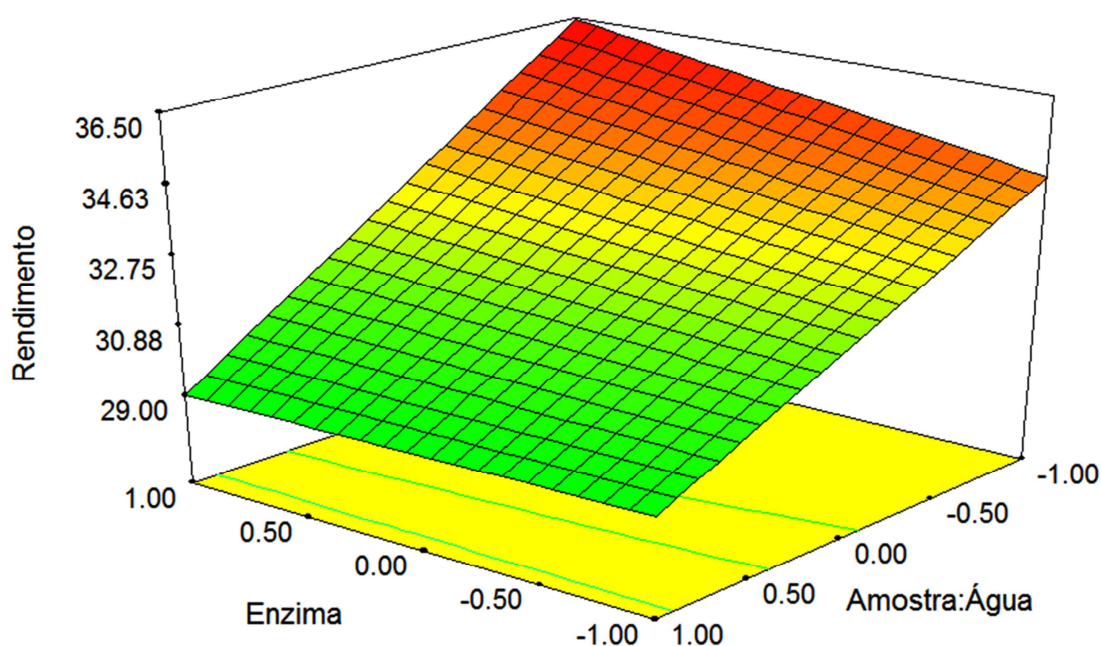
A curvatura, neste caso, foi significativa, o que indica que há uma diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais. A falta de ajuste não foi significativa. A equação matemática e o coeficiente de regressão obtidos para este modelo foram:

Equação 8:

$$y = 28,95 + 0,47 \cdot x_1 - 3,16 \cdot x_2 + 3,32 \cdot x_3 - 0,57 \cdot x_1 \cdot x_2$$

$$R^2 = 0,991$$

Onde:  $y$  = rendimento de extração do óleo;  $x_1$  = concentração das enzimas;  $x_2$  = proporção amostra:água;  $x_3$  = tempo de extração.



**Figura 8.** Superfície de resposta para a extração do óleo de girassol via enzimática em meio aquoso.

**Tabela 6.** Análise de variância para a resposta rendimento de extração do óleo de gergelim via enzimática em meio aquoso.

Termos	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Valor F	$p$ -valor
A	1	4,41	4,41	7,48	0,0340
B	1	121,06	121,06	205,24	< 0,0001
C	1	101,10	101,10	171,41	< 0,0001
Curvatura	1	3,04	3,04	5,15	0,0637
Residual	6	3,54	0,59		
Falta de ajuste	4	2,88	0,72	2,17	0,3397
Erro puro	2	0,66	0,33		
Total	10	233,15			

A = Concentração das enzimas; B = Proporção amostra:água; C = Tempo de extração.

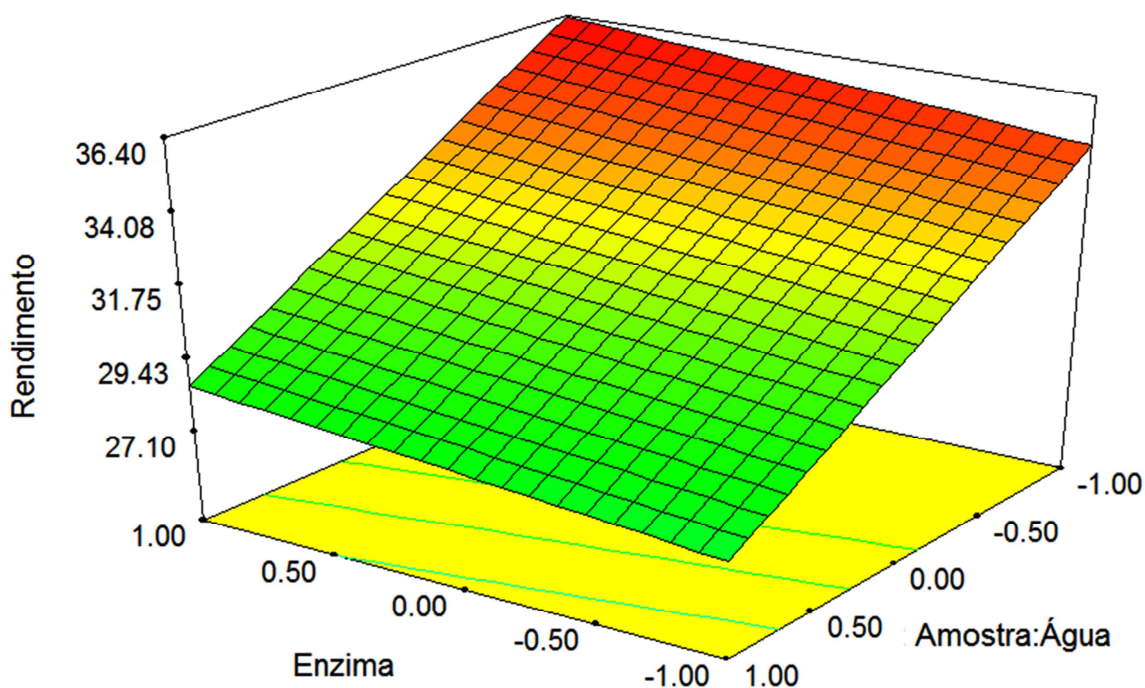
O estudo dos efeitos para o óleo de gergelim demonstrou que apenas os termos: concentração das enzimas, proporção amostra:água e tempo de extração foram significativos, sendo os fatores mais significativos do processo de extração: o tempo e a proporção amostra:água com uma contribuição de 43,36 e 51,92%, respectivamente.

A ANOVA para o rendimento de extração do óleo de gergelim indicou que a curvatura não foi significativa, assim como a falta de ajuste. Os resíduos se distribuíram aleatoriamente e os valores do teste F e  $p$ -valor apontaram que o modelo foi satisfatoriamente ajustado e significativo. A equação matemática e o coeficiente de regressão obtidos para a extração via enzimática do óleo de gergelim são apresentados na equação a seguir.

Equação 9:

$$y = 28,20 + 0,74.x_1 - 3,89.x_2 + 3,56.x_3$$
$$R^2 = 0,985$$

Onde:  $y$  = rendimento de extração do óleo;  $x_1$  = concentração das enzimas;  $x_2$  = proporção amostra:água;  $x_3$  = tempo de extração.



**Figura 9.** Superfície de resposta para a extração do óleo de gergelim via enzimática em meio aquoso.

### 5.2.3 Extração dos Óleos por Metodologias Convencionais

Na Tabela 7 estão apresentados os rendimentos das extrações dos óleos de girassol e gergelim obtidos pelas metodologias convencionais: solventes e prensagem.

Visando comparar as porcentagens de extração entre as diferentes metodologias, também foram acrescentados à Tabela 7 os rendimentos máximos obtidos para as extrações via enzimática em meio aquoso dos óleos de ambas oleaginosas em estudo (Tabela 3 e Tabela 4).

**Tabela 7.** Rendimento, em %, dos processos de extração dos óleos dos grãos de girassol e gergelim obtidos por diferentes metodologias.

Metodologia	Amostras	
	Girassol	Gergelim
Solventes	55,05 <sup>a</sup> ± 0,67	59,97 <sup>a</sup> ± 0,81
Prensagem	36,77 <sup>b</sup> ± 0,50	42,00 <sup>b</sup> ± 0,21
Enzimática	36,60 <sup>b</sup> ± 0,56	40,93 <sup>b</sup> ± 0,55

Média ± desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Considerando a metodologia por solventes como a máxima extração dos óleos (100%), através da metodologia convencional por prensagem obteve-se cerca de 66,8% e 70,0%, e para a extração via enzimática em meio aquoso 66,5% e 68,3% do óleo de girassol e de gergelim, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as técnicas: prensagem e enzimática, demonstrando que esta última, nas condições avaliadas, é capaz de extrair a mesma quantidade de óleo que uma metodologia convencional.

### 5.3 Capacidade Antioxidante

Vários estudos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005) afirmam que

não é possível comparar a capacidade antioxidante quantitativamente entre diferentes técnicas, devido às diferenças entre as metodologias, solventes utilizados, diversos tipos de radicais e diferentes alvos de oxidação. Dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a real atividade antioxidante de um composto. Portanto, estudos recomendam, realizar ao menos dois ou, se possível, todos os ensaios mais utilizados (DPPH, FRAP, ORAC e ABTS para óleos vegetais) para a obtenção de informações mais completas quanto à capacidade antioxidante dos óleos (ALVES et al., 2010; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006; HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005).

Para avaliar a composição dos óleos dos grãos de girassol e gergelim extraídos por metodologias convencionais e via enzimática quanto a capacidade antioxidante, foram realizados dois ensaios: atividade sequestrante do radical DPPH e atividade antioxidante através da inibição da oxidação induzida pelo radical peroxila pelo método de L-ORAC. A Tabela 8 e Tabela 9 apresentam os resultados obtidos nestes ensaios.

**Tabela 8.** Capacidade antioxidante do óleo de girassol e gergelim extraído por diferentes metodologias pelo método de DPPH.

Método de Extração	µmol Trolox g <sup>-1</sup> de óleo	
	Girassol	Gergelim
Solventes	86,71 <sup>b</sup> ± 3,54	68,28 <sup>c</sup> ± 1,79
Prensagem	106,18 <sup>a</sup> ± 3,89	88,85 <sup>b</sup> ± 2,57
Enzimática	87,98 <sup>b</sup> ± 3,89	128,54 <sup>a</sup> ± 4,60

Média ± desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey (p<0,05).

O óleo de girassol apresentou melhor capacidade antioxidante frente ao radical DPPH quando extraído pelo processo de prensagem. Em relação aos métodos: solventes e enzimática, os valores obtidos foram considerados estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a 95% de confiança. Para o ensaio de L-ORAC, o óleo de girassol obtido pela extração via enzimática apresentou a capacidade antioxidante mais elevada frente ao radical peroxila, sendo 1,6

vez maior que a capacidade antioxidante do óleo extraído com solventes e cerca de 2 vezes maior que o obtido por prensagem.

**Tabela 9.** Capacidade antioxidante do óleo de girassol e gergelim extraído por diferentes metodologias pelo método de L-ORAC.

Método de Extração	$\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ de óleo	
	Girassol	Gergelim
Solventes	225,71 <sup>b</sup> $\pm$ 2,68	204,04 <sup>c</sup> $\pm$ 10,21
Prensagem	181,94 <sup>c</sup> $\pm$ 11,11	230,22 <sup>b</sup> $\pm$ 2,97
Enzimática	371,53 <sup>a</sup> $\pm$ 12,65	349,98 <sup>a</sup> $\pm$ 0,66

Média  $\pm$  desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O óleo de gergelim obtido através da extração enzimática em meio aquoso demonstrou uma capacidade antioxidante maior em ambos ensaios realizados, frente ao radical DPPH e frente ao radical peroxila (L-ORAC), sendo 88,3% e 71,5%, respectivamente, maiores que a capacidade antioxidante do óleo de gergelim extraído com solventes. A capacidade antioxidante do óleo de gergelim obtido por prensagem se demonstrou intermediária às outras metodologias frente aos radicais analisados.

Em ambos ensaios o óleo de gergelim apresentou o mesmo perfil, considerando a relação capacidade antioxidante e método de extração do óleo, isto indica que o método enzimático foi capaz de extrair uma maior quantidade de compostos antioxidantes juntamente com o óleo deste grão, diferentemente das metodologias convencionais.

#### 5.4 Tocoferóis e Fitosteróis

A Tabela 10 e Tabela 11 apresentam as quantificações dos tocoferóis e fitosteróis presentes nos óleos de girassol e gergelim, respectivamente, extraídos com solventes, por prensagem e via enzimática. A Figura 10 e Figura 11 demonstram cromatogramas representativos obtidos para ambas amostras.

**Tabela 10.** Quantificação de tocoferóis e fitosteróis em mg 100 g<sup>-1</sup> de óleo de girassol.

Método de Extração	$\alpha$ -Tocoferol	Fitosteróis			Fitosteróis Totais
		Campesterol	Estigmasterol	$\beta$ -Sitosterol	
Solventes	48,46 <sup>a</sup> $\pm$ 2,38	17,17 <sup>a</sup> $\pm$ 2,16	19,75 <sup>a</sup> $\pm$ 1,27	130,03 <sup>b</sup> $\pm$ 3,75	166,95 <sup>b</sup> $\pm$ 3,65
Prensagem	48,69 <sup>a</sup> $\pm$ 5,43	17,29 <sup>a</sup> $\pm$ 3,31	17,16 <sup>a</sup> $\pm$ 2,06	121,06 <sup>b</sup> $\pm$ 1,29	155,52 <sup>b</sup> $\pm$ 4,01
Enzimática	40,84 <sup>b</sup> $\pm$ 0,17	19,85 <sup>a</sup> $\pm$ 0,99	19,34 <sup>a</sup> $\pm$ 1,30	143,81 <sup>a</sup> $\pm$ 6,70	183,00 <sup>a</sup> $\pm$ 6,90

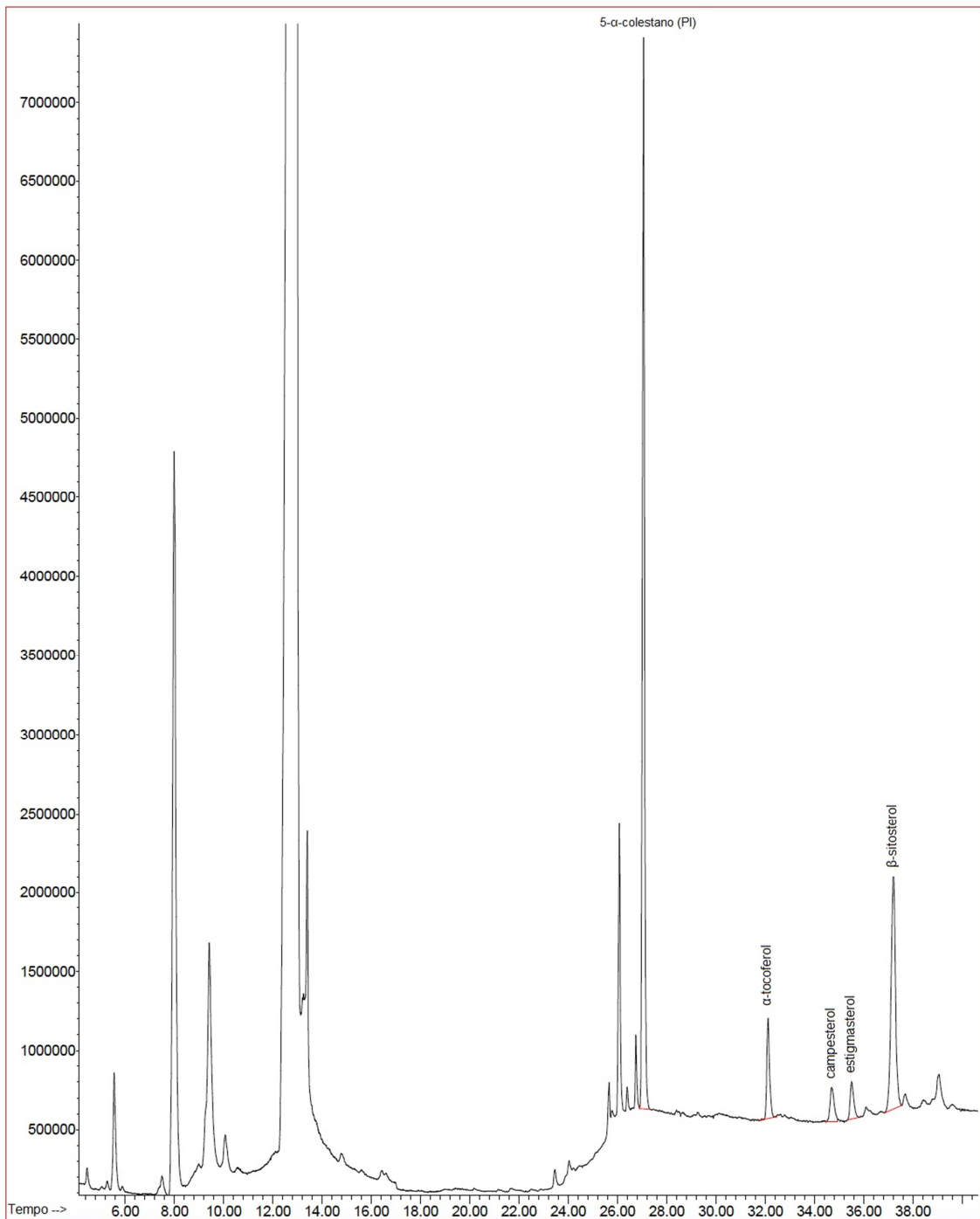
Média  $\pm$  desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 11.** Quantificação de tocoferóis e fitosteróis em mg 100 g<sup>-1</sup> de óleo de gergelim.

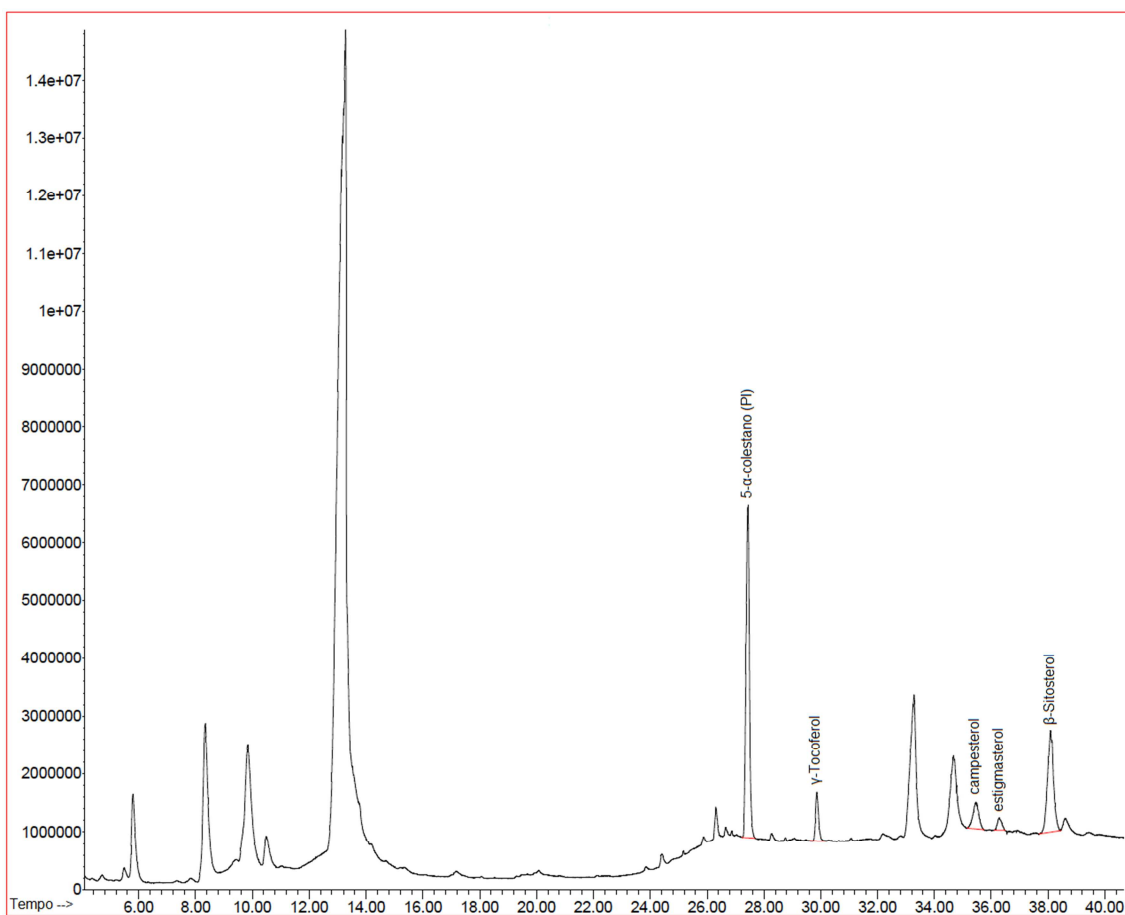
Método de Extração	$\gamma$ -Tocoferol	Fitosteróis			Fitosteróis Totais
		Campesterol	Estigmasterol	$\beta$ -Sitosterol	
Solventes	46,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,94	45,29 <sup>ab</sup> $\pm$ 1,45	18,49 <sup>a</sup> $\pm$ 1,30	173,78 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,20	237,56 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,45
Prensagem	42,93 <sup>a</sup> $\pm$ 5,51	37,93 <sup>b</sup> $\pm$ 6,32	19,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,77	164,61 <sup>b</sup> $\pm$ 4,02	222,04 <sup>b</sup> $\pm$ 7,16
Enzimática	44,60 <sup>a</sup> $\pm$ 1,27	46,92 <sup>a</sup> $\pm$ 4,18	19,61 <sup>a</sup> $\pm$ 4,24	182,43 <sup>a</sup> $\pm$ 9,36	248,96 <sup>a</sup> $\pm$ 11,10

Média  $\pm$  desvio padrão das análises em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).





**Figura 10.** Tocoferol e fitosteróis identificados no óleo de girassol obtido por extração enzimática em meio aquoso.



**Figura 11.** Tocoferol e fitosteróis identificados no óleo de gergelim obtido por extração enzimática em meio aquoso.

Foram identificados e quantificados o  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol no óleo de girassol e gergelim, respectivamente, e os três principais fitosteróis: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol para ambos os óleos. Em relação ao  $\alpha$ -tocoferol, presente no óleo de girassol, as metodologias por prensagem e solventes foram capazes de extrair a maior quantidade deste composto. Tuberoso et al. (2007) identificou o  $\alpha$ -tocoferol, utilizando cromatografia líquida (HPLC com detector de fluorescência), em óleo de girassol obtido por prensagem dos grãos e obteve 49,42 mg deste composto em 100 g<sup>-1</sup> de óleo, um valor bem próximo ao determinado neste trabalho utilizando cromatografia em fase gasosa (GC-MS).

Os fitosteróis presentes no óleo de girassol, avaliados separadamente, não demonstraram diferenças significativas entre os métodos de extração por solventes, prensagem e via enzimática, exceto para o  $\beta$ -sitosterol, que apresentou-se em maior quantidade, significativamente, na extração do óleo com o uso de enzimas. Phillips et al. (2002) avaliando a composição em esteróis em diversos óleos comestíveis, analisou os principais fitosteróis no óleo de girassol refinado, no qual obtiveram 9,61, 12,99 e 79,34 mg de campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol livres por 100 g de óleo, respectivamente. Os resultados obtidos nesta pesquisa para todas as metodologias de extração do óleo de girassol foram superiores aos valores apresentados por este autor. Phillips et al. (2002) afirma que a etapa de refino pode causar a redução no conteúdo de esteróis totais e livres em óleos comestíveis.

Para o óleo de gergelim, a metodologia via enzimática em meio aquoso possibilitou uma maior extração de campesterol e  $\beta$ -sitosterol, quando comparada às metodologias convencionais. Quanto ao estigmasterol e  $\gamma$ -tocoferol não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de extração do óleo.

De acordo com o Codex Alimentarius (1999), criado pela FAO e OMS, os níveis dos fitosteróis: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, encontrados no óleo bruto de gergelim (sem refino) geralmente são: 10,1 – 20,0; 3,4 – 12,0 e 57,7 – 61,9%, respectivamente, em relação ao total de esteróis. A partir da Tabela 11 observa-se que os teores obtidos para campesterol e estigmasterol são compatíveis com essas faixas reportadas, enquanto os valores obtidos

para  $\beta$ -sitosterol estão acima das faixas relatadas, com 73,1%, 74,1% e 73,3% para as metodologias por solventes, prensagem e enzimática, respectivamente.

Antoniassi et al. (2013) também obteve valores superiores ao Codex para o  $\beta$ -sitosterol no óleo de grãos de gergelim de diferentes genótipos que foram cultivados em diferentes localidades. Segundo Antoniassi et al. (2013) o perfil de esteróis é utilizado para definir o padrão de identidade de óleos vegetais e os países podem pleitear ao Codex Alimentarius a alteração do padrão, baseando-se em resultados de variedades locais.

Considerando os somatórios de fitosteróis nos óleos de girassol e gergelim extraídos por diferentes metodologias, é possível avaliar que a metodologia via enzimática em meio aquoso foi capaz de extrair os óleos com as maiores quantidades destes compostos bioativos, quando comparado às metodologias convencionais.

## **5.5 Ácidos Graxos**

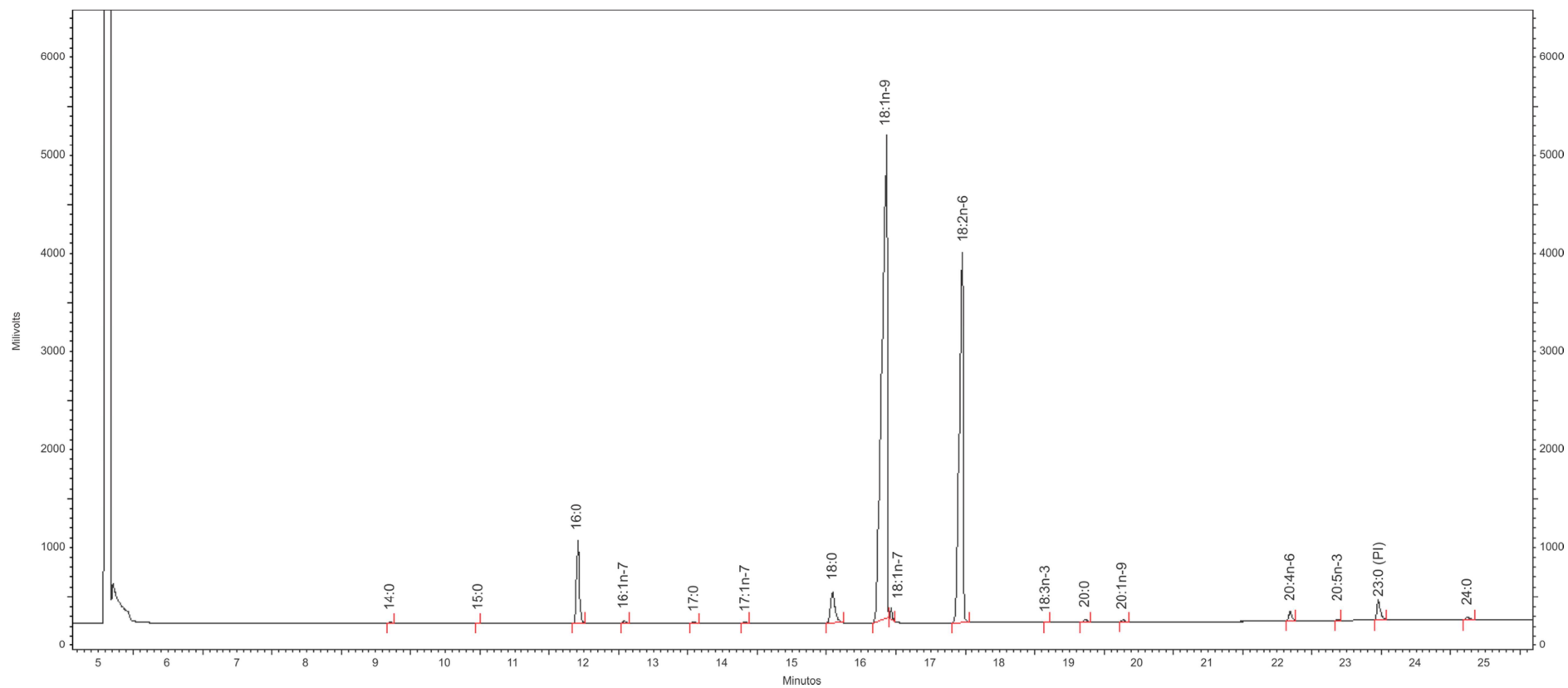
A Tabela 12 e Tabela 13 apresentam os resultados da quantificação absoluta dos ácidos graxos dos óleos de girassol e gergelim obtidos pelos seguintes métodos de extração: solventes, prensagem e via enzimática em meio aquoso, assim como os somatórios dos ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), poliinsaturados (AGPI), ômega 6 (n-6), ômega 3 (n-3) e as razões AGPI por AGS e também n-6 por n-3.

A Figura 12 e Figura 13 demonstram cromatogramas representativos referentes aos ácidos graxos identificados nos óleos de girassol e gergelim, respectivamente.

**Tabela 12.** Quantificação absoluta (em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais) dos ácidos graxos dos óleos de girassol.

Ácidos Graxos	Metodologia		
	Solventes	Prensagem	Enzimática
14:0	0,67 <sup>a</sup> ± 0,01	0,67 <sup>a</sup> ± 0,02	0,63 <sup>a</sup> ± 0,03
15:0	0,12 <sup>b</sup> ± 0,00	0,13 <sup>a</sup> ± 0,00	0,11 <sup>c</sup> ± 0,01
16:0	52,84 <sup>a</sup> ± 0,25	50,00 <sup>c</sup> ± 0,43	51,07 <sup>b</sup> ± 0,38
16:1n-7	1,21 <sup>b</sup> ± 0,04	1,35 <sup>a</sup> ± 0,03	1,24 <sup>b</sup> ± 0,02
17:0	0,39 <sup>b</sup> ± 0,00	0,45 <sup>a</sup> ± 0,03	0,44 <sup>a</sup> ± 0,02
17:1n-7	0,38 <sup>a</sup> ± 0,01	0,41 <sup>a</sup> ± 0,04	0,39 <sup>a</sup> ± 0,02
18:0	31,61 <sup>a</sup> ± 0,60	30,34 <sup>a</sup> ± 0,26	30,63 <sup>a</sup> ± 0,65
18:1n-9	561,82 <sup>a</sup> ± 4,32	560,62 <sup>a</sup> ± 1,57	559,39 <sup>a</sup> ± 1,95
18:1n-7	3,61 <sup>b</sup> ± 0,12	4,32 <sup>a</sup> ± 0,17	4,29 <sup>a</sup> ± 0,16
18:2n-6	294,47 <sup>a</sup> ± 6,10	299,33 <sup>a</sup> ± 2,01	301,75 <sup>a</sup> ± 3,35
18:3n-3	0,25 <sup>a</sup> ± 0,01	0,26 <sup>a</sup> ± 0,01	0,23 <sup>b</sup> ± 0,01
20:0	1,81 <sup>b</sup> ± 0,06	1,89 <sup>b</sup> ± 0,03	2,10 <sup>a</sup> ± 0,03
20:1n-9	1,36 <sup>a</sup> ± 0,04	1,38 <sup>a</sup> ± 0,05	1,48 <sup>a</sup> ± 0,06
20:4n-6	6,76 <sup>a</sup> ± 0,10	6,21 <sup>b</sup> ± 0,05	6,18 <sup>b</sup> ± 0,14
20:5n-3	0,19 <sup>c</sup> ± 0,01	0,30 <sup>b</sup> ± 0,02	0,34 <sup>a</sup> ± 0,01
24:0	2,15 <sup>a</sup> ± 0,08	1,94 <sup>ab</sup> ± 0,06	1,99 <sup>b</sup> ± 0,07
Somatórios e Razões			
AGS	89,58 <sup>a</sup> ± 0,66	85,42 <sup>b</sup> ± 0,50	86,97 <sup>b</sup> ± 0,76
AGMI	568,38 <sup>a</sup> ± 4,32	568,09 <sup>a</sup> ± 1,58	566,79 <sup>a</sup> ± 1,96
AGPI	301,66 <sup>a</sup> ± 6,10	306,09 <sup>a</sup> ± 2,01	308,50 <sup>a</sup> ± 3,36
n-6	301,22 <sup>a</sup> ± 6,10	305,54 <sup>a</sup> ± 2,01	307,93 <sup>a</sup> ± 3,36
n-3	0,44 <sup>b</sup> ± 0,01	0,55 <sup>a</sup> ± 0,02	0,57 <sup>a</sup> ± 0,01
n-6/n-3	685,31 <sup>a</sup> ± 21,29	551,13 <sup>b</sup> ± 16,67	542,01 <sup>b</sup> ± 10,50
AGPI/AGS	3,37 <sup>b</sup> ± 0,07	3,58 <sup>a</sup> ± 0,03	3,55 <sup>a</sup> ± 0,05

Média ± desvio padrão das análises em triplicata. AGS: total dos ácidos graxos saturados; AGMI: total dos ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: total dos ácidos graxos poliinsaturados; n-6: total de ácidos graxos ômega-6; n-3: total de ácidos graxos ômega-3. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey (p<0,05).

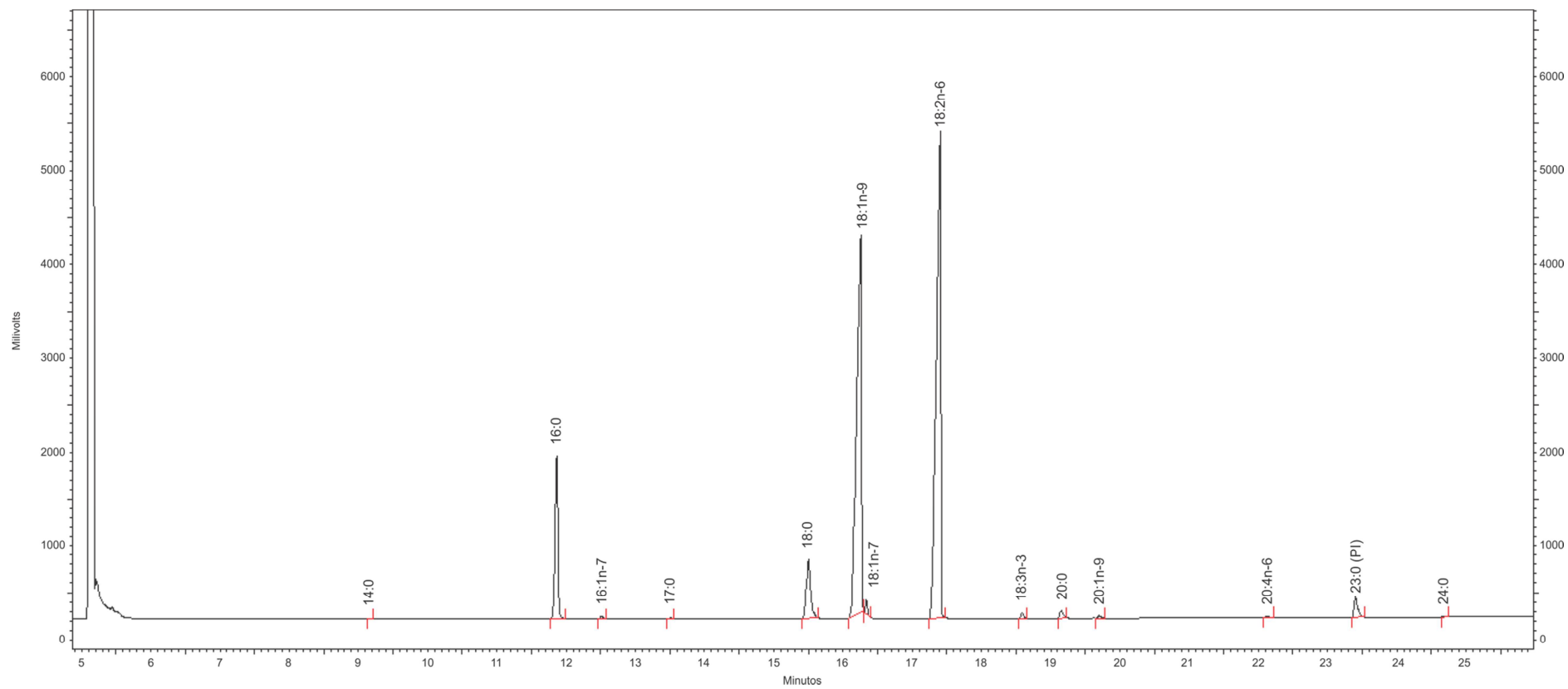


**Figura 12.** Cromatograma dos ácidos graxos quantificados no óleo de girassol extraído via enzimática em meio aquoso.

**Tabela 13.** Quantificação absoluta (em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais) dos ácidos graxos dos óleos de gergelim.

Ácidos Graxos	Metodologia		
	Solventes	Prensagem	Enzimática
14:0	0,17 <sup>b</sup> ± 0,01	0,20 <sup>a</sup> ± 0,01	0,17 <sup>b</sup> ± 0,01
16:0	96,11 <sup>a</sup> ± 1,43	94,13 <sup>ab</sup> ± 0,29	93,79 <sup>b</sup> ± 0,65
16:1n-7	1,53 <sup>a</sup> ± 0,05	1,40 <sup>b</sup> ± 0,02	1,51 <sup>a</sup> ± 0,03
17:0	0,38 <sup>a</sup> ± 0,02	0,44 <sup>a</sup> ± 0,01	0,41 <sup>a</sup> ± 0,02
18:0	53,19 <sup>a</sup> ± 0,74	45,97 <sup>b</sup> ± 0,46	51,97 <sup>a</sup> ± 0,37
18:1n-9	366,05 <sup>b</sup> ± 2,00	373,63 <sup>a</sup> ± 2,22	362,20 <sup>b</sup> ± 1,57
18:1n-7	5,49 <sup>c</sup> ± 0,11	6,20 <sup>a</sup> ± 0,09	5,84 <sup>b</sup> ± 0,02
18:2n-6	428,13 <sup>b</sup> ± 1,63	429,15 <sup>b</sup> ± 1,20	433,40 <sup>a</sup> ± 1,47
18:3n-3	2,73 <sup>c</sup> ± 0,08	3,31 <sup>a</sup> ± 0,04	2,88 <sup>b</sup> ± 0,02
20:0	5,40 <sup>a</sup> ± 0,13	4,74 <sup>b</sup> ± 0,02	5,20 <sup>a</sup> ± 0,18
20:1n-9	1,37 <sup>b</sup> ± 0,01	1,43 <sup>a</sup> ± 0,02	1,37 <sup>b</sup> ± 0,01
20:4n-6	1,06 <sup>a</sup> ± 0,00	0,86 <sup>b</sup> ± 0,02	1,03 <sup>a</sup> ± 0,04
24:0	0,65 <sup>a</sup> ± 0,01	0,59 <sup>b</sup> ± 0,04	0,50 <sup>c</sup> ± 0,03
Somatórios e Razões			
AGS	155,93 <sup>a</sup> ± 1,61	146,06 <sup>c</sup> ± 0,54	152,04 <sup>b</sup> ± 0,76
AGMI	373,91 <sup>b</sup> ± 2,00	382,20 <sup>a</sup> ± 2,22	370,42 <sup>b</sup> ± 1,57
AGPI	431,91 <sup>b</sup> ± 1,63	433,33 <sup>b</sup> ± 1,20	437,31 <sup>a</sup> ± 1,47
n-6	429,19 <sup>b</sup> ± 1,63	430,01 <sup>b</sup> ± 1,20	434,43 <sup>a</sup> ± 1,47
n-3	2,73 <sup>c</sup> ± 0,08	3,31 <sup>a</sup> ± 0,04	2,88 <sup>b</sup> ± 0,02
n-6/n-3	157,57 <sup>a</sup> ± 4,50	129,83 <sup>c</sup> ± 1,40	150,63 <sup>b</sup> ± 1,23
AGPI/AGS	2,77 <sup>c</sup> ± 0,03	2,97 <sup>a</sup> ± 0,01	2,88 <sup>b</sup> ± 0,02

Média ± desvio padrão das análises em triplicata. AGS: total dos ácidos graxos saturados; AGMI: total dos ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: total dos ácidos graxos poliinsaturados; n-6: total de ácidos graxos ômega-6; n-3: total de ácidos graxos ômega-3. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey (p<0,05).



**Figura 13.** Cromatograma dos ácidos graxos quantificados no óleo de gergelim extraído via enzimática em meio aquoso.



A análise estatística indicou que houve variação significativa para alguns ácidos graxos entre as diferentes metodologias para ambas oleaginosas. O óleo de girassol apresentou em sua composição principalmente os ácidos graxos 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6, demonstrando diferenças entre as metodologias apenas quanto ao teor do ácido graxo 16:0. Nimet et al. (2011), avaliando a extração do óleo de girassol por fluido supercrítico e subcrítico (CO<sub>2</sub> e propano), e Corsini & Jorge (2008), estudando alteração do perfil de ácidos graxos do óleo de girassol utilizados em frituras, também reportaram como principais ácidos graxos os mesmos citados anteriormente.

A presença dos ácidos graxos linoléico (18:2n-6) e alfa-linolênico (18:3n-3) foi identificada no óleo de girassol. Estes ácidos graxos são de extrema importância na dieta humana, por participarem da rota de síntese de outros ácidos graxos de cadeia longa, como o 22:6n-3 e 22:5n-3, que desempenham um papel importante, prevenindo inflamações e atuando na imunidade (PRATT & MATTHEWS, 2005; SIMOPOULOS, 2004).

O óleo de girassol extraído usando enzimas demonstrou uma maior quantidade do ácido graxo 20:5n-3, refletindo no somatório de ômega-3, na qual esta metodologia apresentou o maior valor (0,568 mg g<sup>-1</sup>) e o método por solventes o menor (0,440 mg g<sup>-1</sup>). Uma dieta que contenha ácidos graxos da série ômega-3, traz benefícios à saúde, como a redução dos riscos de doenças da artéria coronária, aumento do HDL, estabilização dos batimentos cardíacos, controle da hipertensão, prevenção de cânceres, atenua os efeitos das doenças autoimunes, artrite reumatóide e alivia a depressão (PRATT & MATTHEWS, 2005).

Quanto a razão n-6/n-3, as metodologias convencionais expressaram os maiores resultados quando comparada a técnica enzimática, na qual apresentou o melhor resultado (542,011 mg g<sup>-1</sup>), cerca de 21% menor que a razão obtida para o óleo de girassol extraído com solventes.

Para as extrações efetuadas com os grãos de gergelim, como pode ser observado na Tabelas 14, os ácidos graxos que se destacaram foram: 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6, sendo em média 94,7, 50,4, 367,3 e 430,2 mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais, respectivamente, entre as diferentes metodologias. Os ácidos graxos que foram identificados nesta pesquisa para o óleo de gergelim estão

de acordo com os perfis reportados por Botelho et al. (2014), Corso et al. (2010) e Aued-Pimentel et al. (2006).

Comparando-se os valores de AGPI e n-6 para o óleo de gergelim entre as metodologias convencionais e enzimática, esta última técnica demonstrou os maiores teores, 437,312 mg g<sup>-1</sup> e 434,428 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. O principal ácido graxo responsável por estes somatórios foi o ácido linoleico (18:2n-6), ácido graxo considerado estritamente essencial, sendo também o ácido graxo majoritário presente no óleo de gergelim.

A quantificação dos ácidos graxos do óleo de gergelim obtido a partir da extração com solventes demonstrou o maior somatório de ácidos graxos saturados e um dos menores somatórios de ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos poliinsaturados são considerados mais saudáveis quando comparados aos saturados (LAWRENCE, 2010), portanto avaliando esses pontos e a razão AGPI/AGS, a extração via enzimática em meio aquoso demonstrou-se uma metodologia capaz de extrair um óleo com uma qualidade melhor do que a técnica que utiliza solventes.

## 6. CONCLUSÃO

Visando a obtenção de óleos vegetais, girassol e gergelim, com uma melhor qualidade e sem a necessidade de utilizar solventes tóxicos para a extração dos óleos em nenhuma etapa durante o processo, a extração via enzimática em meio aquoso demonstrou-se uma metodologia inovadora capaz de extrair o óleo juntamente com compostos bioativos que possuem capacidade antioxidante frente ao radical DPPH e, principalmente, frente ao radical peroxila, assim como um maior teor total de fitosteróis.

O planejamento experimental utilizado para a extração enzimática apresentou-se adequado para avaliar a influência das variáveis independentes no processo de extração, sendo que os fatores: proporção amostra:água e tempo de extração foram os que mais influenciaram na resposta, de forma que a redução da proporção amostra:água e o aumento do tempo favoreceram os maiores rendimentos de extração.

Os níveis avaliados para o planejamento fatorial para a método enzimático foram eficientes, demonstrando ensaios com rendimentos de extração na faixa de 22,33% - 36,60% para o óleo de girassol e de 20,33% - 36,65% para o óleo de gergelim. As condições na qual obteve-se a maior porcentagem de extração para o óleo de girassol foram com 10% de cada enzima (pectinase, celulase e protease), proporção amostra:água 1:6 e 8 horas de extração para cada etapa da análise, enquanto para o óleo de gergelim foram as mesmas condições citadas para o óleo de girassol com exceção do tempo de extração, 16 horas.

As metodologias convencionais apresentaram maiores valores de rendimento de extração, porém, considerando que a maioria das metodologias para a extração de óleos vegetais utilizam solventes, torna-se interessante desenvolver e aperfeiçoar novas tecnologias que são capazes de extrair óleos que preservam os compostos bioativos naturalmente presentes, reduzem a contaminação do óleo pelo solvente e minimizam os danos ao meio ambiente.

Diante destas constatações, os processos de extração de óleos vegetais devem ser estudados com maior intensidade afim de que possam ser otimizados visando a obtenção de produtos com alta qualidade.

## 7. REFERÊNCIAS

AGUIRREZÁBAL, L. A. N.; ORIOLI, G. A.; HERNÁNDEZ, L. F.; PEREYRA, V. R.; MIRAVÉ, J. P. Girasol: aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. INTA: Buenos Aires, p.43-58, 2001.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. Química Nova, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANDRES, M. P. S.; OTERO, J.; VERA, S. High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase. Food Chemistry, v.126, n.3, p.1470–1474, 2011.

ANTONIASSI, R.; ARRIEL, N. H. C.; GONÇALVES, E. B.; FREITAS, S. C.; ZANOTTO, D. L.; BIZZO, H. R. Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim. Revista Ceres, v. 60, n.3, p. 301-310, 2013.

ANVISA, Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em 03/02/2015.

AUED-PIMENTEL, S.; TAKEMOTO, E.; ANTONIASSI, R.; BADOLATO, E. S. G. Composition of tocopherols in sesame seed oil: an indicative of adulteration. Grasas y Aceites, v.57, n.2, p.205-210, 2006.

AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. Progress in Lipid Research, v.39, n.3, p.231-255, 2000.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: studies

from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, v.174, n.2, p.134–139, 2008.

BELTRÃO, N. E. M.; FERREIRA, L. L.; QUEIROZ, N. L.; TAVARES, M. S.; ROCHA, M. S.; ALENCAR, R. D.; PORTO, V. C. N. O gergelim e seu cultivo no semiárido brasileiro. Natal: IFRN, 2013.

BERGER, K. G.; HAMILTON, R. J. *Developments in oils and fats*. Edited by Hamilton, R. J. Chapman & Hall: London, 1995.

BERGMANN, K. V.; SUDHOP, T.; LUTJOHANN, D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *The American Journal of Cardiology*, v.96, n.1, p.10-14, 2005.

BEVERIDGE, T. H. J.; LI, T. S. C.; DROVER, J. C. G. Phytosterol content in American ginseng seed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.4, p.744-750, 2002.

BIERI, J. G. Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.75, n.4, p.781-782, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BOTANECO. Oleosomes technology overview. Disponível em <<http://botaneco.ca/index-10.html>>. Acesso em 03/12/2014.

BOTELHO, J. R. S.; MEDEIROS, N. G.; RODRIGUES, A. M. C.; ARAÚJO, M. E.; MACHADO, N. T.; SANTOS, A. G.; SANTOS, I. R.; GOMES-LEALC, W.; CARVALHO, R. N. Black sesame (*Sesamum indicum L.*) seeds extracts by CO<sub>2</sub> supercritical fluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, total fatty acids, phytosterols and neuroprotective effects. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.93, p.49-55, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, n.1, p.25–30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 270, Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Brasília: Diário Oficial da União, Anexo 5, de 22 de setembro de 2005.

BRENNER, R. R.; PELUFO, R. O. Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, v.241, n.22, p.5213-5219, 1966.

BRON, D.; AMIS, R. Vitamin E and prevention of atherosclerosis. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, v.72, n.1, p. 32-37, 2002.

CARBONERA, F.; BONAFE, E. G.; MARTIN, C. A.; MONTANHER, P. F.; RIBEIRO, R. P.; FIGUEIREDO, L. C.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. Effect of dietary replacement of sunflower oil with perilla oil on the absolute fatty acid composition in Nile tilapia (GIFT). *Food Chemistry*, v.148, n.1, p.230–234, 2014.

CARRÃO-PANIZZI, M.; MANDARINO, J. M. G. Produtos protéicos do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C., BRIGHENTI, A. M., CASTRO, C. Girassol no Brasil. Londrina: EMBRAPA, p. 51-68, 2005.

CARVALHO, E. B. T.; MELO, I. L. P.; MANCINI-FILHO, J. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.30, n.2, p.295-307, 2010.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição*, v.24, n.1, p.173-187, 2011.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n.2, p.441-449, 2007.

CHAIYASIT, W.; ELIAS, R. J.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.47, n.3, p.299-317, 2007.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, L.; EXLER, J.; EITENMILLER, R. R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, n.2, p.196-204, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex Standard for named vegetable oils. CODEX STAN 210, 1999. Revision: 2001, 2003, 2009 and Amendments: 2005, 2011, 2013.

CORSINI, M. S.; JORGE, N. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. *Química Nova*, v.31, n.5, p.956-961, 2008.

CORSO, M. P. Estudo da extração de óleo de sementes de gergelim (*Sesamum indicum L.*) empregando os solventes dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado. Toledo. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Univesidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), 2008.

CORSO, M. P.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; SANTOS, J. N.; FREITAS, L. S.; DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*Sesamum indicum L.*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.52, p.56-61, 2010.

COURI, S.; FREITAS, S. P. Aplicação de enzimas na extração aquosa de óleos vegetais. In: Mercadante, A. Z.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.; Pereira, J. L.; Pastore, G. M. (Org.). *Ciências de Alimentos: avanços e perspectivas*. Campinas: Unicamp, v.2, p. 28-32, 2001.

CUNNIFF, P. A. (Ed.) *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16<sup>th</sup> edn. Association of Official Analysis Chemists International, Arlington. CDROM, 1998.

DU, M.; AHN, D. U. Simultaneous analysis of tocopherols, cholesterol, and phytosterols using gas chromatography. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, v.67, n.5, p.1696-1700, 2002.

EGBEKUN, M. K.; EHIEZE, M. U. Proximate composition and functional properties of fullfat and defatted beniseed (*Sesamum indicum L.*) flour. *Plant Foods Human Nutrition*, v.51, n.1, p.35-41, 1997.

EITENMILLER, R. R. Vitamin E content of fats and oils: nutritional implications. *Food Technology*, v.51, n.5, p.78- 81, 1997.

ELLEUCH, M.; BESBES, S.; ROISEUX, O.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry*, v.103, n.2, p.641–650, 2007.

EMBRAPA. Cultivos. Disponível em <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/girassol>>. Acesso em 20/05/2015.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.3, p.648-656, 2000.

FARIA, A. B. C.; UKAN, D.; SOUSA, N. J. Efeito das Sementes de Gergelim (*Sesamum Sp.*) sobre o fungo simbiote de formigas do gênero *Acromyrmex spp (Formicidae: Hymenoptera)*. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v.12, n.1, p.130-141, 2010.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos: Embrapa Instrumentação, p.9-10, 2011.

FARMER, E. H.; BLOOMFIELD, G. F.; SUNDRALINGAM, A. SUTTON, D. A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. *Transactions of the Faraday Society*, v.38, p.348-356, 1942.



FINCO, A. M. O.; GARMUS, T. T.; BEZERRA, J. R. M. V.; CÓRDOVA, K. R. V. Elaboração de iogurte com adição de farinha de gergelim. *Ambiência*, v.7, n.2, p.217-227, 2011.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Óleos vegetais e o estresse térmico. São Paulo: Ed. Insumos, v. 16, n.31, p.38-55, 2014.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, v.19, n.1, p.1-22, 1980.

FREITAS, S.; HARTMAN, L.; COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. *Óleos e Grãos*, v.1, n.32, p.29-32, 1996.

FREITAS, S. P.; LAGO, R. C. A.; QASSIM, R. Y. Economics analysis of enzymatic extraction of avocado oil. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, v.75, p.15-19, 1998.

HAHM, T.; PARK, S.; LO, Y. M. Effects of germination on chemical composition and functional properties of sesame (*Sesamum indicum L.*) seeds. *Bioresource Technology*, v.100, n.4, p.1643-1647, 2009.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, n.6, p.475-477, 1973.

HOLLAND, B.; WELCH, A. A.; UNWIN, I. D.; BUSS, D. H.; PAUL, A. A.; SOUTHGATE, D. A. T. *The McCance and Widdowson's The Composition of Foods*, 5th ed.; Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: Cambridge, U.K., 1994.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.7, p.1815-1821, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

HUI, Y. H. *Bailey's industrial oil and fat products*. 5. ed. New York: Wiley Interscience, v.2, p.603-654, 1996.

ILHA, A. O. G. Fitosteróis reduzem endotelina-1 em indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos. São Paulo. Dissertação (Mestre em Ciências), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009.

INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Pediatrics*, v. 143, n.4, p.1-8, 2003.

INSYS THERAPEUTICS INC. S. George Kottayil, Zhongyuan Zhu, Venkat R. Goskonda. Room-temperature stable dronabinol formulations. US 2006/0160888 A1, 2006.

JEEVANA, J. B.; SREELAKSHMI, K. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system of flutamide. *Journal of Young Pharmacists*, v.3, n.1, p.4-8, 2011.

JIMENEZ-ALVAREZ, D.; GIUFFRIDA, F.; VANROBAEYS, F.; GOLAY, P. A.; COTTING, C.; LARDEAU, A.; KEELY, B. J. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.10, p.3470-3477, 2008.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. *Boletim SBCTA*, v.32, n.1, p.40-47, 1998.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v.75, n.3, p.488-506, 1992.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, v.51, n.2, p.33-40, 1993.

LAW, M. Plant sterol and stanol margarines and health. *British Medical Journal*, v.320, n.7238, p.861-864, 2000.

LAWRENCE, G. D. *The fats of life: essential fatty acids in health and disease*. Rutgers University Press. p. 64-65, 2010.

LI, T. S. C.; BEVERIDGE, T. H. J.; DROVER, J. C. G. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, v.101, n.4, p.1633-1639, 2007.

LOPES, A. P.; SCHNEIDER, V. V. A.; MONTANHER, P. F.; FIGUEIREDO, I. L.; SANTOS, H. M. C.; MARUYAMA, S. A.; ARAÚJO, A. M. M.; VISENTAINER, J. V. Levels of soybean oil and time of treatment for Nile tilapia: a factorial design for total n-3 fatty acids, n-6/n-3 and PUFA/SFA ratios. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.26, n.3, p.572-579, 2015.

LÓPEZ-ORTIZ, C. M.; PRATS-MOYA, S.; SANAHUJA, A. B.; MAESTRE-PÉREZ, S. E.; GRANÉ-TERUEL, N.; MARTÍN-CARRATALÁ, M. L. Comparative study of tocopherol homologue content in four almond oil cultivars during two consecutive years. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.21, n.2, p.144-151, 2008.

MA, X.; WU, H.; LIU, L.; YAO, Q.; WANG, S.; ZHAN, R.; XING, S.; ZHOU, Y. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*, v.129, n.1, p.102-107, 2011.

MAIA, G. A.; CALVETE, Y. M. A.; TELLES, F. J. S.; MONTEIRO, J. C. S.; SALES, M. G. Eficiência da farinha desengordurada de gergelim como complemento protéico da farinha extrudada de caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, n.7, p.1295-1303, 1999.

MARIANO, R. G. B. Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) por processos convencionais combinados com tecnologia enzimática. Seropédica. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, 2008.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTINS, S. L. C.; SILVA, H. F.; NOVAES, M. R. C. G.; ITO, M. K. Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.54, n.3, p.257-263, 2004.

MARUNO, M. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MASUDA, T.; YONEMORI, S.; OYAMA, Y.; TAKEDA, Y.; TANAKA, T.; ANDOH, T. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n.4, p.1749–1754, 1999.

MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, v.111, n.2, p.421-427, 2008.

MIYAHARA, Y.; HIBASAMI, H.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KOMIYA, T. Sesamol from sesame seed inhibits proliferation by inducing apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v.7, n.4, p.369-371, 2001.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Food Science and Technology*, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, v.41, n.6, p.457-500, 2002.

MOREDA, W. Chromatographic Analysis of Minor Constituents in Vegetable Oils. *Journal of Chromatography A*, v.881, n.1, p.131-148, 2000.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, function and dietary regulation of delta-6, delta-5 and delta-9 desaturases. *Annual Review of Nutrition*, v.24, n.4, p.345-76, 2004.

NASCIMENTO, R. J. S. Extração aquosa enzimática do óleo de açaí. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.2, p.498-502, 2008.

NIMET, G. Avaliação dos solventes dióxido de carbono supercrítico e propano subcrítico na extração do óleo de girassol. Toledo. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), 2009.

NIMET, G.; SILVA, E. A.; PALÚA, F.; DARIVAC, C.; FREITAS, L. S.; MEDINA-NETO, A.; CARDOZO-FILHO, L. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus L.*) oil with supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical propane: Experimental and modeling. *Chemical Engineering Journal*, v.168, n.1, p.262-268, 2011.

O'BRIEN, R. D. Fat and oils: formulating and processing of applications. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 744p., 2009.

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

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G. A.; ECKERT, C. R.; SILVA, T. A.; SOBRAL, E. S.; FÁVERO, O. A.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, v.37, n.3, p.497-503, 2014.

OSTLUND, R. E. J. Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, v.22, p.533-549, 2002.

PARMENTIER, M.; GUILLEMIN, S.; BARBAR, R.; LINDER, M.; FANNI, J. De nouveaux procédés d'extraction des huiles pour des produits finis de haute qualité. *Oleagineux Corps Lipids*, v.11, n.6, p.377-380, 2004.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; RIO, D. D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENT, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, v.133, n.9, p.2812-2819, 2003.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v.39, n.7, p.791–800, 2006.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, v.41, n.3, p.274–285, 2008.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.15, n.2, p.123-142, 2002.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D. G.; MIETTINEN, T. A.; TOIVO, J.; LAMPI, A. M. Review Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food and Agriculture*, v.80, n.7, p.939-966, 2000.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*, v.26, n.5, p.738-744, 2003.

PRATT, S.; MATTHEWS, K. *Super Alimentos: os incríveis efeitos de uma comida que pode mudar sua vida*. São Paulo: Prestígio Editorial, p.119-127, 2005.

PRIMO, A. P. *Torta de gergelim na alimentação de frangos de corte*. Toledo. Dissertação (Mestre em Engenharia Agrícola), Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (UNIOESTE), 2008.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.11, p.3273-3279, 2003.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.10, p.4290-302, 2005.

RAMADAN, M. F.; MOERSEL, J. T. Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, n.8, p.838-842, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. *Revista Virtual de Química*, v.5, n.1, p.2-15, 2013.

REZAEI, K.; TEMELLI, F. On-line extraction-reaction of canola oil using immobilized lipase in supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.19, n.3, p.263-274, 2000.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MANCINI-FILHO, J. M.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β-caroteno/Ácido Linoléico. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.

SALGIN, U.; DOKER, O.; CALIMLI, A. Extraction of sunflower oil with supercritical CO<sub>2</sub>: experiments and modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, v.38, p.326-331, 2006.

SANKAR, D.; SAMBANDAM, G.; RAO, M. R.; PUGALENDI, K. V. Sesame oil exhibits additive effect on nifedipine and modulates oxidative stress and

electrolytes in hypertensive patients. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, v.4, n.3, p.133–145, 2004.

SANKAR, D.; SAMBANDAM, G.; RAO, M. R.; ALI, A. Sesame oil exhibits synergistic effect with anti-diabetic medication in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Nutrition*, v.30, n.3, p.351–358, 2011.

SANTOS, V. J.; BIONDO, P. B. F.; PILAU, E. J.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de canola (*Brassica napus L.*) incorporado com sua torta. In: XXI Encontro de Química da Região Sul: Maringá, 2014.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.132-138, 2005.

SARGI, S. C.; SILVA, B. C.; SANTOS, H. M. C.; MONTANHER, P. F.; BOEING, J. S.; SANTOS-JÚNIOR, O. O.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. *Food Science and Technology*, v.33, n.3, p.541-548, 2013.

SARVE, A.; SONAWANE, S. S.; VARMA, M. N. Ultrasound assisted biodiesel production from sesame (*Sesamum indicum L.*) oil using barium hydroxide as a heterogeneous catalyst: Comparative assessment of prediction abilities between response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *Ultrasonics Sonochemistry*, v.26, p.218–228, 2015.

SAYDUT, A.; DUZ, M. Z.; KAYA, C.; KAFADAR, A. B.; HAMAMCI, C. Transesterified sesame (*Sesamum indicum L.*) seed oil as a biodiesel fuel. *Bioresource Technology*, v.99, n.14, p.6656–6660, 2008.

SCODITTI, E.; CAPURSO, C.; CAPURSO, A.; MASSARO, M. Vascular effects of the Mediterranean diet - Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular Pharmacology*, v.63, n.3, p.127-134, 2014.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de



moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.2, p.153-166, 2007.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. *Bioresource Technology*, v.96, n.1, p.121-123, 2004.

SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Ultrasonic pre-irradiation effect upon aqueous enzymatic oil extraction from almond and apricot seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.13, n.6, p.529-534, 2006.

SHEPPARD, A. J.; PENNINGTON, J. A. T.; WEIHRAUCH J. L. Vitamin E in health and disease; Packer, L.; Fuchs, J., eds.; Marcel Dekker: New York, 1992.

SILVA, C. M.; ZANQUI, A. B.; SOUZA, A. H. P.; GOHARA, A. K.; CHAVES, M. A.; GOMES, S. T. M.; CARDOZO-FILHO, L.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Chemometric study of perilla fatty acids from subcritical n-propane extracted oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.26, n.1, p.14-21, 2015.

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.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In Ho CT, Osawa T, Huang TM, Rosen RT (eds.) *Food Phytochemicals for Cancer Prevention*. Washington: Caplus, p.20-32, 1994.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, v.20, n.1, p.77-90, 2004.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, v.44, n.2, p.203-215, 2011.

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. In Estudos na Cadeia Produtiva do Biodiesel; Padilha, A. C. M.; Gollo, S. S.; Silva, M. N., eds.; Unipampa: Rio Grande do Sul, Brazil, 2012.

SOTO, C.; CHAMY, R.; ZÚÑIGA, M. E. Enzymatic hydrolysis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing. Food Chemistry, v.102, n.3, p.834-840, 2007.

SOUZA, A. H. P.; GOHARA, A. K.; RODRIGUES, A. C.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M. Sacha inchi as potential source of essential fatty acids and tocopherols: multivariate study of nut and shell. Acta Scientiarum Technology, v.35, n.4, p.757-763, 2013.

SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A.; DIANOCZKI, C.; RECSEG, K.; KARLOVITS, G.; SZLYK, E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. Talanta, v.76, n.4, p.899-905, 2008.

SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; DIANOCZKI, C.; RECSEG, K.; SZLYK, E. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.85, n.2, p.141-149, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

THOMAZ, G. L.; ZAGONEL, J.; COLASANTE, L. O.; NOGUEIRA, R. R. Produção do girassol e teor de óleo nas sementes em diferentes épocas de semeadura no Centro-Sul do Paraná. Ciência Rural, v.42, n.2, p. 203-208, 2012.

TRABER, M. G. Vitamin E: too much or not enough? The American Journal of Clinical Nutrition, v.73, n.6, p.997-998, 2001.

TUBEROSO, C. I. G.; KOWALCZYK, A.; SARRITZU, E.; CABRAS, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. Food Chemistry, v.103, n.4, p.1494-1501, 2007.

TURATTI, J. M. Extração de óleos vegetais utilizando-se enzimas no pré-tratamento das sementes. Campinas. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1999.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. Química Nova, v.35, n.2, 274-279, 2012.

WATT, B. K.; MERRILL, A. L. Composition of foods: raw, processed, prepared. Washington: Department of Agriculture, p.190, 1979.

WERE, B. A.; ONKWARE, A. O.; GUDU, S.; WELANDER, M.; CARLSSON, A. S. Seed oil content and fatty acid composition in east African sesame (*Sesamum indicum L.*) accessions evaluated over 3 years. Field Crops Research, v.97, n.2, p.254-260, 2006.

YADA, S.; LAPSLEY, K.; HUANG, G. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. Journal of Food Composition and Analysis, v.24, n.4, p.469-480, 2011.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; CARASSO, R. L.; MOSTOFISKY, D. I. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. Neurobiology of Aging, v.23, n.5, p.843-53, 2002.

YOU DIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. International Journal of Developmental Neuroscience, v.18, n.4, p.383-99, 2000.

ZANQUI, A. B. Avaliação da composição de óleos de Chia e Linhaça extraídos com n-propano subcrítico. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

ZHANG, Y.; LI, S.; YIN, C.; JIANG, D.; YAN, F.; XU, T. Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels. Food Chemistry, v.135, n.1, p.304–308, 2012.