

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

**Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação  
de tecnologias elétricas no gergelim**

- Tese de Doutorado -

Júlia Ribeiro Sarkis

Porto Alegre

2014



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

Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de  
tecnologias elétricas no gergelim

Júlia Ribeiro Sarkis

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e  
Operações Unitárias

**Orientadores:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Cristina Tessaro**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Damasceno Ferreira Marczak**

Porto Alegre

2014



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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de tecnologias elétricas no gergelim* elaborado por Júlia Ribeiro Sarkis, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Angela de Almeida Meireles

---

Prof. Dr. Eduardo Cassel

---

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios



## *Agradecimentos*

Às minhas orientadoras Ligia e Isabel, por sempre me motivarem e me mostrarem o caminho a seguir. Gostaria de agradecer pelo constante apoio, tanto profissional quanto emocional, e por serem, além de orientadoras, grandes amigas.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e do Laboratório de Separação por Membranas (LASEM), em especial à Giovana, à Poliana, à Jordana e ao Voltaire, pela ajuda durante a elaboração desta tese e pela convivência e amizade de sempre.

Ao Iuri Michel, bolsista de iniciação científica e aluno de graduação, pela paciência e pelo auxílio importante na execução dos experimentos.

Ao professor Adriano Brandeli e à aluna Ana Paula Correa, pela ajuda na elaboração de parte desta tese e pela disponibilização do laboratório. Aos funcionários Eduardo Birnfeld e Roberval de Souza, pelo apoio nas análises realizadas.

A todos os professores que de certa forma me impulsionaram na vida acadêmica e ao Departamento de Engenharia Química pela utilização da estrutura física dos laboratórios. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS e à CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus amigos que estão sempre presentes e fazem a vida ficar mais leve e divertida.

Ao meu companheiro, Daniel, pelo apoio e amizade incondicionais e por dividir todos os dias comigo.

Aos meus pais, Sarkis e Madalena, por todo carinho que sempre me deram e por serem sempre fonte de inspiração na construção da minha carreira profissional. Ao meu irmão, Marcelo, e a minha tia Izabel, pela amizade e por estarem sempre ao meu lado.

To my advisors during my stay in France, Professors Eugène Vorobiev and Nadia Boussetta, thank you for all the knowledge you shared with me. To the student Christelle Blouet, who helped performing the experiments. To the dear friends I made during my studies in France, Jessy, Farah, Bassam, Nicole, Themis, Felipe and Sylène, you made this period of my life great and I learned a lot from you, thank you.





## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar diferentes tecnologias na extração de óleo da semente de gergelim e de compostos fenólicos e proteínas da torta de gergelim. Este estudo está dividido em quatro partes. O objetivo da primeira parte do trabalho foi extrair compostos fenólicos de diferentes tortas de nozes e sementes nas mesmas condições e comparar o teor de tais compostos e a atividade antioxidante dos extratos. Nessa fase, foram utilizadas nos experimentos tortas das sementes de girassol, linhaça e gergelim, e das nozes amêndoa, pecã, macadâmia e avelã. O extrato da torta de noz pecã apresentou o maior teor de todos os compostos fenólicos analisados, seguido pelo extrato da torta de semente de girassol e de avelã. Essas amostras também apresentaram as maiores atividades antioxidantes. As etapas seguintes do trabalho focaram-se no gergelim. A segunda parte do trabalho teve como objetivo a otimização da extração, pela metodologia convencional, de fenólicos totais e lignanas da torta de gergelim. Inicialmente, um modelo polinomial de segunda ordem foi utilizado para predição dos resultados, mediante a variação da temperatura, concentração de etanol e razão, sólido/solvente. As variáveis de resposta foram as concentrações de fenólicos totais, de sesamina e de sesaminol triglicósídeo e a atividade antioxidante dos extratos obtidos. Entre os compostos analisados, o sesaminol triglicósídeo está presente em maior quantidade na torta de gergelim. A razão sólido/solvente e a concentração de etanol foram os fatores que mais afetaram a extração, enquanto a temperatura demonstrou uma influência reduzida. Na terceira etapa, o escopo da pesquisa foi a avaliação de metodologias alternativas na extração desses mesmos compostos e, também, de proteínas. As tecnologias usadas foram as de campo elétrico pulsado (CEP) e de descargas elétricas de alta tensão (DEAT). A análise da aplicação de CEP e de DEAT foi realizada usando essas tecnologias como pré-tratamentos ao processo de extração com solvente. Os resultados demonstraram que as técnicas foram eficazes e aumentaram os rendimentos do processo para fenólicos totais, lignanas e proteínas da torta. O uso de diferentes porcentagens de etanol também se mostrou significativo nessa etapa, entretanto, esse efeito foi reduzido quando utilizadas as tecnologias elétricas. Da mesma forma, o efeito da temperatura na etapa difusiva foi menor quando os pré-tratamento foram utilizados. Os comportamentos observados sugerem que a aplicação de CEP e DEAT aumenta a eficiência da extração de compostos de interesse. Por fim, na quarta parte do trabalho, objetivou-se melhorar a eficiência do processo de extração do óleo de gergelim aplicando as tecnologias previamente citadas. Esses experimentos demonstraram um efeito significativo dos tratamentos de CEP e DEAT e um aumento na quantidade de óleo extraído com o aumento da energia aplicada às sementes. O uso de DEAT gerou um aumento maior na quantidade de óleo extraído, se comparado à tecnologia de CEP.

**Palavras chave:** extração; tortas; gergelim; campo elétrico pulsado; descargas elétrica de alta tensão.



## Abstract

The goal of the present work was to study different technologies in the extraction of oil from sesame seed and phenolic compounds and proteins from sesame cake. This study is divided in four parts. The first part aimed to extract water-soluble compounds from different seed and nut cakes under the same conditions and compare the phenolic content and antioxidant activity of the extracts. For the first portion of the study, seed cakes of sunflower, pumpkin, flaxseed and defatted sesame, and nut cakes of almond, pecan, macadamia and hazelnut were used in the experiments. The extract from pecan nut cake presented the highest amounts of all compounds analyzed, followed by sunflower seed and hazelnut cake extracts. These samples also had the highest antioxidant activities. The following steps of the work focused on sesame only. The second part of the work aimed to optimize the extraction of total phenolics and lignans from sesame seed cake. Initially, a second-order polynomial model was set up to predict the responses in different temperatures, solid/solvent ratios and ethanol concentrations. The response variables were the concentrations of total phenolics, sesamin, sesaminol triglucoside and antioxidant activity of the extracts. Among the analyzed compounds, ST is presented in the highest quantity in sesame cake. Solid to liquid ratio and ethanol concentration were the most important factors affecting extraction, whereas temperature showed reduced influence. In the third part of this work, the aim was to evaluate alternative methodologies in the extraction of phenolics and proteins. The technologies used were pulsed electric fields (PEF) and high voltage electric discharges (HVED). These methods were used as pre-treatments, prior to diffusion. Results show that PEF and HVED were efficient and increased the extraction yield for phenolic compounds, lignans and proteins from the cake. The use of different percentages of ethanol was also significant in this stage; however, the effect of this parameter was reduced when the electrical treatments were used. In the same way, temperature also showed a smaller influence on the results when the pre-treatments were used. The observed behaviors suggest that the use of PEF and HVED increases extraction efficiency. Finally, the goal of the last part of the work was to improve oil expression from sesame seeds, using the aforementioned technologies. These experiments show a significant effect of both PEF and HVED. It was observed an increase of the amount of oil extracted with the energy input applied to the seeds. When compared both technologies, HVED showed a more expressive effect than PEF.

**Key-words:** extraction; cakes; sesame; pulsed electric fields; high voltage electrical discharges.



## Lista de Figuras

Figura 2.1 – Estrutura básica de um flavonoide (Bravo, 1998).....	39
Figura 2.2 – Estrutura básica de um tanino condensado (Bravo, 1998).....	39
Figura 2.3 – Fluxograma do beneficiamento do gergelim.....	44
Figura 2.4 – Estrutura de algumas lignanas encontradas no gergelim. Fonte: Shahidi e Naczk (2004), Calle Álvarez (2007), Liao <i>et al.</i> (2010a).....	51
Figura 2.5 – Ilustração das técnicas assistidas por CEP através da formação de poros. Fonte: adaptado de Vorobiev e Lebovka (2011). ....	64
Figura 2.6 – Estimativa do $Z_C$ em função da condutividade elétrica durante o tempo de tratamento. Fonte: adaptado de Vorobiev e Lebovka (2011). ....	67
Figura 2.7 – Ilustração de um onda bipolar quadrada típica de um protocolo de CEP. ....	68
Figura 2.8 – Fotografias de cavidades iniciadas pela avalanche de elétrons (a) e pelo arco elétrico (b). Fonte: adaptado de Boussetta <i>et al.</i> (2013a). ....	71
Figura 3.1 – Equipamento extrator de gordura.....	96
Figura 3.2 – Curva de calibração da absorbância versus a concentração de ácido gálico utilizada para determinação do teor de compostos fenólicos totais ( $R^2 = 0,9992$ ).....	100
Figura 3.3 – Curva de calibração da concentração do padrão Trolox <i>versus</i> porcentagem de radicais sequestrados, utilizada para determinação da capacidade antioxidante ( $R^2 = 0,9909$ ). ....	104
Figure 3.4 – Scanning absorbance in the ultraviolet-visible absorption spectroscopy for pecan nut and sunflower seed cakes extracts.....	119
Figure 3.5 - Total flavonoids and condensed tannins content of pecan, hazelnut and sunflower seed cakes. Values are the mean of triplicates $\pm$ SD. ....	120
Figure 3.6 – Chromatograms of sunflower seed cake (a), pecan nut cake (b) and sesame cake (c). Peak assignment: (1) chlorogenic acid, (2) catechin, (3) epicatechin, (4) ellagic acid, (5) sesamol and (6) sesamin. ....	124
Figura 4.1 – Aparato experimental utilizado para extração convencional. ....	132
Figura 4.2 - Curva de calibração da concentração do padrão de sesamina versus a área do pico obtido ( $R^2=0,9995$ ). ....	136
Figure 4.3 – HPLC chromatogram of the sesame seed cake for extractions performed with: (a) water, (b) 95 % ethanol. Peak assignment: (1) sesamol, (2) to (10) lignan glucosides and (11) sesamin. ....	146

Figure 4.4 – Response surfaces and contour plots showing the effect of ethanol concentration and solid to liquid ratio on the extraction of TP (a) and SES (b) when fixing temperature at the centre point.....	151
Figure 4.5 - Response surfaces and contour plots showing the effect of ethanol concentration, solid to liquid ratio and temperature on ST extraction. The value of the missing independent variable in each plot was kept at the centre point. ....	151
Figure 4.6 - Response surfaces and contour plots showing the effect of ethanol concentration, solid to liquid ratio and temperature on the antioxidant capacity of the extracts. The value of the missing independent variable in each plot was kept at the centre point. ....	152
Figura 5.1 – Torta de gergelim.....	160
Figura 5.2 – Fotografia do equipamento usado na aplicação dos tratamentos elétricos. ....	161
Figura 5.3 – Diagrama do aparato experimental utilizado: câmaras de aplicação de CEP (a) e DEAT (b) e protocolos de pulsos de CEP (c) e DEAT (d). Fonte: adaptado de Boussetta <i>et al.</i> (2012b).....	162
Figure 5.4 – Energy input <i>versus</i> (a) electrical disintegration index ( $Z_C$ ), (b) total polyphenols in the extracts and (c) protein concentration in the extract for PEF (13 kV/cm) and HVED (40 kV). ....	179
Figure 5.5 – Polyphenols extraction kinetics in different solvents: water (a), 10 % ethanol (b), 30 % ethanol (c) and 50 % ethanol (d) for the control, PEF and HVED samples. Extraction conditions: 20 °C, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm.....	181
Figure 5.6 – Chromatogram of the extract after 60 min of diffusion in 30% ethanol for control, PEF and HVED samples (a). Peak assignment: (1) main lignan glucoside found in control and PEF and control samples and (2) main lignan glucoside found in HVED samples. UV spectrum of peaks 1 (b) and 2 (c).....	184
Figure 5.7 – Main lignans extraction kinetics in different solvents: 30 % ethanol (a) and 50 % ethanol (b) for the control, PEF and HVED samples. Extraction conditions: 20 °C, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm. ....	185
Figure 5.8 - Polyphenols aqueous extraction kinetics in different temperatures: 20 °C (a), 40 °C (b) and 60 °C (c). Extraction conditions: water, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm. ....	186
Figure 5.9 - Proteins aqueous extraction kinetics in different temperatures: 20 °C (a), 40 °C (b) and 60 °C (c). Extraction conditions: water, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm. ....	187

Figura 6.1 – Fotografia do equipamento utilizado para prensagem das sementes de gergelim. .....	198
Figura 6.2 – Rendimento da extração do óleo da semente de gergelim por prensagem a frio (a) e deformação <i>versus</i> tempo (b) nas diferentes pressões aplicadas. ....	200
Figure 6.3 – Schematic diagram of the seed processing steps for: (a) electrically treated seeds and (b) ID and IDG samples.....	206
Figure 6.4 – Disintegration index of the sesame seeds (a) and contents in the treatment water of polyphenols (b) and proteins (c) <i>versus</i> the energy input for PEF and HVED experiments. .....	211
Figure 6.5 – Turbidity of the treatment water (a) and percentage of oil lost in the water (b) <i>versus</i> energy input for PEF and HVED experiments.....	212
Figure 6.6 – Photographs of the dried cake after application of different HVED energies (a) and treatment water from the same processes (b). ....	213
Figure 6.7 – Oil yield for all treatments performed: not considering the oil lost in water (a) and considering the oil lost in water (b). For each treatment, values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p < 0.05$ ; a represents the higher oil yield and f the lowest.....	215
Figure 6.8 – Deformation curves for selected samples: untreated (U), immersed and dried (ID), immersed, dried and grinded (IDG) and PEF and HVED (240 kJ/kg) pre-treated seeds. Deformation ( $\epsilon$ ) <i>versus</i> the square root of the time. ....	217
Figure 6.9 – HPLC chromatogram of the sesame oil obtained after pressing from untreated and PEF and HVED pre-treated (40 kJ/kg) seeds. Peak assignment: (1) sesamin and (2) sesamolins. ....	218





## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Composição nutricional de diferentes nozes e sementes.....	33
Table 3.1 - Total phenolics and flavan-3-ols content $\pm$ SD in the seeds and nuts cakes (milligrams per 100 g of dry weight). For each cake, values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p<0.05$ by ANOVA. ....	117
Table 3.2 - ABTS and DPPH antioxidant capacities, reducing power and chelating activities $\pm$ SD in the seeds and nuts cakes. For each cake, values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p<0.05$ . ....	121
Table 3.3 - Determination coefficients between total phenolics and flavan-3-ols and the antioxidant capacity analyses. ....	122
Tabela 4.1 – Planejamento fatorial: valores codificados e originais das variáveis de estudo, temperatura, razão sólido-solvente e concentração de etanol.....	134
Table 4.2 – Coded and uncoded levels of the independent variables.....	142
Table 4.3 – Rotable central composite design in the original and coded form <sup>a</sup> of the independent variables ( $X_1$ , $X_2$ and $X_3$ ) and experimental results ( $\pm$ SD) for the response variables, total phenolics (TP), sesamin (SE), sesaminol triglucoside (ST) and antioxidant capacity (ABTS) <sup>b</sup> .....	149
Table 4.4 – Significant regression coefficients of the predicted polynomial models for the investigated responses and model parameters. ....	150
Tabela 5.1 – Condições de operação para os diferentes tratamentos realizados na avaliação da melhor energia de trabalho. ....	163
Table 5.2 – Effective mass diffusivity as a function of the radius for different solutes and process conditions. For each result, values not sharing a common superscript letter differ significantly at $p<0.01$ . ....	189



## Sumário

<b>CAPÍTULO 1 - Introdução.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Fundamentos teóricos e revisão bibliográfica .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Aproveitamento de resíduos agroindustriais e compostos antioxidantes.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Tortas de nozes e sementes provenientes da indústria de óleo comestível .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Propriedades nutricionais e composição das nozes e sementes.....	32
2.2.2 Propriedades tecnológicas das tortas provenientes da indústria de óleo comestível.....	36
<b>2.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante .....</b>	<b>38</b>
2.3.1 Propriedades nutricionais e efeitos fisiológicos dos compostos fenólicos .....	40
2.3.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	41
<b>2.4 Gergelim .....</b>	<b>43</b>
2.4.1 Composição, cultivo e aspectos econômicos.....	44
2.4.2 Óleo .....	46
2.4.3 Proteínas .....	47
2.4.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	48
<b>2.5 Processos tradicionais de extração.....</b>	<b>52</b>
2.5.1 Extração sólido-líquido convencional de compostos fenólicos e proteínas .....	52
2.5.2 Extração convencional de óleo .....	59
<b>2.6 Processos alternativos de extração.....</b>	<b>61</b>
2.6.1 Tecnologia de Campo Elétrico Pulsado (CEP).....	61
2.6.2 Tecnologia de Descargas Elétricas de Alta Tensão (DEAT) .....	69
2.6.3 Extração assistida por CEP e DEAT .....	72
<b>2.7 Referências .....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 3 - Caracterização de diferentes tortas derivadas da produção de óleo comestível .....</b>	<b>95</b>
<b>3.1 Materiais e métodos.....</b>	<b>95</b>
3.1.1 Preparo das tortas .....	95
3.1.2 Extração dos compostos fenólicos.....	97
3.1.3 Análises espectrofotométricas dos compostos fenólicos.....	98
3.1.4 Análises espectrofotométricas de atividade antioxidante.....	102
3.1.5 Hidrólise dos compostos fenólicos e análise por HPLC.....	105
<b>3.2 Artigo 1 .....</b>	<b>108</b>
3.2.1 Introduction .....	109
3.2.2 Materials and methods.....	110
3.2.3 Results and discussion .....	116
3.2.4 Conclusions .....	125

<b>3.3 Referências.....</b>	<b>125</b>
<b>CAPÍTULO 4 - Extração sólido-líquido convencional dos compostos fenólicos da torta de gergelim.....</b>	<b>131</b>
<b>4.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>132</b>
4.1.1 Extração dos compostos fenólicos .....	132
4.1.2 Planejamento experimental e análise estatística .....	133
4.1.3 Análises dos resultados .....	135
<b>4.2 Artigo 2.....</b>	<b>137</b>
4.2.1 Introduction.....	138
4.2.2 Materials and Methods.....	139
4.2.3 Results and discussion .....	145
4.2.4 Conclusions.....	155
<b>4.3 Referências.....</b>	<b>156</b>
<b>CAPÍTULO 5 - Aplicação de tecnologias elétricas na extração de compostos fenólicos e proteínas da torta de gergelim .....</b>	<b>159</b>
<b>5.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>160</b>
5.1.1 Matéria-prima.....	160
5.1.2 Equipamento para aplicação dos tratamentos elétricos.....	161
5.1.3 Pré-tratamentos e etapa de extração sólido-líquido .....	163
5.1.4 Análise dos extratos .....	165
5.1.5 Cálculo da difusividade mássica efetiva .....	167
5.1.3 Análise estatística.....	169
<b>5.2 Artigo 3.....</b>	<b>170</b>
5.2.1 Introduction .....	171
5.2.2 Materials and Methods.....	173
5.2.3 Results and discussion .....	178
5.2.4 Conclusions.....	190
<b>5.3 Referências.....</b>	<b>190</b>
<b>CAPÍTULO 6 - Aplicação de tecnologias elétricas na extração de óleo das sementes de gergelim.....</b>	<b>195</b>
<b>6.1 Materiais e Métodos.....</b>	<b>196</b>
6.1.1 Matéria-prima e caracterização .....	196
6.1.2 Pré-tratamentos .....	196
6.1.3 Análises da água dos tratamentos elétricos.....	197
6.1.4 Prensagem .....	198
6.1.5 Análises do óleo e da torta .....	200
<b>6.2 Artigo 4.....</b>	<b>202</b>

6.2.1 Introduction .....	203
6.2.2 Materials and methods.....	205
6.2.3 Results and discussion .....	210
6.2.4 Conclusions .....	219
<b>6.3 Referências .....</b>	<b>220</b>
<b>CAPÍTULO 7 - Considerações finais.....</b>	<b>223</b>
<b>7.1 Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>227</b>



## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Subprodutos do processamento de alimentos de origem vegetal são fontes promissoras de compostos que podem ser utilizados tanto na indústria de alimentos como de fármacos, por suas propriedades nutricionais e tecnológicas favoráveis. Nas últimas décadas, a exploração de resíduos orgânicos provenientes de vários setores da agricultura e da indústria vem se intensificando; resíduos como farelos, cascas, bagaços e sementes de frutas surgem como potenciais ingredientes para formulação de novos produtos. A extração e purificação de compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais é bastante desejada pois essas substâncias são, frequentemente, usadas em alimentos funcionais, aditivos para a indústria alimentícia e na produção de fármacos e cosméticos. Atualmente, cresce o interesse por esses produtos, o que torna a produção e purificação de extratos vegetais uma área de grande interesse, tanto para a indústria, quanto para a pesquisa acadêmica.

Paralelamente, o cultivo do gergelim apresenta grande potencial econômico, principalmente devido ao seu alto teor de óleo. A importância do cultivo dessa oleaginosa tem crescido gradativamente à medida que são descobertas novas fontes de aproveitamento da semente e de seus subprodutos. Além de ser rico em óleo, o gergelim se destaca pelo alto teor de proteínas, fibras, vitaminas e antioxidantes. Os principais antioxidantes são as lignanas, estando esses compostos presentes no óleo e na torta da semente.

Tanto a extração de óleo como a de compostos antioxidantes, a partir de matrizes alimentares, é influenciada por diversos parâmetros de processo. A escolha apropriada dessas variáveis pode aumentar significativamente a eficiência da extração. Cada alimento é

diferente em sua composição e estrutura e, sendo assim, sua interação com as diferentes condições de processo (temperatura, tamanho de partícula, solvente, entre outras) pode variar de forma expressiva. Tais possibilidades reforçam a importância da pesquisa dos processos de extração de diferentes componentes e em diferentes matrizes alimentares.

A técnica clássica de extração de compostos nutracêuticos baseia-se na utilização de solventes orgânicos juntamente com a aplicação de calor e/ou agitação. Esses solventes, devido a sua toxicidade, devem ser eliminados previamente à aplicação dos extratos em alimentos, o que eleva o custo e os gastos energéticos do processo. Além disso, para melhorar a penetração dos solventes nos alimentos durante a extração, é necessário um aumento na temperatura, tornando o processo ainda mais dispendioso. Para a extração de óleo de sementes podem ser utilizadas as metodologias de prensagem e extração com solventes. A tecnologia de prensagem evita o uso de solventes mas apresenta, contudo, rendimento mais baixo. A fim de se aumentar o rendimento o gergelim comumente passa por pré-tratamentos, que podem ser bastante prejudiciais à qualidade dos produtos finais obtidos. As metodologias citadas são eficientes para extração de óleo e compostos bioativos, porém, os processos de extração podem ter seu rendimento melhorado através da aplicação de novas tecnologias. O uso de tecnologias inovadoras para auxiliar na extração de compostos fenólicos pode reduzir o uso de solventes e a necessidade da aplicação de altas temperaturas, bem como aumentar a eficiência dos processos e melhorar a qualidade dos produtos finais.

Neste contexto, diversas tecnologias vêm sendo estudadas, destacando-se, entre elas, as de extração assistida por campo elétrico pulsado ou descargas elétricas de alta tensão. Durante as últimas décadas, descobriu-se que a aplicação de campo elétrico pulsado melhora a eficiência dos processos de extração. Verificou-se, também, que ela é minimamente invasiva durante o processamento de vegetais, evitando alterações indesejáveis. Mais recentemente, o efeito das descargas elétricas nos processos de extração passou a ser estudado com maior intensidade, já tendo sido identificado que essa tecnologia pode ser usada em diferentes aplicações e que é eficiente nos experimentos com extração. As aplicações das tecnologias de campo elétrico pulsado e de descargas elétricas de alta tensão estão associadas a diferentes fenômenos que têm como consequências a ruptura da membrana e/ou da parede celular, entre outras. Essas mudanças estruturais podem aumentar a transferência de massa durante o processo de prensagem e, também, ao longo do processo difusivo entre sólido e solvente.



O objetivo geral desse trabalho é estudar a extração de compostos bioativos de diferentes tortas de nozes e sementes e investigar a aplicação de tecnologias convencionais e elétricas na extração de componentes do gergelim, objetivando desenvolver processos mais eficazes. Dentro desse contexto, os objetivos específicos deste trabalho são:

- determinar a presença de diferentes compostos fenólicos e a atividade antioxidante de tortas provenientes da produção de óleos comestíveis;
- identificar individualmente alguns dos compostos fenólicos presentes nessas tortas;
- identificar e quantificar os compostos fenólicos da torta de gergelim;
- comparar o efeito das tecnologias de extração convencional e assistidas por campo elétrico pulsado ou descargas elétricas de alta tensão na extração de compostos fenólicos e proteínas da torta de gergelim;
- otimizar os processos de extração, avaliando as melhores condições para cada parâmetro envolvido nos diferentes processos;
- obter um extrato rico em antioxidantes para ser utilizado na produção de alimentos, fármacos e cosméticos;
- avaliar o efeito das tecnologias de campo elétrico pulsado e de descargas elétricas de alta tensão como pré-tratamentos da prensagem das sementes;
- calcular a difusividade mássica dos compostos para as diferentes tecnologias;
- identificar os compostos fenólicos do óleo de gergelim;
- reduzir o volume de torta gerado após a prensagem das sementes;
- a partir das sementes de gergelim, obter uma maior quantidade de óleo, rico em compostos bioativos, e uma torta rica em proteínas e compostos fenólicos.

As principais contribuições deste trabalho, no que tange ao seu caráter inovador, são o estudo aprofundado das possibilidades de utilização da semente de gergelim e a aplicação de tecnologias elétricas emergentes no seu processamento.

O presente texto está estruturado de forma a apresentar a evolução do trabalho. No capítulo inicial (Capítulo 2), é apresentada a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica.

O Capítulo 3 descreve os materiais e métodos empregados na caracterização dos extratos de diferentes tortas. Por fim, são apresentados os resultados obtidos e é realizada uma comparação entre as diferentes matérias primas estudadas.

O Capítulo 4 trata da avaliação de diferentes parâmetros do processo convencional de extração de compostos fenólicos do gergelim; primeiramente é apresentada a metodologia empregada e, na sequência, os resultados desse estudo e as condições ótimas obtidas.

No Capítulo 5, é apresentado o equipamento utilizado para aplicação de campo elétrico pulsado e descargas elétricas de alta tensão, bem como a metodologia experimental e a discussão dos efeitos dessas tecnologias na extração de compostos fenólicos e de proteínas da torta.

No Capítulo 6 deste trabalho, são apresentados os materiais e métodos e os resultados obtidos, demonstrando as implicações da aplicação das tecnologias alternativas abordadas nesse estudo nas sementes de gergelim.

Os capítulos de 3 a 6 são compostos por duas partes: a primeira apresenta a seção de materiais e métodos descrita de forma detalhada e, na sequência, é apresentado o artigo científico originado a partir desta parte do trabalho. Desta forma, a seção de materiais e métodos apresentada nos artigos se repete (ainda que de forma mais sucinta) e sua leitura pode ser dispensada.

Finalmente, no Capítulo 7 são apresentadas as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros nessa área de pesquisa.

## **CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos das tecnologias utilizadas neste trabalho e é realizada uma revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados nessa tese. A revisão compreende o aproveitamento de resíduos industriais, as tortas provenientes da indústria do óleo, a semente gergelim e seus diferentes componentes, bem como os processos de extração, tanto tradicionais como alternativos.

### **2.1 Aproveitamento de resíduos agroindustriais e compostos antioxidantes**

A exploração de subprodutos do processamento de frutas e vegetais como fontes de compostos funcionais e a sua aplicação é um campo promissor que requer uma pesquisa interdisciplinar envolvendo engenharia e química de alimentos, nutrição e toxicologia. A tecnologia de processamento deve ser otimizada para minimizar a geração de resíduos e devem ser desenvolvidos métodos para a melhor utilização dos subprodutos. As técnicas desenvolvidas precisam poder ser aplicadas em larga escala e ter custo acessível. Para tal, é necessária uma participação ativa da indústria de alimentos com o foco em produção sustentável e gerenciamento de resíduos (Schieber *et al.*, 2001).

Compostos extraídos a partir de subprodutos da indústria de alimentos podem ser divididos de forma ampla em: insolúveis, como é o caso de algumas fibras entre outros; hidrossolúveis, como os compostos fenólicos; e lipossolúveis, que é o caso carotenoides

(Schieber *et al.*, 2001). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários cujos potenciais efeitos na saúde humana e atividade antioxidante têm sido amplamente revisados. Esses compostos serão abordados na seção 2.3 de forma mais aprofundada. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos faz com que eles tenham uma ampla gama de aplicações sendo as principais a prevenção de reações de oxidação lipídica em alimentos contendo óleos e gorduras e o seu uso como ingrediente funcional em alimentos e suplementos alimentares (Balasundram *et al.*, 2006).

De acordo com a WHO (*World Health Organization*), o baixo consumo de frutas e vegetais está relacionado ao aumento do risco de câncer, doenças do coração e infartos. Os mecanismos de ação podem envolver vários componentes presentes nos alimentos incluindo antioxidantes, flavonoides, carotenoides, vitaminas e fibras alimentares (WHO, 2012). Os alimentos funcionais podem ter, de forma geral, dois tipos de efeitos benéficos: reduzir o risco de uma doença ou melhorar uma função fisiológica específica (Roberfroid, 2002).

Os consumidores estão cada vez mais cientes dos problemas de saúde relacionados à dieta e, assim, cresce a demanda por ingredientes naturais seguros e que promovam melhorias à saúde. Entretanto, apesar da crescente percepção dos problemas de saúde relacionados à alimentação, uma grande parcela da população não consome frutas e vegetais suficientes. Assim, suplementos alimentares e alimentos fortificados podem ser considerados como alternativas para o consumo dos ingredientes benéficos à saúde presentes nos vegetais (Schieber *et al.*, 2001). Como consequência, o mercado de produtos nutracêuticos e alimentos funcionais cresce cada vez mais, alavancando os estudos referentes a fontes naturais de antioxidantes e suas potenciais aplicações nesse segmento (Lachance *et al.*, 2001; Lachance, 2002).

Os alimentos funcionais entraram no mercado global com força na última década e rapidamente ganharam espaço como produtos com elevado valor agregado. O termo alimento funcional é geralmente utilizado para descrever alimentos que, além de seu valor nutricional, influenciam funções específicas do corpo beneficiando a saúde e/ou o bem estar do consumidor (Kotilainen *et al.*, 2006). De acordo com a RDC nº 7 de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2002), substâncias bioativas são não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica. Dentre os produtos regulados pela ANVISA estão os carotenoides, os flavonoides e os polifenóis entre outros. Apesar dessa e de outras definições, ainda existem discussões sobre a melhor classificação

dos alimentos funcionais, dificultando uma estimativa do tamanho desse mercado. De acordo com Kotilainen *et al.* (2006) estima-se que a fatia de mercado esteja entre US\$ 30 e 60 bilhões. Esse setor teve um grande crescimento, de aproximadamente 10 % ao ano nos últimos anos. Produtores japoneses e americanos buscam no Brasil ingredientes ricos em antioxidantes. Dentre estes, podem ser citados o açaí, o guaraná e o yacon. O desenvolvimento de produtos funcionais, atualmente, tem como foco a fortificação com micronutrientes, produtos probióticos e cremes vegetais que reduzam o colesterol (Kotilainen *et al.*, 2006).

O relatório do projeto Brasil Food Trends 2020 elaborado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP) e pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), que avaliou tendência de mercado, revelou que no futuro os consumidores brasileiros levarão mais em conta a qualidade e o enriquecimento nutricional dos produtos. Entretanto, uma pesquisa realizada em 2005 (*Nutraceuticals World*) revelou que companhias multinacionais ainda são dominantes no setor de alimentos funcionais. Os produtores brasileiros que fazem parte desse mercado dependem da importação de vitaminas e ingredientes bioativos. Essas importações chegam a 80 % dos ingredientes funcionais utilizados, o que causa um aumento nos preços do produto final e faz com que esses produtos sejam vendidos com valores 40 a 300 % maiores se comparados aos convencionais (Kotilainen *et al.*, 2006).

Na indústria de alimentos, o uso de aditivos sintéticos é cada vez mais rejeitado pelos consumidores, portanto, os ingredientes funcionais devem, preferencialmente, ser originários de fontes naturais. Isso é particularmente importante para os compostos fenólicos que, em contraste à maioria dos carotenoides e vitaminas, não podem ser sintetizados quimicamente e precisam ser extraídos de vegetais (Schieber *et al.*, 2001). Além de sua aplicação como ingrediente funcional em alimentos e nutracêuticos, os antioxidantes obtidos a partir de resíduos podem ser usados para aumentar a durabilidade de alimentos, prevenindo a peroxidação lipídica e protegendo contra o dano oxidativo. O aumento da estabilidade de óleos vegetais frente às reações de oxidação é importante para a indústria (Moure *et al.*, 2001).

O desenvolvimento e a comercialização de alimentos funcionais requerem esforços significativos no âmbito da pesquisa. Essas pesquisas devem identificar compostos funcionais e acessar seus efeitos fisiológicos, levando em consideração a biodisponibilidade e as

mudanças sofridas pelos compostos durante o processamento. Com o aumento do entendimento em relação aos componentes dos alimentos e seus mecanismos fisiológicos, os produtos podem ser manipulados de forma a se obter uma maior quantidade de benefícios (Kotilainen *et al.*, 2006).

A obtenção de antioxidantes naturais provenientes de resíduos foi revisada por Moure *et al.* (2001). Esse estudo demonstrou que, de forma geral, extratos de origem vegetal provenientes de resíduos têm atividade antioxidante - em alguns casos podendo ser comparados a antioxidantes sintéticos - e a sua extração e aplicação pode ser uma alternativa para obtenção de antioxidantes naturais. Ainda, mesmo quando os extratos naturais são menos eficientes, o seu uso pode ser vantajoso porque os níveis máximos de utilização para os produtos naturais não são os mesmos que para os antioxidantes sintéticos.

Devido à ampla variedade desses resíduos uma grande variedade de compostos fenólicos pode ser encontrada neles. Entre os resíduos que têm sido estudados como fontes de baixo custo de antioxidantes podem ser citados: bagaço de oliva (Sheabar e Neeman, 1988; Aliakbarian *et al.*, 2011; Michailides *et al.*, 2011), sementes e bagaço de uva (Torres e Bobet, 2001; Deng *et al.*, 2011; Yilmaz *et al.*, 2011), bagaço e casca de maçã (Diñeiro García *et al.*, 2009; Mahawar *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012), sementes e cascas de frutas cítricas (Bocco *et al.*, 1998; Gorinstein *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2002), resíduo da produção de polpa de cenoura (Chen e Tang, 1998), subprodutos de cacau (Azizah *et al.*, 1999) e soja (Hosny e Rosazza, 1999), cascas de arroz (Ramarathnam *et al.*, 1989), cascas de trigo (Watanabe *et al.*, 1997), cascas de amêndoa (Takeoka e Dao, 2002), cascas de pistache (Goli *et al.*, 2005), sementes e pele de tomate (George *et al.*, 2004; Toor e Savage, 2005) entre outros.

## **2.2 Tortas de nozes e sementes provenientes da indústria de óleo comestível**

Sementes e nozes podem ser consideradas fontes de compostos antioxidantes, como demonstrado em estudos prévios para a canola (Krygier *et al.*, 1982; Wanasundara *et al.*, 1994), o gergelim (Shahidi *et al.*, 2006), a linhaça (Oomah *et al.*, 1995), a semente de girassol (Kubicka *et al.*, 1999), pecãs, amêndoas, avelãs, e macadâmias (Yang *et al.*, 2009), entre

outras. As tortas dessas nozes e sementes são os produtos (ou subprodutos) obtidos após a extração de óleo das mesmas.

De toda a produção de tortas provenientes da indústria de óleo comestível, grande parte é originária de países em desenvolvimento como Índia, Brasil e Argentina (Ramachandran *et al.*, 2007). De acordo com dados da FAO (2010), a produção de tortas no Brasil passou de 16 milhões de toneladas, em 1992, para 56 milhões de toneladas em 2010, sendo a maior parte desse volume oriunda da indústria de óleo de soja. Dentre as nozes e sementes estudadas neste trabalho, o maior volume de torta é das tortas de girassol e de gergelim. O óleo dessas sementes é mundialmente consumido em larga escala, em 2011 foram produzidos 13 milhões de toneladas de óleo de girassol e 1 milhão de toneladas de óleo de gergelim (FAO, 2011), o que acarreta na produção de um grande volume de torta.

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

O estudo de Matthäus (2002) avaliou oito diferentes resíduos de sementes após a extração de óleo e encontrou compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, apontando seu uso como um antioxidante natural de óleos e gorduras. Experimentos realizados por Pericin *et al.* (2009) demonstraram que a torta derivada da extração de óleo de semente de abóbora apresentou maior quantidade de compostos fenólicos após a remoção do óleo quando comparada à semente contendo o óleo, evidenciando que estes compostos encontram-se mais ligados aos componentes da torta do que ao óleo. Ainda, o estudo mostrou que existem mais compostos fenólicos livres (não ligados) na torta do que na semente, sendo esses mais fáceis de extrair. Os subprodutos da indústria do azeite de oliva também têm atraído interesse considerável como uma fonte de compostos fenólicos, com atenção especial aos resíduos da moagem. Os fenólicos presentes na oliva são distribuídos no óleo, nos efluentes e na torta sólida, sendo que apenas 1 a 2 % dos fenólicos são extraídos no óleo (Rodis *et al.*, 2002).

De um ponto de vista econômico, os resíduos da extração de óleo podem ser fontes atraentes de diferentes substâncias bioativas como glicosinolatos e compostos fenólicos, sendo a sua retenção nos resíduos bastante significativa (Matthäus, 2002). Apesar da remoção dos tocoferóis e parte dos fosfolípidios no processo de extração do óleo, o alto teor de polifenóis nos resíduos da produção de óleo demonstra que o processo de extração não diminui o teor desses compostos, pois dificilmente os ácidos fenólicos se solubilizam na fase lipídica. Desta forma, fica evidente o grande potencial das tortas como um recurso adequado e economicamente viável para a recuperação dessa classe de substâncias (Matthäus, 2002; Weisz *et al.*, 2009).

Além da extração de compostos fenólicos agregar valor às tortas (Matthäus, 2002), esse processo, possivelmente, também valoriza as proteínas presentes nas tortas. Isso ocorre, pois alguns compostos fenólicos se ligam a grupos de aminoácidos, resultando na redução da avaliabilidade desses aminoácidos no sistema digestivo (Sabir *et al.*, 1974). Portanto, em alguns casos, para manter o valor nutricional ao produzir concentrados e isolados proteicos provenientes das tortas, os compostos fenólicos devem ser removidos (Xu e Diosady, 2002; Weisz *et al.*, 2009; Soto-Vaca *et al.*, 2012).

### **2.2.1 Propriedades nutricionais e composição das nozes e sementes**

O consumo de nozes está ligado extensivamente a uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares (Fraser *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2002); essa associação pode ser explicada pelo seu efeito redutor do colesterol. Estudos demonstrando a composição de ácidos graxos de diferentes nozes foram realizados para amêndoas (Hyson *et al.*, 2002), macadâmias (Curb *et al.*, 2000) e pecãs (Morgan e Clayshulte, 2000) entre outras. As nozes inteiras contêm uma variedade de constituintes que, além de ter efeitos cardioprotetores, podem ter efeitos anticancerígenos e na redução do risco de diabetes, produzidos por diferentes mecanismos (Dreher *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2009). As pesquisas envolvendo nozes têm como foco o perfil lipídico e é reduzido o número de estudos que avaliaram o perfil fitoquímico desses produtos e associando esse perfil a atividades antioxidantes e antiproliferativas (Dreher *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2009).

Apesar de similaridades no teor de gordura e proteína em alguns casos, nozes e sementes têm composições químicas bastante variadas. A Tabela 2.1 mostra a distribuição de



macronutrientes de acordo com os dados da base nacional de nutrientes para referência padrão do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2012) para as nozes e sementes em estudo. Entretanto, cabe ressaltar que essa distribuição pode variar de acordo com as condições ambientais e geográficas.

Tabela 2.1 – Concentração dos principais componentes de diferentes nozes e sementes.

Componente (g/100g)	Amêndoa	Noz Pecã	Macadâmia	Avelã	Gergelim	Girassol	Abóbora	Linhaça
Água	4,7	3,5	1,4	5,3	4,7	4,7	2,0	6,7
Proteínas	21,2	9,2	7,9	15,0	17,7	20,8	29,8	18,3
Gorduras totais	49,4	72,0	75,8	60,7	49,7	51,5	49,1	42,2
Carboidratos	21,7	13,9	13,8	16,7	23,5	20,0	14,7	28,9
Fibra dietética total	12,2	9,6	8,6	9,7	11,8	8,6	6,5	27,3
Açúcares totais	3,9	4,0	4,6	4,3	0,3	2,6	1,3	1,6

Fonte: Lista de composição dos alimentos da USDA (2012).

Conforme pode ser observado na Tabela 2.1, nozes e sementes são boas fontes de gordura, proteínas e fibras. Entretanto, também são ricas em micronutrientes, vitaminas, minerais e fitoquímicos (Rainey e Nyquist, 1997; Yang, 2009). Dentre os fitoquímicos presentes nas nozes estão incluídos fitosteróis (presentes na fração lipídica), carotenoides, fenólicos (taninos, ácido elágico e curcuma), flavonoides (luteonina, quercetina, miricetina, campferol e resveratrol), isoflavonas, terpenos, compostos organossulfurados e vitamina E, entre outros (Bravo, 1998; Kris-Etherton *et al.*, 2002). As sementes também contêm variadas substâncias com atividade antioxidante (Duh *et al.*, 1992; Velioglu *et al.*, 1998). Entre essas substâncias estão os compostos fenólicos, tais como: derivados dos ácidos benzoico e cinâmico, coumarinas, flavonoides e ligninas (Oomah *et al.*, 1995).

A composição das tortas e a disponibilidade de seus nutrientes variam grandemente, assim como ocorre para as nozes e sementes. Esses parâmetros dependem da qualidade da semente ou da noz, do método de extração de óleo, dos parâmetros de estocagem, entre outros

fatores (Ramachandran *et al.*, 2007). A seguir, alguns dados para as nozes e sementes encontrados na literatura serão apresentados individualmente.

Amêndoa: estudos avaliando a composição de fenólicos da amêndoa revelaram teores de fenólicos totais de 83 mg EAG/100 g e de flavonoides e taninos de 39,8 e 70 mg EC/100 g, respectivamente (Venkatachalam e Sathe, 2006; Yang *et al.*, 2009). Entretanto, o teor de fenólicos totais pode variar com o cultivar ficando entre 58 e 159 mg/100 g (Bolling *et al.*, 2010a). As quantidades de flavan-3-ols e antocianinas encontradas foram de 0,4 e 2,46 mg/100 g, consecutivamente, quando esses compostos foram analisados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (Harnly *et al.*, 2006). Os principais compostos encontrados na amêndoa foram os ácidos gálico e elágico (Xie *et al.*, 2012).

Avelã: a composição da avelã pode variar bastante, de acordo com Shahidi *et al.* (2007) o teor de fenólicos dessa noz é de 1370 mg EC/100 g. No entanto, o estudo de Yang *et al.* (2009), encontrou um teor de fenólicos totais de 22,5 mg EAG/100 g para a avelã. As quantidades de taninos e flavonoides encontradas na literatura são de 40 e 13,9 mg EC/100 g, respectivamente (Venkatachalam e Sathe, 2006; Yang *et al.*, 2009). Foram encontrados teores maiores de flavan-3-ols e antocianinas na avelã, se comparada à amêndoa, 1,4 e 6,7 mg/100 g, consecutivamente (Harnly *et al.*, 2006). Foram encontrados na avelã: ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-coumárico, ácido ferrúlico e ácido sinápico (Shahidi *et al.*, 2007).

Gergelim: os teores de fenólicos de gergelim ficam em torno de 700 mg EAG/100 g de acordo com Rangkadilok *et al.* (2010). Valores inferiores (em torno de 260 mg EAG/100 g) foram encontrados por Silva *et al.* (2011). Mohdaly *et al.* (2010), que realizaram um estudo utilizando torta de gergelim, obtiveram valores ainda menores de fenólicos totais, 81 mg EAG/100 g. A semente de gergelim contém lignofenols e carboxifenols. As principais lignanas presentes no gergelim são a sesamina (200-500 mg/100 g) e a sesamolina (200-300 mg/100 g), além disso o gergelim também contém ácidos *trans*-cafeico, *trans-p*-coumárico e *trans*-ferrulico e traços de ácido *p*-hidrobenzoico (Dabrowski e Sosulski, 1984; Shahidi e Naczki, 2004).

Linhaça: para a semente de linhaça, de acordo com Oomah *et al.* (1995), após a remoção da casca, o teor de compostos fenólicos pode ser de até 1980 mg EAG/100 g, ficando em geral em torno de 700 mg EAG/100 g. Valores um pouco inferiores foram encontrados por Velioglu *et al.* (1998), que encontraram um teor de fenólicos totais de 509 mg de equivalentes

de ácido ferrúlico (EAF) por 100 g de linhaça. Os principais compostos encontrados na linhaça foram os ácidos *trans*-ferrúlico e *trans*-sinápico (Dabrowski e Sosulski, 1984). A linhaça também contém flavonoides, coumarinas e lignanas, o teor total de flavonoides varia entre 35 e 71 mg/100 g (Oomah *et al.*, 1995). Estudos recentes envolvendo a semente de linhaça têm avaliado a extração de lignanas dessa semente e os benefícios que esses compostos trazem à saúde (Toure e Xu, 2010; Nemes e Orsat, 2012; Schmidt *et al.*, 2012).

Macadâmia: esta noz apresenta teor de fenólicos totais de 36,2 mg EAG/100 g e de taninos e flavonoides de 10 e 9,4 mg EC/100 g (Venkatachalam e Sathe, 2006; Yang *et al.*, 2009). Não foi detectada nessa noz a presença de flavan-3-ols e antocianinas (Harnly *et al.*, 2006). A macadâmia é uma das nozes com menor teor de compostos fenólicos, o que pode ser observado no estudo comparativo de Bolling *et al.* (2010b). Quatro diferentes compostos fenólicos foram detectados na macadâmia ácido 2,6-dihidrobenczóico, 2'-hidróxi-4'-metoxi-acetofenona, 3',5'-dimetoxi-4'-hidróxi-acetofenona e ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (Quinn e Tang, 1996).

Noz pecã: em estudos comparativos com outras nozes, a noz pecã sempre apresentou os maiores teores dos compostos fenólicos analisados. O teor de fenólicos totais dessa noz está em torno de 1200 mg EAG/100 g, o teor de taninos entre 840 e 2000 mg EC/100 g e o teor de flavonoides é de aproximadamente 600 mg EC/100 g (Venkatachalam e Sathe, 2006; Yang *et al.*, 2009; De La Rosa *et al.*, 2010). Por sua vez, os teores de flavan-3-ols e antocianinas, quando analisados por HPLC, são de 8 e 18 mg/100 g, respectivamente (Harnly *et al.*, 2006). Nos extratos metanólicos de noz pecã foram identificados ácidos gálico, gentísico, vanílico, protocatecuico, coumárico, siringico, *p*-hidroxibenzoico e *p*-hidroxifenilacético. Entre esses o ácido fenólico predominante foi o ácido gálico e apenas traços dos ácidos siringico e coumárico foram encontrados (Shahidi e Naczk, 2004).

Semente de abóbora: estudos envolvendo a semente de abóbora são bastante escassos e os teores de compostos fenólicos dessa semente são inferiores aos das demais sementes estudadas, de acordo com a literatura. O teor de fenólicos da semente de abóbora é de 261 mg/100 g e o de taninos é 17 mg/100 g (Zdunczyk *et al.*, 1999; El-Adawy e Taha, 2001). Alguns fenólicos presentes nessa semente foram descritos por Koike *et al.* (2005). Pericin *et al.* (2009) demonstraram que a torta de semente de abóbora possui compostos fenólicos livres de fácil extração. Esses autores encontraram na torta ácido protocatecuico, *p*-hidrobenczóico,

*p*-hidrobenzaldeído e *trans-p*-coumárico, sendo o teor total de ácidos fenólicos de 4,32 mg/100 g.

Semente de girassol: esta semente, entre outras sementes, foi também avaliada no estudo de Matthäus (2002) que encontrou teores de fenólicos totais entre 270 e 3880 mg de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por 100 de semente desengordurada e teores de flavonoides entre 145 e 1203 mg de Equivalentes de Catequina (EC) em 100 g. As quantidades dos compostos analisados variaram de acordo com o solvente utilizado para a extração. A água foi o melhor solvente para extração de fenólicos totais enquanto uma solução de metanol e água contendo 70 % metanol foi o solvente mais adequado para a extração de flavonoides. Teores de fenólicos totais próximos a 3000 mg/100 g de compostos fenólicos foram encontrados por Weisz *et al.* (2009), entretanto, outros autores relataram quantidades desses compostos próximas a 1000 mg/100 g (Dabrowski e Sosulski, 1984; Velioglu *et al.*, 1998). O principal ácido encontrado na farinha desengordurada de girassol foi o ácido clorogênico (Dabrowski e Sosulski, 1984). Estima-se que em torno de 70 % dos compostos fenólicos do girassol esteja presente como ácido clorogênico (Sabir *et al.*, 1974).

### **2.2.2 Propriedades tecnológicas das tortas provenientes da indústria de óleo comestível**

Conforme previamente mencionado, a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nas tortas faz com que os extratos fenólicos desses produtos tenham diferentes aplicações como ingrediente funcional, suplemento alimentar e como inibidor de reações de oxidação lipídica em alimentos.

A deterioração oxidativa de gorduras e óleos em alimentos é responsável por sabores e odores rançosos, com consequente decaimento na qualidade nutricional e na segurança causado pela formação de compostos secundários potencialmente tóxicos. A adição de antioxidantes nesses produtos é necessária para preservar o sabor e a cor e evitar a destruição de vitaminas (Moure *et al.*, 2001). Em geral, são utilizados antioxidantes sintéticos na conservação de alimentos, sendo os mais frequentes: hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propila e di-*t*-butil-hidroquinona (TBHQ). Além desses, tocoferóis são utilizados como antioxidantes naturais (Moure *et al.*, 2001). No entanto, estudos revelando a possível toxicidade do BHA e do BHT, o alto custo de produção e a baixa eficiência de antioxidantes naturais, como os tocoferóis, aliados ao aumento da consciência

por parte do consumidor com relação aos aditivos usados em alimentos, levaram à necessidade de identificação de fontes alternativas naturais e mais seguras para obtenção de antioxidantes alimentares (Wanasundara e Shahidi, 1998). É importante ressaltar, entretanto, que antioxidantes naturais também devem ser avaliados em relação à segurança; não é possível presumir a segurança desses ingredientes apenas por ocorrerem naturalmente (Moure *et al.*, 2001).

Entre os exemplos dessa aplicação está o estudo de Leonardis *et al.* (2003), que demonstraram que a adição de ácido clorogênico proveniente da torta de semente de girassol retardou o processo de oxidação do óleo de girassol. O ácido clorogênico proveniente das sementes foi mais eficiente que o BHA em baixas temperaturas. Em altas temperaturas, a eficiência do ácido clorogênico proveniente das sementes foi similar a do BHA. De acordo com os autores, é provável que o ácido clorogênico presente nas sementes esteja ligado a proteínas e açúcares reduzindo a sua atividade antioxidante. A hidrólise dos extratos obtidos a partir da torta de semente de girassol permitiu a quebra dessas ligações e revelou que o extrato hidrolisado é um antioxidante mais efetivo que o BHA, mesmo em altas temperaturas (Leonardis *et al.*, 2003).

Além dos compostos fenólicos, as fibras e proteínas presentes nas tortas também podem ser utilizadas como ingredientes. As fibras podem ser usadas para melhoramento ou enriquecimento nutricional de um alimento. Estudos vêm sendo realizados com fibras de subprodutos como cascas de trigo (Chen *et al.*, 2011) e arroz (Sangnark e Noomhorm, 2004) para verificação de sua possível aplicação como ingrediente na indústria de alimentos. Um exemplo de ingrediente que poder ser produzido a partir de tortas é uma fibra dietética antioxidante, o sugerida por Saura-Calixto (1998) para o bagaço de uva.

Ainda, as tortas apresentam teor de proteínas de até quase 30 % (de acordo com a Tabela 2.1), podendo ser utilizadas para a elaboração de concentrados e isolado proteicos que têm como aplicação a alimentação humana e animal. Uma revisão sobre a funcionalidade de produtos proteicos obtidos a partir de sementes utilizadas na produção de óleo foi realizada por Moure *et al.* (2006). Os autores sugerem que proteínas de origem vegetal são alternativas a proteínas de origem animal para alimentação e para uso em cosméticos. Isso se deve a mais fácil renovação da matéria-prima e a variedade de fontes em diferentes regiões. O isolamento das proteínas de sementes é essencial para valorização das tortas (Rodrigues *et al.*, 2012). Ainda, estudos realizados para obtenção de ingredientes proteicos a partir de canola

verificaram que a remoção dos compostos fenólicos, além de ter efeito no valor nutricional das proteínas, melhorou os aspectos de cor e sabor dos isolados de proteína (Xu e Diosady, 2002).

### 2.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são considerados de grande importância fisiológica e morfológica em plantas e são um dos grupos mais recorrentes em fitoquímicos (Bravo, 1998). Esses compostos estão presentes em alimentos e são originários de uma das principais classes de metabólitos secundários em plantas, são derivados da fenilalanina e, em menor quantidade, da tirosina. Quimicamente, fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila e seus derivados (Shahidi e Naczki, 2004). Esses compostos formam um dos grupos mais numerosos do reino vegetal, com mais de 8000 diferentes estruturas conhecidas (Bravo, 1998).

De acordo com Shahidi e Naczki (2004), os compostos fenólicos podem ser divididos em sete diferentes classes: derivados dos ácidos cinâmico e benzoico e fenóis simples, coumarinas, flavonoides e estilbenos, lignanas e ligninas, suberinas e cutinas, taninos e, por fim, tocoferóis e tocotrienóis. Entre as mais importantes classes de compostos fenólicos de baixa massa molecular estão os fenóis simples e os flavonoides. Na classe dos fenólicos simples são bastante comuns os ácidos fenólicos (gálico, vanílico, siringico, *p*-hidroxibenzóico, entre outros) e os aldeídos (vanilina, siringaldeído, *p*-hidroxi benzaldeído). Os flavonoides são considerados o grupo mais importante, podendo ser dividido em treze subclasses, contendo mais de 5000 compostos. A Figura 2.1 representa a estrutura básica de uma molécula de flavonoide. Entre os flavonoides, as flavonas (por exemplo, apigenina, luteonina, diosmina), os flavonóis (quercetina, miricetina e campferol, entre outros) e seus glicosídeos são os compostos mais comuns (Bravo, 1998). Além desses grupos, podem ser citadas as flavanas, grupo do qual fazem parte as antocianinas, as catequinas e os flavan-3-óis (Bravo, 1998; Shahidi e Naczki, 2004).

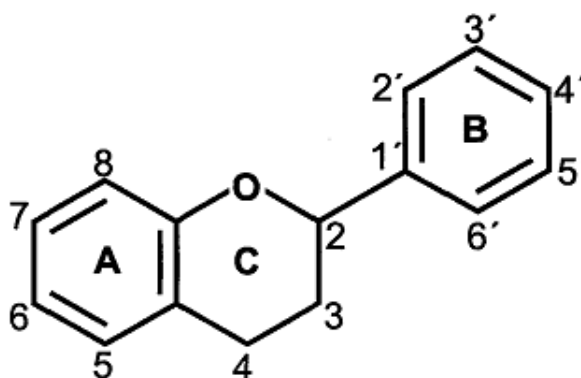


Figura 2.1 – Estrutura básica de um flavonoide (Bravo, 1998).

Os taninos diferem dos dois grupos anteriormente citados por ter massa molar média ou alta. Os flavonoides (catequina, epicatequina, por exemplo) são os constituintes monoméricos dos taninos condensados. Os taninos são moléculas altamente hidroxiladas e podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. Esses compostos podem ser divididos em duas classes: taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavonoides, especificamente flavan-3-óis. A estrutura básica de uma molécula de tanino condensado é apresentada na Figura 2.2. Os taninos hidrolisáveis são ácidos gálicos glicosilados e, de acordo com a sua nomenclatura, são compostos facilmente hidrolisáveis em meios ácidos ou alcalinos ou, ainda, utilizando água quente ou enzimas. A hidrólise desses compostos forma álcool poli-hídrico e ácido fenilcarboxílico (Bravo, 1998; Shahidi e Naczki, 2004).

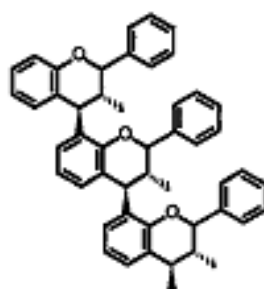


Figura 2.2 – Estrutura básica de um tanino condensado (Bravo, 1998).

### 2.3.1 Propriedades nutricionais e efeitos fisiológicos dos compostos fenólicos

Estudos mostram que os compostos fenólicos exibem uma ampla variedade de propriedades fisiológicas como efeitos antialérgico, antiarteriogênico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, cardioprotetor e vaso dilatador (Middleton Jr. *et al.*, 2000; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2005). Esses compostos têm sido associados aos benefícios derivados do consumo de frutas e vegetais (Hertog *et al.*, 1993; Parr e Bolwell, 2000) e os efeitos benéficos dos compostos fenólicos, por sua vez, têm sido associados a sua atividade antioxidante (Heim *et al.*, 2002). Por isso, o teor de compostos fenólicos pode ser um bom indicativo do potencial antioxidante de alguns alimentos (Parr e Bolwell, 2000). Os radicais livres e a oxidação estão relacionados a doenças crônicas como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, e também à ocorrência de câncer, por isso as propriedades nutracêuticas dos compostos fenólicos são atribuídas à sua capacidade antioxidante e de se ligar a radicais livres (Tomás-Barberán *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos podem estar livres ou ligados. A importância dos compostos fenólicos ligados sobre a saúde humana ainda não foi totalmente esclarecida. Compostos fitoquímicos ligados não podem ser digeridos pelas enzimas humanas e podem passar pelo estômago e pelo intestino, chegando ao cólon (Sosulski *et al.*, 1982). Uma possível hipótese é que esses compostos sejam absorvidos em determinadas partes diferentes do trato gastrointestinal, tendo um efeito singular nos benefícios à saúde (Yang *et al.*, 2009).

Conforme previamente abordado, uma preocupação em relação aos compostos fenólicos é o seu papel como antinutrientes, devido a sua habilidade de reduzir a digestibilidade das proteínas pela precipitação direta ou pela inibição da atividade enzimática (Ferguson, 2001). Um exemplo são os taninos que podem se complexar com proteínas, carboidratos e enzimas (Naczki *et al.*, 1996). O grupo fenólico dos taninos se liga fortemente aos grupos NH de peptídeos e proteínas e previne a sua hidrólise e digestão no estômago, portanto, esses compostos também podem ser conhecidos como sendo antinutricionais (Shahidi *et al.*, 2006). Os potenciais efeitos adversos dos fenólicos devem ser considerados, pois ainda é limitada a informação sobre esse tópico, uma revisão sobre o assunto foi realizada por Mennen *et al.* (2005).



### 2.3.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua habilidade de neutralizar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons, ou complexar cátions metálicos (Afanas'ev *et al.*, 1989; Amarowicz *et al.*, 2004). Essa habilidade é determinada em grande parte pela estrutura dos fenólicos, estabelecendo uma relação entre a estrutura dos compostos e a sua atividade antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006).

A relação entre atividade e estrutura tem sido usada como uma forma teórica de prever a atividade antioxidante e foi estudada por Das e Pereira (1990), Hudson e Lewis (1983a), Saint-Cricq De Gaulejac *et al.* (1999) e Zhang (1999). Sabe-se que polifenóis poliméricos são antioxidantes mais potentes do que fenóis monoméricos (Hagerman *et al.*, 1998). Ainda, o efeito de cada composto depende do número e da posição dos radicais hidroxil e metóxi no anel benzênico e da possibilidade de deslocamento dos elétrons nas ligas duplas (Milic *et al.*, 1998). Além disso, a presença de açúcares ligados aos flavonóis de diferentes vegetais tem demonstrado afetar significativamente a atividade antioxidante desses compostos (Plumb *et al.*, 1999a, 1999b).

Apesar de serem demonstradas algumas relações entre a estrutura dos compostos fenólicos e a sua capacidade antioxidante, diferentes resultados foram relatados sobre esse aspecto; alguns autores encontraram uma correlação entre o teor de polifenóis e a atividade antioxidante, enquanto outros não relataram a mesma relação. No estudo de Maillard e Berset (1995), não foi observada uma correlação entre o teor de fenólicos e a atividade antioxidante do malte, os resultados mostraram que outros compostos são responsáveis por essa atividade. Resultados similares foram observados por Kähkönen *et al.* (1999) para extratos de plantas.

A qualidade de extratos naturais e sua capacidade antioxidante dependem não somente da qualidade da planta, da origem geográfica, das condições climáticas, da data de colheita e do armazenamento, mas também de fatores ambientais e tecnológicos (Hagerman *et al.*, 1998; Moure *et al.*, 2001). Outros importantes fatores afetando a atividade antioxidante são o tipo e a polaridade do solvente extrator, os processos de separação ou isolamento dos compostos, a pureza dos compostos ativos, assim como as metodologias de teste da atividade e tipo de substrato a ser protegido pelo antioxidante (Meyer *et al.*, 1998).

Durante a oxidação dos lipídios, os antioxidantes agem de diferentes formas, ligando íons metálicos, neutralizando radicais e decompondo peróxidos. Frequentemente, mais de um mecanismo está envolvido, podendo causar sinergia entre as reações. Em alimentos, atividade antioxidante significa quebra de uma cadeia de reações, inibindo a peroxidação lipídica, enquanto em sistemas *in vivo* os radicais livres podem danificar proteínas, DNA e outras moléculas. Para aplicação em alimentos de antioxidantes, o mecanismo *in vivo* da antioxidação, bem como os potenciais efeitos benéficos à saúde desses compostos devem ser conhecidos. A biodisponibilidade, a forma de absorção, o metabolismo e a farmacocinética devem ser consideradas para que procedimentos *in vitro* possam ser extrapolados para situações *in vivo* (Moure *et al.*, 2001).

A atividade antioxidante pode e deve ser avaliada utilizando diferentes testes para diferentes mecanismos. Em estudos com humanos os métodos mais comumente usados são as avaliações do dano oxidativo total ao DNA, dos níveis de enzimas antioxidantes, dos níveis de antioxidantes de baixo peso molecular e vitaminas, do dano oxidativo aos lipídios e dos danos às proteínas. Os métodos químicos, por sua vez, são baseados na habilidade de neutralizar diferentes radicais livres, na absorção UV e na atividade quelante (Moure *et al.*, 2001).

Diferentes radicais podem ser utilizados nos testes medindo atividade antioxidante, como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), radical óxido nítrico ( $\cdot NO$ ), radicais alquil peroxil, ABTS<sup>+</sup> (radical cátion de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e DPPH (radical  $\alpha,\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picril-hidrazil) (Aruoma *et al.*, 1997). Ainda, podem ser realizadas análises medindo a ação protetora das substâncias na oxidação lipídica de óleos vegetais e óleos de peixe como substratos (Wanasundara e Shahidi, 1998; Moure *et al.*, 2001). Outra alternativa é a avaliação usando íons metálicos comuns, como o  $Fe^{3+}$ , que podem ser reduzidos pelos antioxidantes para íons  $Fe^{2+}$ , o que faz com que o antioxidante se comporte como um pró-oxidante. Ainda, pode ser determinada a atividade quelante desses íons metálicos pelos compostos (Hudson e Lewis, 1983b).

A composição química de tortas provenientes da extração de óleo ou farinhas desengorduradas foi estudada por diferentes autores, entretanto foram encontrados poucos estudos comparativos envolvendo as nozes e sementes estudadas neste trabalho. Ainda, a maioria dos trabalhos tem como matéria-prima farinhas desengorduradas em escala de laboratório, utilizando solventes, e não tortas provenientes diretamente da indústria de óleo.

## 2.4 Gergelim

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é uma espécie de oleaginosa, pertencente à família pedaliácea, sendo que o seu principal produto são suas sementes que apresentam tamanho reduzido, forma achatada e coloração variando do branco ao preto. A semente de gergelim é um cultivo mundialmente difundido devido ao seu alto teor de gorduras, sendo a nona oleaginosa mais cultivada mundialmente (Namiki, 1995; Beltrão *et al.*, 2001).

O gergelim é considerado um alimento bastante rico em nutrientes por apresentar alto teor de óleo, variando entre 46 e 56 %, que apresenta excelente qualidade nutricional, medicinal e cosmética. O óleo de gergelim é rico em ácidos graxos insaturados, como oleico e o linoleico, e apresenta vários constituintes secundários que são de grande importância na definição de suas propriedades químicas, como o sesamol, a sesamina e a sesamolina. Esses compostos possuem propriedades antioxidantes que conferem ao óleo elevada estabilidade química, evitando a rancificação e conferindo ao óleo de gergelim maior resistência à oxidação se comparado a outros óleos de origem vegetal (Beltrão *et al.*, 1994; Firmino, 1996). A produção desse óleo é a principal razão do cultivo do gergelim. A Figura 2.3 apresenta um fluxograma típico do seu beneficiamento, envolvendo a produção de óleo, torta e farinha dessa semente oleaginosa.

A torta de gergelim é um subproduto da indústria do óleo que pode ser recuperada e utilizada como um produto de alto valor agregado; entretanto, em diversos países produtores dessa semente, esse subproduto é, em geral, descartado ou usado como ração animal. Estudos recentes revelam que uma quantidade significativa de antioxidantes está presente na torta de gergelim. Sendo assim, esse produto está sendo subaproveitado, fato este, já ressaltado por diferentes autores (Suja *et al.*, 2004a; Suja *et al.*, 2005; Mohdaly *et al.*, 2010; Reshma *et al.*, 2010; Mohdaly *et al.*, 2011). Conforme abordado no capítulo anterior, os compostos provenientes de resíduos agroindustriais podem não apenas aumentar a estabilidade de alimentos, através da prevenção de peroxidação de lipídeos, como, tanto em humanos quanto em animais, proteger biomoléculas e estruturas supramoleculares (como membranas e ribossomos) do dano oxidativo (Mohdaly *et al.*, 2011).

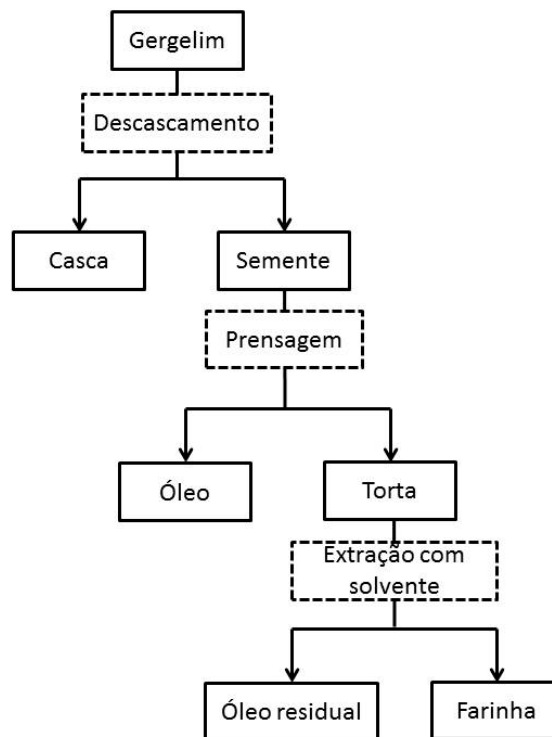


Figura 2.3 – Fluxograma do beneficiamento do gergelim.

#### 2.4.1 Composição, cultivo e aspectos econômicos

A composição química do gergelim é apresentada na Tabela 2.1. Estudos reportam que a porcentagem de óleo dessa semente está, geralmente, em torno de 45 a 50 % de seu peso e a porcentagem de proteína é de, aproximadamente 20 % (Shyu e Hwang, 2002; Reshma *et al.*, 2010). Segundo Ramachandran *et al.* (2007), a torta de gergelim, obtida pela prensagem das sementes, possui teores de proteína, fibra, cinzas e matéria seca próximos a 35 %, 7,6 %, 12 % e 83 %, respectivamente. Entretanto, conforme discutido por Beltrão *et al.* (2001), essa composição pode variar com a matéria prima podendo apresentar teores de proteína de 45 a 61 %.

O gergelim é originário da África, sendo que neste continente é encontrada a maioria das espécies silvestres do gênero *Sesamum*; na Ásia, por sua vez, é encontrada a maioria das espécies cultivadas. No Brasil, essa semente foi introduzida pelos portugueses no século XVI e é plantada, tradicionalmente, na Região Nordeste para consumo local. Atualmente, o gergelim vem sendo explorado comercialmente no Centro-Oeste e Sudeste, especialmente no

Estado de São Paulo, para atender o segmento agroindustrial de óleos e de alimentos *in natura* (Araújo *et al.*, 2006).

A cultura do gergelim apresenta excelente potencial econômico, agrônômico e social graças às suas características de tolerância à seca, facilidade de manejo e à obtenção de sementes com teores de óleo superior a 50%, com elevada estabilidade química (Araújo *et al.*, 2006). Além disso, o cultivo do gergelim apresenta grande potencial econômico, devido às propriedades de exploração, nos mercados nacional e internacional. As sementes de gergelim podem ser consumidas *in natura*, mas, conforme já mencionado, o óleo é a principal razão de seu cultivo, podendo ser usado nas indústrias, alimentar, química e farmacêutica (Beltrão *et al.*, 2001). Essa cultura se adapta às condições do semiárido de diversas partes do mundo, sendo uma opção de cultivo para o Semiárido Nordeste, podendo gerar renda e servir como fonte proteica, no consumo direto e no enriquecimento de produtos (Beltrão *et al.*, 1994).

A produção mundial de gergelim em 2011 foi de 4,092 milhões de toneladas, com uma área plantada de 6,628 milhões de hectares. As principais regiões produtoras dessa semente são a Ásia e a África com aproximadamente 67 % e 29 % da produção mundial, respectivamente. Entre os países produtores, se destacam a China, a Índia e Mianmar (FAO, 2010; 2011), no entanto, nenhum desses países se destaca como exportador desse produto, sendo a maior parte da produção de torta direcionada para consumo interno (Beltrão *et al.*, 2001). Estima-se que a produção mundial de torta de gergelim seja bastante alta, considerando que 70 % da produção da semente seja direcionada à obtenção de óleo (Namiki, 1995).

O Brasil caracteriza-se como um pequeno produtor de gergelim, tendo chegado, em 2005, a uma produção de 16 mil toneladas em uma área de 25 mil hectares (FAO, 2011). Entretanto, a importância econômica do gergelim tem crescido à medida que estão sendo descobertas novas fontes de aproveitamento do grão e de seus subprodutos. O Brasil passou a importar gergelim para atender ao crescente mercado. Os maiores produtores dessa semente no Brasil são os Estados de Goiás e Mato Grosso, além do Triângulo Mineiro e do Nordeste (Beltrão *et al.*, 2001). Devido aos seus atributos qualitativos, o gergelim vem firmando sua tendência de expansão no mercado brasileiro e sendo cada vez mais utilizado. Como o gergelim é um produto agrícola perfeitamente adaptável aos solos e clima quente brasileiro, a sua produção deve ser estimulada para aumento do consumo interno e da possibilidade de exportação da semente e de seus derivados para países ricos e de clima frio, não apropriados para o seu cultivo (Beltrão *et al.*, 2001).

### 2.4.2 Óleo

A semente do gergelim é bastante rica em óleo, dependendo da variedade da semente o teor de óleo varia entre 28 e 59 %. Sendo esse óleo considerado de alta qualidade e alto valor econômico. De acordo com o estudo de Reshma *et al.* (2010), o perfil lipídico do óleo de gergelim é composto por triglicerídeos (86 %), ácidos graxos livres (5,1 %), diglicerídeos (6 %), monoglicerídeos (1,5 %) e lipídios polares (2,6 %).

Os ácidos graxos são um dos índices do valor nutricional e da estabilidade oxidativa dos óleos e, por isso, os óleos podem ser classificados de acordo com os ácidos graxos nele encontrados. A lista de ácidos graxos é bastante extensa, passando de 1000 compostos, entretanto, o interesse comercial é limitado a aproximadamente vinte. Os três ácidos graxos dominantes no reino vegetal são palmítico, linoleico e oleico, sendo que a porcentagem de cada uma pode variar com o cultivar. O óleo de gergelim pertence ao grupo dos ácidos oleicos e linoleicos e, esses ácidos graxos constituem 80 % do total de ácidos graxos dessa semente. O óleo de gergelim tem menos de 20 % de ácidos graxos saturados, entre os quais destacam-se os ácidos palmítico e esteárico (Gunstone, 2005; Hwang, 2005).

Em relação à matéria insaponificável, o óleo obtido do gergelim é bastante rico se comparado a outros óleos vegetais. A matéria insaponificável inclui esteróis, triterpenos, álcoois triterpenos, tocoferóis e lignanas. Os fitosteróis são compostos de interesse do ponto de vista nutricional porque tem estrutura similar a do colesterol; fitosteróis são, portanto, competidores da absorção do colesterol. O consumo de fitosteróis pode diminuir o colesterol no sangue e proteger contra doenças cardiovasculares (Miettinen *et al.*, 1995) e inibir o crescimento de tumores (Ifere *et al.*, 2009; Llaverias *et al.*, 2013). O teor total de tocoferóis do óleo de gergelim varia de 330 a 1010 mg/kg de acordo com o Codex.  $\gamma$ -tocoferol é o tocoferol predominante no óleo de gergelim, enquanto o  $\delta$ -tocoferol representa menos de 5 % do total e o  $\alpha$ -tocoferol está presente em quantidades muito pequenas (Hwang, 2005). Esses compostos são importantes pois são uma das ocorrências da vitamina E, juntamente com os tocotrienóis (Dietrich *et al.*, 2006), possuem efeitos antiproliferativos em células cancerígenas (Gysin *et al.*, 2002) e atividade antiinflamatória (Jiang e Ames, 2003), entre outros efeitos.

As principais lignanas do óleo de gergelim são a sesamina (0,5 - 1,1 %) e a sesamolina (0,3 - 0,6 %), sendo que sua concentração representa 10 % da matéria insaponificável do óleo de gergelim. Esses componentes minoritários presentes no óleo também devem ser levados

em consideração pois conferem alta estabilidade oxidativa ao óleo, além de efeitos fisiológicos benéficos. O óleo de gergelim pode ser adicionado a outros óleos para aumentar sua estabilidade e permitir seu uso em frituras (Gunstone, 2005; Hemalatha e Ghafoorunissa, 2007). É importante ressaltar que a composição do óleo de gergelim em relação aos teores de esteróis, tocoferóis e lignanas pode variar de acordo com a espécie (Kamal-Eldin e Appelqvist, 1994).

Os compostos fenólicos presentes na semente de gergelim e no seu óleo serão abordados em detalhe na seção 2.4.4.

### **2.4.3 Proteínas**

As proteínas vegetais têm papel importante na alimentação humana, principalmente em países em desenvolvimento onde o consumo médio de proteínas está abaixo do recomendado. Devido a complicações no provimento de proteína animal, existe uma constante busca para novas fontes de proteína para uso como ingrediente e suplemento nutricional. O desenvolvimento de um concentrado ou isolado proteico com a proteína do gergelim pode prover à indústria uma nova possibilidade (Onweluzo *et al.*, 1994).

O teor de proteína da semente de gergelim é de aproximadamente 25 %, podendo variar entre 17 e 31 %, dependendo da semente. Dessa forma, a farinha desengordurada de gergelim contém em torno de 50 % de proteína, podendo chegar a 60 % (Achouri *et al.*, 2012). As proteínas presentes no gergelim são principalmente globulinas (67,3 %), albuminas (8,6 %), prolaminas (1,4 %) e gluteninas (6,9 %) (Rivas *et al.*, 1981). Dentre as globulinas, a  $\alpha$ -globulina é a principal e já foi extensivamente estudada (Lakshmi e Nandi, 1977; Prakash e Nandi, 1977; Lakshmi e Nandi, 1978).

Quanto aos aminoácidos, a semente de gergelim tem baixo teor de lisina e treonina, mas é rica em metionina e cisteína que, frequentemente, são aminoácidos limitantes em vegetais. Ainda, a semente de gergelim tem uma boa quantidade de triptofano, que é um aminoácido limitante em sementes oleaginosas. Pelo seu perfil de aminoácidos característico, as proteínas da semente de gergelim são uma excelente fonte proteica para ser utilizada como suplementação de diversas proteínas vegetais. Esse perfil de aminoácidos complementa o perfil da soja, o que pode ser bastante importante no aproveitamento da torta de gergelim. As

proteínas do gergelim têm sido avaliadas em complementação proteica com soja, farinha de milho, feijão, amendoim e inhame para aumentar seu valor nutricional (Beltrão *et al.*, 2001; Hwang, 2005; Ramachandran *et al.*, 2007).

As proteínas do gergelim têm diferentes aplicações; elas podem ser utilizadas diretamente da torta de gergelim (após a extração de óleo) ou podem ser produzidos concentrados e isolados proteicos (Rivas *et al.*, 1981; Taha *et al.*, 1987). Os concentrados e isolados proteicos de gergelim têm propriedades funcionais bem parecidas com as da proteína de soja e, por isso, suas possibilidades de aplicação são inúmeras (Kanu *et al.*, 2007a).

El-Adawy (1997) estudou a inclusão das proteínas de gergelim em misturas de farinha de trigo e o estudo mostrou que a adição das proteínas pode ser realizada até 16 %, melhorando parâmetros de qualidade da mistura sem afetar as propriedades sensoriais do pão. Inyang e Nwadinikpa (1992) avaliaram a funcionalidade das proteínas de gergelim descascado e mostraram a boa solubilidade dessas proteínas, variando de 7,9 %, quando usado pH 2, a 14,2 %, quando usado pH 10. A farinha de gergelim (contendo as proteínas) pode adicionar características satisfatórias quando incorporada em produtos como sorvete, sobremesas, salsichas, produtos de padaria e doces. Além dessas aplicações, López *et al.* (2003) avaliaram o uso de um isolado proteico de gergelim em um suplemento nutricional em bebidas e realizaram uma comparação com isolado de soja. O estudo demonstrou que as propriedades de emulsificação foram melhores que as do isolado de soja e o produto com gergelim foi preferido sensorialmente.

#### **2.4.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante**

O gergelim é rico em antioxidantes, possuindo alto teor de compostos fenólicos, fitatos, lignanas e tocoferóis (Chen *et al.*, 2005). Esses antioxidantes podem ter diversas aplicações, tanto tecnológicas quanto nutracêuticas; a importância do uso de antioxidantes naturais e algumas de suas possíveis aplicações já foram abordadas no capítulo anterior. Existem crescentes evidências que os antioxidantes fenólicos e outros fitonutrientes presentes em oleaginosas e em outros vegetais são importantes para a redução da incidência de doenças crônicas em populações com ingestão regular desses alimentos (Valtueña *et al.*, 2008). Os potenciais efeitos benéficos do gergelim na saúde foram demonstrados em diversos estudos. São atribuídos aos compostos fenólicos dessa semente efeitos antioxidante (Shyu e Hwang,



2002; Shahidi *et al.*, 2006), anti-hipertensivo (Sankar *et al.*, 2005), anticancêr (Miyahara *et al.*, 2001), hipocolesterolêmico (Kang *et al.*, 1999) e imunoregulador (Nonaka *et al.*, 1997) entre outros.

O interesse nessa semente se dá devido à presença de lignanas fisiologicamente ativas; as lignanas e seus glicosídeos são importantes componentes funcionais dessa semente (Kamal-Eldin e Appelqvist, 1994). Estudos envolvendo esses compostos têm sido realizados há bastante tempo (Haslam e Haworth, 1955; Namiki, 1995). Os antioxidantes do gergelim encontram-se principalmente na fração insaponificável do óleo, sendo as principais lignanas solúveis em óleo a sesamina e a sesamolina. Apesar da pequena atividade antioxidante, a sesamolina é precursora de dois antioxidantes bastante potentes, o sesamol e o sesaminol (Fukuda *et al.*, 1985; Kamal-Eldin e Appelqvist, 1994; Namiki, 1995).

De acordo com Fukuda *et al.* (1985), a semente de gergelim apresenta traços de sesamol e quantidades maiores de sesamolina, entre 200 e 600 mg/100 g, e de sesamina, entre 500 e 1000 mg/100 g. Entretanto, teores inferiores de sesamolina (35 mg/100 g) foram encontrados em algumas variedades provenientes da Índia e teores superiores de sesamina foram observados em variedades de Bornéu (Namiki, 1995). Além disso, podem ser encontrados outros antioxidantes como bisepoxilignana e ácido transferúlico (Fukuda *et al.*, 1985). Conforme estudo de Yoshida e Takagi (1997), o teor de sesamina é maior para semente branca, enquanto o de sesamolina é maior para a semente com coloração marrom.

Estudos mais recentes, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ou, em inglês, *high performance liquid chromatography* (HPLC), encontraram teores de sesamina entre 670 e 6350 mg/100g, quando foram avaliados diferentes genótipos de gergelim (Williamson *et al.*, 2008). Hemalatha e Ghafoorunissa (2004) dividiram as sementes e o óleo de gergelim de acordo com o seu teor de lignanas (sesamina e sesamolina) da seguinte forma: baixo teor de lignanas < 1000 mg/100 g, médio 1000-2000 mg/100 g e alto > 2000 mg/100 g. Vale ressaltar que é observada uma grande variação desses componentes com as variedades e local de cultivo, sendo sempre necessário monitorar o teor desses antioxidantes naturais (Beltrão *et al.*, 2001).

Posteriormente, foi descoberta a presença de altos teores de glicosídeos de lignanas no gergelim. Os glicosídeos das lignanas existem, principalmente, na torta de gergelim desengordurada, sendo que estes são antioxidantes hidrofílicos. Entre os glicosídeos se

destacam os de sesaminol, pinoresinol e sesamolol (Kang *et al.*, 1999; Shyu e Hwang, 2002), sendo o principal o sesaminol triglicosídeo (Moazzami *et al.*, 2006a, 2006b). O teor total de lignanas nativas presente no gergelim faz com que esse produto possa ser considerado uma fonte de lignanas tão rica quanto a semente de linhaça, que é geralmente reconhecida como a fonte mais rica de lignanas (Eliasson *et al.*, 2003).

Devido à presença desses glicosídeos, diversos estudos têm sido realizados utilizando subprodutos do gergelim como a casca da semente e a torta, ou farinha desengordurada, que é obtida após a extração do óleo. A análise de glicosídeos realizada utilizando o extrato proveniente da torta de gergelim apresentou teores de sesaminol di e triglicosídeo de 353 e 7200 mg/100 g, respectivamente (Shyu e Hwang, 2002). O estudo de Shyu e Hwang (2002) aponta o extrato da torta desengordurada de gergelim como uma boa fonte de glicosídeos de lignanas, principalmente de sesaminol triglicosídeo. Os resultados obtidos por Suja *et al.* (2005) demonstraram a presença de sesamol, sesamina, sesamolina e dos glicosídeos de sesaminol no extrato da torta desengordurada, o que difere da pesquisa de Shyu e Hwang (2002). Os autores acreditam que as etapas de purificação, extração da gordura e lavagem com água, tenham removido açúcares e proteína solúveis e aumentado o teor de antioxidantes bem como melhorado a dispersabilidade do extrato final. As análises de atividade antioxidante revelaram alto teor de atividade antioxidante, comparável ao BHT (Butil Hidroxi Tolueno).

Por definição, lignanas são dímeros de unidades de fenilpropanoides ( $C_6 - C_3$ ) ligadas pelos carbonos centrais de suas cadeias laterais. São encontrados quatro grupos principais de lignanas lineares: lignanas, lignolidas, monoepoxilignanas e biepoxilignanas. Esses compostos estão covalentemente ligados à celulose na parede das células (Shahidi e Nacz, 2004). A composição de lignanas varia grandemente entre diferentes plantas, sendo que no gergelim são encontrados lignofenóis e carboxifenóis (Fukuda *et al.*, 1985; Fukuda *et al.*, 1986; Shahidi *et al.*, 1997). As principais lignanas da semente de gergelim são a sesamina e a sesamolina, mas também são encontrados sesamolol e sesaminol, além de glicosídeos dessas lignanas (Shahidi e Nacz, 2004). As estruturas de alguns desses compostos são apresentados na Figura 2.4.

As lignanas do gergelim têm demonstrado efeitos fisiológicos benéficos no tratamento e prevenção de diferentes doenças, sendo considerados compostos bioativos dessa semente (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Estudos realizados utilizando a torta ou a farinha desengordurada

de gergelim demonstraram que esse produto pode reduzir a suscetibilidade ao stress oxidativo (Kang *et al.*, 1999), prevenir a obesidade e a hiperglicemia (Bigoniya *et al.*, 2012), atuar no controle glicêmico (Figueiredo e Modesto-Filho, 2008), reduzir os níveis de colesterol (Visavadiya e Narasimhacharya, 2008), entre outros efeitos. Além disso, o extrato contendo os compostos fenólicos da torta apresenta propriedades antimutagênicas (Lazarou *et al.*, 2007) e de proteção ao trato gastrointestinal (Hsu *et al.*, 2011).

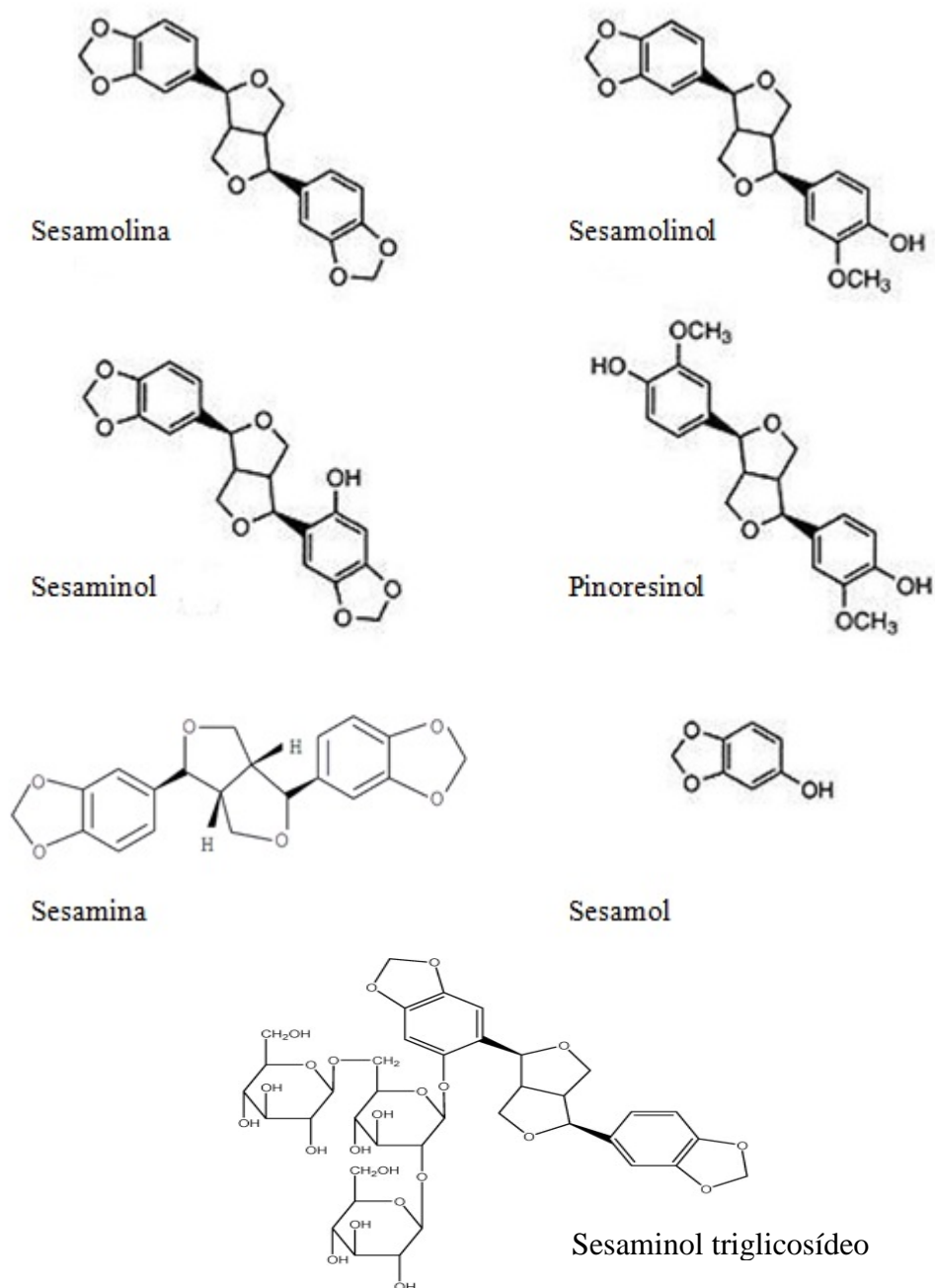


Figura 2.4 – Estrutura de algumas lignanas encontradas no gergelim. Fonte: Shahidi e Naczk (2004), Calle Álvarez (2007), Liao *et al.* (2010a).

Estudos envolvendo os compostos sesamina, sesamolina e sesamol, demonstraram um efeito dessas substâncias na redução da hipertensão e da hipercolesterolemia (Sugano *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2008), efeitos neuroprotetores na prevenção da isquemia cerebral (Chen *et al.*, 2005), efeitos protetores à mucosa gástrica (Hsu *et al.*, 2009) e atividade antiproliferativa (Yokota *et al.*, 2007). Estudos recentes têm avaliado o efeito do sesaminol triglicosídeo, principal lignana da torta de gergelim, e de seus metabolitos na saúde (Jan *et al.*, 2009b, 2009a; Jan *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2010b).

## **2.5 Processos tradicionais de extração**

### ***2.5.1 Extração sólido-líquido convencional de compostos fenólicos e proteínas***

A extração e purificação de antioxidantes provenientes de fontes naturais é bastante interessante, pois essas substâncias são frequentemente usadas em alimentos funcionais, aditivos para a indústria alimentícia e na produção de nutracêuticos, fármacos e cosméticos (Shahidi e Naczk, 2004). O crescente interesse atual por esses produtos torna a produção e purificação de extratos vegetais uma área de grande importância, tanto para a indústria, quanto para a pesquisa acadêmica. A composição de fenólicos das fontes naturais é bastante diversa, assim como a estrutura e as propriedades químicas desses compostos. Uma vez que não é possível a obtenção de um protocolo universal para extração, devem ser elaborados e otimizados processos específicos para cada classe de compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2007). A técnica clássica de extração de compostos nutracêuticos de vegetais utilizando solventes se baseia na utilização de um solvente juntamente com a aplicação de calor e/ou agitação (Wang e Weller, 2006). Essa técnica está referida neste trabalho como extração convencional.

A extração sólido-líquido pode ser definida como uma operação básica para separar um ou mais componentes contidos em uma fase sólida através da utilização de uma fase líquida ou solvente. Os compostos transferidos do sólido para o líquido são chamados de solutos e os sólidos insolúveis de inertes (Ibarz e Barbosa-Cánovas, 2002). Esse processo é realizado através da mistura do alimento com o solvente, tanto em um único estágio, quanto em estágios múltiplos, por um tempo predeterminado. Posteriormente, o solvente é separado e recuperado (Fellows, 2006).

Durante o processo de extração, a concentração de cada composto presente no tecido vegetal atinge o equilíbrio termodinâmico com a concentração do componente que se encontra dissolvido no solvente. O equilíbrio é descrito pela constante de distribuição de equilíbrio ou coeficiente de partição. Esse coeficiente é uma função da concentração no equilíbrio do extrato e do resíduo sólido. Quanto maior o valor dessa constante, maior a afinidade entre o solvente e o componente a ser extraído e, portanto, uma maior quantidade do componente irá se dissolver no solvente. O coeficiente de partição é função das características do solvente e do soluto e da temperatura (Cacace e Mazza, 2003a).

Na extração de compostos a partir de um material vegetal em pó utilizando um solvente, inicialmente ocorre a etapa de inchaço, que consiste na sorção do solvente pela fase sólida. Essa sorção é causada por forças osmóticas, capilaridade e solvatação dos íons na matriz sólida. Uma parte do soluto presente na parte danificada do vegetal é extraída por lixiviação. Pode ocorrer ainda a solubilização por hidrólise de compostos inicialmente insolúveis. Após a etapa de inchaço, ocorre um fenômeno difusivo, inicialmente dentro do material vegetal e, posteriormente, na camada externa que o envolve (Escribano-Bailon e Santos-Buelga, 2003 apud Silva *et al.*, 2007).

Quando compostos fenólicos são extraídos de plantas, a extração tem como objetivo liberar esses compostos das estruturas vacuolares onde eles estão presentes pela ruptura do tecido vegetal ou pelo processo de difusão (Cacace e Mazza, 2003a). Alguns fenólicos, entretanto, apresentam-se ligados a proteínas e sacarídeos insolúveis, dificultando o processo de extração (Ghirardello *et al.*, 2010). A solubilidade dos compostos fenólicos é governada pelo tipo de solvente usado (polaridade), pelo grau de polimerização dos compostos, pela sua interação com outros constituintes do alimento e pela formação de complexos insolúveis. Além dessas, outras variáveis influenciam no processo de extração. A seguir serão abordados alguns parâmetros do processo de extração.

### *Solvente*

O rendimento do processo de extração depende fortemente do solvente utilizado devido à polaridade dos compostos a serem extraídos; por isso, a seleção de um solvente ótimo é de extrema importância (Fellows, 2006). A escolha do solvente adequado deve permitir a completa extração dos compostos desejados e minimizar a oxidação, degradação ou

polimerização dos produtos. Água, etanol, metanol e acetona, assim como suas misturas aquosas, são os solventes mais utilizados nos processos de extração de polifenóis (Moure *et al.*, 2001; Al-Farsi e Lee, 2008). Quando adicionados em alimentos, extratos aquosos são mais vantajosos em relação ao baixo custo, à segurança e à posterior certificação dos produtos (Moller *et al.*, 1999).

O etanol é comumente usado na extração de compostos fenólicos, especialmente nos casos em que existe a possibilidade de uma posterior aplicação do extrato obtido em alimentos ou fármacos. Mudanças na concentração de etanol em relação à água mudam propriedades físicas do solvente, como densidade, viscosidade dinâmica e constante dielétrica (Cacace e Mazza, 2003b). Por exemplo, o aumento da concentração de etanol na mistura resulta em uma redução na constante dielétrica da solução. Conseqüentemente, ocorre uma redução na energia necessária para separar as moléculas do solvente, permitindo que as moléculas do soluto penetrem entre elas (Cacace e Mazza, 2002, 2003a).

Os resultados encontrados na literatura variam consideravelmente em relação à concentração de solvente e água mais adequada para extração de compostos fenólicos. Liyana-Pathirana e Shahidi (2005) avaliaram diferentes solventes em diferentes concentrações e obtiveram as maiores atividades antioxidantes em extratos provenientes de trigo usando etanol e água e em concentrações de etanol entre 50 e 60 %. A porcentagem de 50 % também foi observada por Prasad *et al.* (2011b) como ideal para extração de fenólicos totais de resíduos de manga. Assim como demonstrado por Liyana-Pathirana e Shahidi (2005), o estudo de Weisz *et al.* (2009) também concluiu que a mistura de etanol com água foi melhor que as misturas de metanol e de acetona com água para extração de fenólicos do girassol. O trabalho de Matthäus (2002) com oleaginosas demonstrou que o teor de fenólicos extraídos é maior quando água é utilizada como solvente, se comparada à acetona, ao metanol e ao acetato de etila. Entretanto, para Ghirardello *et al.* (2010), acetona se mostrou como o melhor solvente na extração de fenólicos da avelã.

Outro parâmetro que deve ser considerado é a adição de ácidos ou bases no solvente de extração, alterando o seu pH. A adição de HCl não demonstrou efeito significativo na extração de fenólicos de frutas (Pompeu *et al.*, 2009). Entretanto, dependendo da matéria prima utilizada, a acidificação da solução extratora pode ser necessária para a ruptura da parede celular. Para Tabart *et al.* (2007) pH igual a 3 foi melhor, se comparado a valores maiores de pH, para extração de fenólicos de *black currant*, entretanto, Rodrigues *et al.*

(2008) encontraram melhor eficiência na extração de fenólicos de casca de coco ao utilizar pH de 6,5. De acordo com Ho *et al.* (2007), na extração de lignanas de linhaça, o uso de uma solução alcalina (pH 9,0) se mostrou mais eficiente se comparada com a solução ácida (pH 4,0), acarretando em um aumento de 20 a 25 % no rendimento da extração.

### *Temperatura de extração*

Temperaturas mais altas geralmente aumentam as taxas de difusão e de dissolução do soluto no solvente. Em geral, a temperatura de extração é limitada em 100 °C por razões econômicas ou por danos aos compostos do alimento (Fellows, 2006). Geralmente, é observado na literatura um melhor rendimento da extração com o aumento da temperatura (Liyana-Pathirana e Shahidi, 2005; Silva *et al.*, 2011). Esse comportamento é descrito pela equação de Stokes-Einstein:

$$D \propto T/\eta \quad (2.1)$$

onde  $D$  é a difusividade mássica ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta (K) e  $\eta$  é a viscosidade dinâmica da solução (Pa.s), também conhecida por alguns autores como coeficiente de difusividade dinâmica. Portanto, o aumento na eficiência que ocorre com a temperatura é atribuído a modificações na difusividade mássica devido à difusão dos compostos e ao aumento da sua solubilidade; um aumento na difusividade mássica aumenta a taxa na qual a difusão ocorre, levando a uma redução no tempo de extração (Cacace e Mazza, 2002, 2003a). Altas temperaturas também podem ser utilizadas para liberar compostos que estão ligados; por exemplo, o estudo de Jeong *et al.* (2004), utilizando cascas de frutas cítricas, demonstrou que o tratamento térmico a 150 °C por 40 min liberou fenólicos que estavam ligados, quase triplicando o teor total de fenólicos após o tratamento.

Em alguns casos, acima de determinada temperatura, o rendimento do processo começa a diminuir; esse comportamento é, normalmente, associado à degradação dos compostos extraídos (Pompeu *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2011b). Todavia, essa diminuição na eficiência da extração pode estar relacionada à desnaturação das membranas celulares que ocorre em temperaturas entre 55 e 75 °C, afetando o processo de extração. Por esse motivo, a temperatura não pode ser aumentada indefinidamente e deve ser definida uma temperatura ótima de processamento (Cacace e Mazza, 2003a).

### *Outros parâmetros*

Além da temperatura e do solvente utilizado, outros parâmetros influenciam o processo de extração.

Razão solvente-sólido: essa variável é uma das que mais influencia a extração de compostos fenólicos. Um aumento no volume de solvente, para uma mesma quantidade de sólidos, aumenta o gradiente de concentração e, assim, aumenta a taxa de difusão dos compostos da fase sólida para o solvente (Cacace e Mazza, 2003b). Ainda, em um volume maior de solvente, a chance dos compostos entrarem em contato com a solução extratora aumenta (Prasad *et al.*, 2011b). Estudos demonstram que, em geral, esse parâmetro apresenta um efeito linear no rendimento da extração: quanto maior a razão solvente-sólido, mais compostos são extraídos (Al-Farsi e Lee, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2011).

Tempo: durante a extração, o tempo de contato deve ser suficiente para que o solvente dissolva quantidades suficientes de soluto e para que as mudanças na composição alcancem um equilíbrio (Fellows, 2006). Em geral, a influência do tempo é abordada através de estudos cinéticos de extração de diferentes classes de fenólicos (Hatami *et al.*, 2012; Sant'anna *et al.*, 2012).

Área superficial dos sólidos: a área superficial é diretamente proporcional à taxa de transferência de massa. Além disso, uma redução no diâmetro da partícula reduz a distância de difusão do solvente no sólido e também o caminho que o soluto tem que percorrer até atingir a superfície. Portanto, partículas menores podem reduzir o tempo de extração (Cacace e Mazza, 2003a). Se o sólido não tiver um diâmetro apropriado à difusão interna do solvente no soluto, esse pode ser um parâmetro limitante durante a extração (Wang e Weller, 2006). Vale ressaltar que reduções do tamanho da partícula aumentam a taxa de extração até certo limite (Fellows, 2006). Em alguns casos, o contato do solvente com partículas de diâmetro muito reduzido pode bloquear os poros e dificultar a penetração do solvente (Ibarz e Barbosa-Cánovas, 2002).

Viscosidade e taxa de escoamento do solvente: a viscosidade do solvente deve ser baixa suficiente para que o solvente penetre facilmente no leito de partículas sólidas. Taxas de escoamento mais altas reduzem a camada limite de soluto concentrado na superfície das partículas aumentando a taxa de extração (Fellows, 2006).



Estudos avaliando a influência de diferentes variáveis com o intuito de otimizar a extração de lignanas são escassos. Zhang *et al.* (2007) e Ho *et al.* (2007) avaliaram as melhores condições para extração de lignanas provenientes da semente de linhaça. Apesar do crescente número de estudos envolvendo os benefícios à saúde da torta de gergelim (citados na seção 2.4), até o momento, apenas no trabalho de Moazzami *et al.* (2006b) foram avaliadas diferentes condições de processo com o intuito de aperfeiçoar a extração de lignanas provenientes desse resíduo.

Os processos de elaboração de produtos ricos em proteínas têm sido estudados há bastante tempo. A obtenção de isolados e concentrados proteicos apresenta um grande potencial, pois estes podem ser usados na nutrição humana e como ingredientes na indústria de alimentos. A denominação concentrado e isolado é designada para os extratos proteicos contendo pelo menos 65 e 90 % de proteína em base seca, respectivamente (Moure *et al.*, 2006). Dependendo do objetivo a forma de obtenção do extrato proteico a partir das sementes oleaginosas ou das suas tortas pode variar.

Concentrados proteicos são, geralmente, obtidos através da aplicação de técnicas que envolvem, em um primeiro estágio, a extração do material não proteico das tortas, essencialmente carboidratos, dessa forma aumentando a concentração de proteínas do produto final. Nesse caso o concentrado é composto basicamente por proteínas e fibras. Isolados proteicos são obtidos através da solubilização das proteínas em uma solução adequada (extração sólido-líquido) e posterior concentração usando ultrafiltração ou, ainda, precipitação em um meio com pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas solubilizadas (Rodrigues *et al.*, 2012). Quando realizado um processo de extração sólido-líquido as mesmas variáveis já mencionadas para a extração de compostos fenólicos (tempo, temperatura, razão solvente-sólido, entre outras) também afetam a extração de proteínas. Entretanto, outras duas variáveis afetam de forma bastante significativa a extração de proteínas: a força iônica do meio (adição de sal) e o pH da solução extratora.

Em relação ao gergelim estuda-se frequentemente a eficiência da adição de um sal no solvente e a influência da aplicação de diferentes faixas de pH. A adição de um sal é realizada pois os íons do sal se ligam com frações da proteína do gergelim, sendo geralmente usado o cloreto de sódio. A adição de sal, entretanto, deve ser avaliada em cada caso, pois seu uso afeta o tipo de proteínas extraídas (Escamilla-Silva *et al.*, 2003; Achouri *et al.*, 2012). O calor também afeta a extração das proteínas e estudos mostram que a  $\alpha$ -globulina, principal proteína

do gergelim, quando submetida ao calor (acima de 50 °C), sofre dissociação, desnaturação e agregação, formando um precipitado irreversível na etapa de resfriamento (Lakshmi e Nandi, 1979; Achouri *et al.*, 2012). Alguns estudos realizados avaliando os parâmetros de extração da proteína do gergelim são apresentados a seguir.

O estudo de Prakash (1986) avaliou a adição de cloreto de sódio e variações de pH na extração de proteína do gergelim e demonstrou que um aumento na concentração de sal, aumentou a eficiência da extração e que essa eficiência diminuiu em faixas de pH baixo. De acordo com Rivas *et al.* (1981), o uso de pHs acima de 4 aumenta a eficiência da extração, sendo o pH 11 o que demonstrou melhores resultados. Ainda, esse estudo demonstrou que a precipitação das proteínas ocorreu em pH 4. Quando comparadas a farinha desengordurada e a torta de gergelim, a extração de proteínas é mais eficaz quando utilizada a farinha desengordurada (Rivas *et al.*, 1981). Achouri *et al.* (2012) também utilizou diferentes concentrações de cloreto de sódio e faixas de pH para otimizar a extração de proteínas. Esse estudo demonstrou que a melhor faixa de pH para extração de proteínas do gergelim está entre 7 e 10 e que o pH somente apresentou influência na presença do sal, e não em extratos aquosos.

Um estudo aprofundado de algumas variáveis de processo da extração de proteínas do gergelim foi realizado por Kanu *et al.* (2007a) e Kanu *et al.* (2007b). Os autores observaram que o ponto isoelétrico da proteína está em uma faixa de pH entre 4 e 5, o que explica a menor eficiência da extração nesses valores de pH. Para esses autores, o pH ótimo de extração encontrado também ficou em faixas mais altas de pH, entre 11 e 13. Os autores avaliaram também o efeito da temperatura, a eficiência da extração aumentou entre 20 e 40 °C, entretanto, em temperaturas acima desse valor houve um decréscimo da quantidade de proteína extraída. O aumento da eficiência da extração com o aumento da temperatura (até 40 °C) se deve a um aumento da solubilidade e a queda da eficiência da extração em temperaturas mais altas se deve ao processo de desnaturação. Em temperaturas mais altas ligações iônicas se formam dentro da molécula de proteína e entre proteínas (De-Wit e Klarenbeek, 1984). De acordo com Kanu *et al.* (2007b) a coagulação e a desnaturação das proteínas também determina o tempo ideal de extração; os autores observaram que após 60 min o efeito desses fenômenos diminuiu drasticamente a eficiência da extração.

Cabe ressaltar que a biodisponibilidade das proteínas e dos compostos fenólicos está relacionada à forma como esses compostos interagem (Serafini *et al.*, 1996; Wollgast e

Anklam, 2000). A ligação desses compostos pode causar sabores indesejados (adstringente) e precipitação das proteínas (Baxter *et al.*, 1997). Os polifenóis também podem interagir de forma irreversível com as proteínas e as enzimas digestivas no intestino, dificultando sua absorção (Brunet *et al.*, 2002). Os processos de extração de compostos fenólicos e proteínas são bastante similares e esses dois componentes são frequentemente extraídos simultaneamente. Portanto, são necessárias etapas posteriores ao processo de extração para separar esses dois compostos, devido aos fatores antinutricionais das ligações entre eles (Loginov *et al.*, 2013).

### **2.5.2 Extração convencional de óleo**

Óleos vegetais são utilizados em uma ampla gama de maneiras: na alimentação, na medicina, na indústria de cosméticos e na produção de biodiesel. Por isso, sua obtenção tem despertado grande interesse nos últimos anos (Jaeger *et al.*, 2008). A produção de óleos a partir de sementes vem crescendo continuamente nos últimos 20 anos. Para os principais óleos, entre eles o de gergelim, o aumento de produção foi de 237 % entre 1979 e 1999 e de 150 % entre os anos de 1999 e 2007 (FAO, 2010).

Em geral, a extração de óleo pode ser realizada de duas formas: prensagem e extração com solvente. Pré-tratamentos mecânicos e térmicos podem anteceder esses processos e contribuir para melhorar suas eficiências, sendo assim a prensa pode ser alimentada com as sementes cruas ou pré-tratadas. A prensagem industrial de sementes é realizada normalmente utilizando uma prensa de rosca, entretanto, pode também ser utilizada a prensa hidráulica (Savoire *et al.*, 2013). Essa última é mais empregada em escala laboratorial e sua principal diferença é a ausência de cisalhamento, o que simplifica a realização de estudos de rendimento. Portanto, em geral, são realizados estudos de rendimento de extração com a prensa hidráulica como uma etapa inicial de análise, seguida do uso da prensa de rosca em escala maior (Gros *et al.*, 2003).

A etapa de prensagem provê um óleo de alta qualidade, entretanto seu rendimento máximo é em torno de 80 % do total de óleo presente na semente (Hasenhuettl, 1991 apud Willems *et al.*, 2008). A vantagem da extração com solventes é alto rendimento desse método (acima de 99 %), porém, quando utilizada essa metodologia, ocorre uma redução na qualidade do óleo obtido. Essa redução se deve aos extensos processos de recuperação do solvente e a

extração de componentes indesejados das paredes celulares. Portanto, especialmente para óleos com alto valor agregado, sua produção é realizada basicamente de forma mecânica (Willems *et al.*, 2008). Com o intuito de aumentar a eficiência do processo de prensagem para produção de óleo são usados alguns pré-tratamentos, como: descascamento, pré-tratamento térmico, redução de tamanho, separação granulométrica, entre outros (Savoire *et al.*, 2013). Entre esses processos, o pré-tratamento térmico, chamado de cozimento, é bastante utilizado. Ele é realizado a 100 °C e pode aumentar o rendimento da extração de 1,6 até 5 %, quando comparado ao rendimento do processo usando sementes cruas (Singh *et al.*, 2002; Pradhan *et al.*, 2011).

O modo de obtenção de óleo de gergelim pode variar dependendo do local, na Ásia ele é obtido pela prensagem de sementes torradas e consumido com seus aromas naturais sem passar pela etapa de refino. No mundo ocidental o processo convencional para a preparação do óleo de gergelim, em geral, envolve as seguintes etapas: limpeza, assamento, moagem, cozimento e prensagem. Podendo ser produzido óleo de gergelim cru, refinado ou torrado (Abou-Gharbia *et al.*, 2000; Hwang, 2005). A estabilidade oxidativa do óleo de gergelim depende do método de extração e do pré-tratamento das sementes (Kamal-Eldin e Appelqvist, 1995). Essas etapas afetam componentes de interesse do óleo, podendo acelerar os processos de rancificação e diminuir a qualidade do produto. A etapa de assamento afeta significativamente a qualidade dos óleos, o que foi demonstrado nos estudos de Yoshida e Takagi (1997) e Abou-Gharbia *et al.* (2000). O processo pode afetar o teor e/ou o perfil de fosfolipídios, tocoferóis, ácidos graxos e lignanas. As lignanas podem se degradar devido às altas temperaturas formando outros compostos. A sesamolina é um dos compostos mais sensíveis, e pode se transformar em sesamol durante o tratamento térmico, a sesamina, entretanto, é bastante estável. Além da degradação térmica, esses compostos podem também passar por mudanças químicas durante o tratamento térmico e outras etapas do processamento (Fukuda *et al.*, 1985; Fukuda *et al.*, 1986; Hwang, 2005).

A torta de gergelim obtida após a extração do óleo pode conter ainda de 18 a 22 % de óleo residual. Frequentemente a torta passa por uma segunda extração, fazendo uma nova prensagem ou usando solventes, com o intuito de se aumentar o rendimento da extração. Quando aplicado o processo de extração com solventes da torta de gergelim, obtém-se um produto de grau alimentício chamado de farinha de gergelim (Hwang, 2005).

## 2.6 Processos alternativos de extração

Os métodos convencionais de extração de compostos provenientes de matrizes vegetais (abordados na seção 2.5) envolvem desintegração mecânica e/ou o uso de fortes solventes orgânicos; a eficiência desses métodos depende do grau de permeabilização da membrana obtido com a metodologia usada. Entretanto, a química moderna busca evitar o uso de solventes perigosos e poluentes e encoraja a aplicação de solventes como a água. Com o intuito de melhorar a eficiência e reduzir custos e a utilização de solventes, diversas tecnologias já foram estudadas para serem empregadas nos processos de extração. Entre as técnicas testadas estão as de: ultrassom (Sharma e Gupta, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Dolatowski e Stasiak, 2011), extração supercrítica com aplicação de dióxido de carbono (Hu *et al.*, 2004; Corso *et al.*, 2010), micro-ondas (Cerretani *et al.*, 2009; Castro e Priego-Capote, 2011; Nemes e Orsat, 2012), enzimas (Latif e Anwar, 2011) e alta pressão (Prasad *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2011a; Joo *et al.*, 2012).

Nesta seção são abordadas as duas tecnologias alternativas de extração usadas neste trabalho: campo elétrico pulsado (CEP) e descargas elétricas de alta tensão (DEAT). Como o efeito primário dos tratamentos alternativos de CEP e DEAT nas células é a quebra da membrana celular, esses tratamentos podem ser usados como substitutos ou auxiliares das técnicas de extração convencionais (Jaeger *et al.*, 2008). Sendo assim, esses tratamentos são alternativas adequadas para atingir um rompimento não térmico da membrana celular, o que permite a ocorrência de uma difusão a frio em água dos compostos de interesse (Vorobiev e Lebovka, 2008).

### 2.6.1 Tecnologia de Campo Elétrico Pulsado (CEP)

A tecnologia de Campo Elétrico Pulsado (CEP) ou, em inglês, Pulsed Electric Field (PEF), é uma tecnologia não térmica que tem despertado um forte interesse nas pesquisas na área de Engenharia. Desde o século passado diversos esforços foram realizados com intuito de se implantar na indústria tratamentos envolvendo corrente alternada (CA), corrente contínua (CC) e campo elétrico pulsado. Inicialmente esses métodos foram utilizados nas seguintes aplicações: morte de microrganismos, pasteurização em lata, aquecimento ôhmico, entre

outros. Entretanto, um marco importante para a tecnologia de CEP foi quando, em 1949 e 1958, Flaumenbaum e Zagorulko (apud Vorobiev e Lebovka, 2011), respectivamente, reportaram a aplicação de campos elétricos com correntes alternada e contínua no tratamento de frutas e vegetais. Eles demonstraram uma aceleração do processo de extração pela quebra de membranas celulares, sendo que esse fenômeno foi chamado de eletroplasmose. Esse conceito foi amplamente estudado nos anos seguintes, sendo referido atualmente como eletroporação das membranas (fenômeno abordado anteriormente). A partir do início dos anos 90, diversas aplicações das técnicas assistidas por CEP foram testadas e foi demonstrada a aplicação dessa tecnologia para a aceleração dos processos de secagem, prensagem, difusão e extração seletiva. Desde então, foram desenvolvidos novos tipos de geradores de CEP com altas voltagens, novas câmaras de tratamento e novas plantas piloto (Vorobiev e Lebovka, 2011).

O método de CEP é minimamente invasivo e evita mudanças indesejáveis que são típicas de outras tecnologias como as térmicas, químicas e enzimáticas. As técnicas assistidas por esse método possuem diversos efeitos não usuais e, em relação à difusão, podem possibilitar uma “difusão fria” (Vorobiev e Lebovka, 2011). Essas técnicas se baseiam no efeito de transformação ou ruptura das células quando submetidas a um campo elétrico externo, o que resulta em um aumento na condutividade elétrica e na permeabilidade do material intracelular (Zimmermann *et al.*, 1974). As possíveis aplicações dessa tecnologia em uma ampla gama de processos na indústria de alimentos estão baseadas nos efeitos da eletroporação das células vegetais (Jaeger *et al.*, 2008).

O fenômeno de eletroporação, ou eletropermeação, pode ser descrito como um aumento significativo na permeabilidade das membranas causado pela aplicação de pulsos elétricos externos e curtos. O modelo mais aceito para descrever a eletroporação é o modelo de poro aquoso transiente. De acordo com esse modelo, poros hidrofílicos são formados na camada lipídica da membrana celular quando exposta a pulsos elétricos externos. Estes pulsos elétricos induzem uma diferença de potencial através da membrana, fornecendo a energia livre necessária para o rearranjo dos fosfolipídios da membrana e, assim, permitindo a formação de poros hidrofílicos (Tsong, 1991; Weaver e Chizmadzhev, 1996; Kanduser e Miklavci, 2008).

O impacto do campo elétrico em materiais biológicos é refletido pela perda das funções da membrana celular. A presença da membrana restringe a troca de materiais inter e

intracelular e a aplicação de um campo elétrico induz à formação de poros dentro dela, aumentando a sua permeabilidade (Weaver e Chizmadzhev, 1996; Vorobiev e Lebovka, 2011). O grau de eletroporação depende da diferença de potencial através da membrana e da sua estrutura; dependendo das condições de tratamento, do valor do potencial transmembrana e do tempo de exposição ao campo elétrico, uma perda temporária das funções da barreira celular pode ocorrer, sendo que essa perda pode ser reversível ou irreversível (Teissié *et al.*, 2005; Vorobiev e Lebovka, 2011). Diversos modelos teóricos foram propostos para descrever a eletroporação das membranas. Esse mecanismo ainda não foi completamente entendido e discrepâncias foram observadas entre os resultados teóricos e experimentais (Vorobiev e Lebovka, 2011). Entretanto, é aceito que a eletroporação consiste em diferentes estágios que incluem:

- carregamento e polarização das membranas (tempo de aproximadamente 1  $\mu$ s);
- desestabilização temporária e criação de poros (ocorre em escalas de tempo de 10 ns);
- expansão do raio dos poros e agregação de diferentes poros (faixa de tempo de 100  $\mu$ s);
- fechamento dos poros e efeitos de memória (podem durar de segundos a horas) (Teissié *et al.*, 1999; Teissié *et al.*, 2005; Krassowska e Filev, 2007).

As primeiras fases da eletroporação ocorrem na duração de um pulso, e a última fase ocorre após a aplicação do pulso (Hibino *et al.*, 1993; Leontiadou *et al.*, 2003). A primeira parte da eletroporação pode ser medida por mudanças na condutividade elétrica e está relacionada com a formação de poros transientes de vida curta, o que não contribui para o transporte molecular (Pavlin *et al.*, 2007). O transporte molecular através da célula permeabilizada é observado na fase de formação do poro até o completo fechamento da membrana (Gabriel e Teissié, 1997; Gabriel e Teissié, 1999; Pavlin *et al.*, 2007). A eletroporação das membranas também é um pré-requisito para que ocorra o fenômeno de eletrofusão. Esse fenômeno ocorre porque, durante a aplicação de pulsos, e imediatamente depois, a membrana celular é capaz de se fundir, pois se encontra em um estado chamado de fusogênico (Zimmermann, 1982).

A eletropermeação é afetada pela composição química do meio utilizado, pelas características de célula exposta ao campo elétrico e pelos parâmetros dos pulsos elétricos. Os parâmetros mais importantes dos pulsos elétricos são a amplitude, a duração, o número de pulsos e a sua frequência de repetição (Rols e Teissié, 1990; Wolf *et al.*, 1994; Macek-Lebar

*et al.*, 1998; Bilaska *et al.*, 2000; Canatella *et al.*, 2001; Macek-Lebar e Miklavcic, 2001). A Figura 2.5 ilustra como funcionam alguns dos mecanismos dos processos que podem ser assistidos pela presença do campo elétrico.

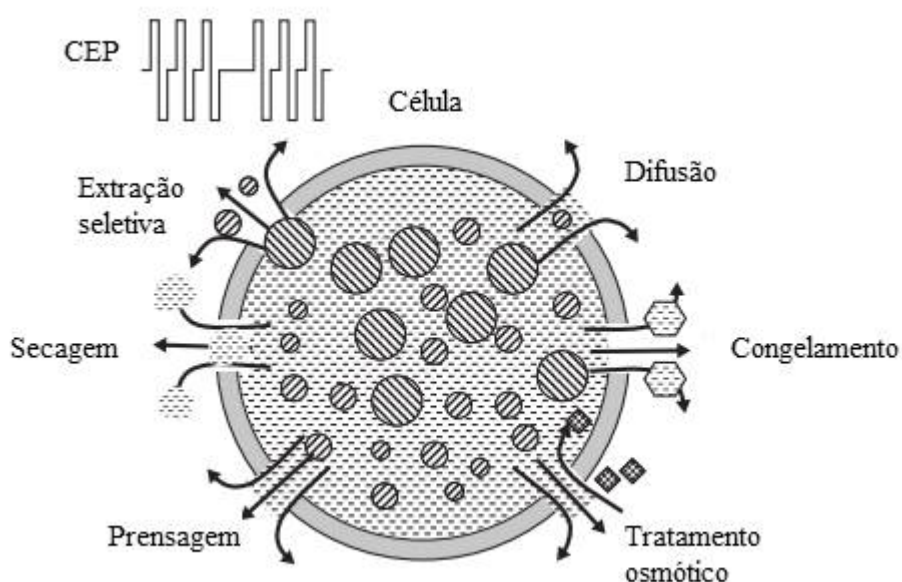


Figura 2.5 – Ilustração das técnicas assistidas por CEP através da formação de poros. Fonte: adaptado de Vorobiev e Lebovka (2011).

Tradicionalmente as tecnologias de aquecimento térmico convencionais são utilizadas com o mesmo propósito da tecnologia de CEP. Entretanto, se espera que essa tecnologia seja menos danosa que o calor para os componentes dos tecidos vegetais como vitaminas, pigmentos, agentes de “*flavor*”, entre outros (Lebovka *et al.*, 2004). Entre as aplicações da tecnologia de CEP, se destaca a sua utilização em diferentes processos da indústria alimentícia e alguns dos processos mais estudados são descritos a seguir.

Processamento de sucos: a utilização de CEP como um pré-tratamento antes da prensagem mecânica ou da extração de sucos de fruta aumentou a eficiência do processo de obtenção de suco. Ainda, o uso dessa tecnologia propiciou um consumo mínimo de energia (Mclellan *et al.*, 1991; Knorr e Angersbach, 1998; Bazhal e Vorobiev, 2000; Jemai e Vorobiev, 2006).

Inativação de micro-organismos e fungos: a tecnologia de CEP pode inativar microrganismos vegetativos, rompendo sua membrana celular. Dessa forma pode-se realizar uma pasteurização a frio dos alimentos, sem comprometer suas características nutricionais e organolépticas. Além disso, também é possível inativar endósporos bacterianos, se o CEP for



combinado a um tratamento térmico. Estudos foram realizados utilizando *Escherichia coli* (Nguyen e Mittal, 2007; Pataro *et al.*, 2013) e esporos de *Bacillus subtilis* (Siemer *et al.*, 2014b) (Siemer *et al.*, 2014a) entre outros. Podem ainda ser inativados fungos usando o processo de CEP, como foi observado por Huang *et al.* (2013) na inativação de *Saccharomyces cerevisiae* em arroz.

Processo de obtenção de açúcar: a tecnologia convencional de extração de açúcar a partir da beterraba consiste na desnaturação térmica de fatias desse produto seguida por difusão em água quente. Entretanto, além da extração do açúcar esse processo extrai pectinas e forma alguns colorantes indesejados, sendo necessárias várias etapas de purificação. Recentemente, a prensagem assistida por CEP tem se mostrado como uma alternativa interessante a esse processo e diversos estudos vem sendo realizados nesse campo (Bouzzara e Vorobiev, 2000) (Jemai e Vorobiev, 2006) (Praporscic *et al.*, 2005) (Loginova *et al.*, 2011b).

Processos de desidratação e secagem: o tempo de secagem pode ser reduzido consideravelmente após o pré-tratamento utilizando CEP, conforme demonstrado por Shynkaryk *et al.* (2008). Isso se deve ao aumento da difusividade efetiva da água com o aumento do dano induzido por CEP, conforme demonstrado por Lebovka *et al.* (2007b) para cascas de batata.

Além dessas aplicações, o campo elétrico também pode ser usado na extração de compostos bioativos e proteínas de matrizes vegetais e na extração de óleo de sementes. Esses usos do processo serão descritos com mais detalhe na seção 2.6.3.

Um dos principais parâmetros do processo de CEP é a energia específica (kJ/kg) que descreve a intensidade do tratamento. A intensidade dos pulsos aplicados é definida pelo campo elétrico (kV/cm) que, para um tratamento em uma câmara de configuração paralela, é descrito pela razão entre a voltagem e a distância entre os eletrodos (Zhang *et al.*, 1995). Quando se utiliza CEP experimentalmente, considera-se que, para se obter uma eletroporação significativa, deve-se aplicar um campo elétrico na ordem de 100 V/cm para tecidos vegetais e de 10 kV/cm para células microbianas (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998; Vorobiev e Lebovka, 2011). Contudo, o grau de eletropermeabilização também depende do protocolo usado e das características do material (Vorobiev e Lebovka, 2006). Um dano bastante significativo aos tecidos vegetais é observado na aplicação de 500 a 1000 V/cm em um tempo de tratamento entre  $10^{-4}$  e  $10^{-1}$  s (Vorobiev e Lebovka, 2011).

Quando aplicado um campo elétrico baixo, a eletroporação é reversível, desde que o processo de fechamento dos poros seja rápido suficiente para reparar as membranas imediatamente após o término do processamento por CEP. Entretanto, tratamentos de CEP de alta intensidade causam danos irreversíveis à membrana celular. As mudanças em longo prazo após a aplicação de CEP podem estar relacionadas ao fluxo osmótico e à redistribuição de umidade no interior da amostra (Lebovka *et al.*, 2001). De acordo com Zimmermann *et al.* (1974), com um campo elétrico entre 1-10 kV/cm se obtém mudanças estruturais reversíveis nas membranas celulares. Contudo, Guderjan *et al.* (2007) sugerem que já pode ocorrer uma permeabilização irreversível para campos elétricos acima de 1 kV/cm. A escolha da utilização de um processo reversível ou não depende do objetivo desejado. Danos reversíveis podem ser usados para induzir reações de estresse celular e a produção de metabólitos secundários (Ulmer *et al.*, 2002). Os processos irreversíveis são aplicados quando se deseja aumentar a eficiência da extração de sucos, óleos entre outros (Guderjan *et al.*, 2005).

#### *Quantificação da desintegração induzida pelo CEP*

O grau de danificação ( $Z$ ) pode ser definido como a porcentagem de células danificadas. O método mais simples para a caracterização de  $Z$  é baseado nas medidas de condutividade elétrica, pois esse parâmetro aumenta com a danificação celular. O grau de desintegração em função da condutividade elétrica ( $Z_C$ ) pode ser definido como (Lebovka *et al.*, 2002; Rogov e Gorbatoov apud Vorobiev e Lebovka, 2011):

$$Z_C = (\sigma - \sigma_i) / (\sigma_d - \sigma_i) \quad (2.2)$$

onde  $\sigma$  é o valor de condutividade elétrica medido e os sub-índices  $i$  e  $d$  se referem às condutividades do tecido intacto e do tecido totalmente danificado, respectivamente. Valores de  $Z_C$  próximos a zero estão relacionados a um tecido pouco danificado e próximos a 1, a um tecido bastante danificado. A Figura 2.6 apresenta a condutividade elétrica em função do tempo de tratamento ( $t_{CEP}$ ), mostrando como a Equação 2.2 pode ser utilizada para monitorar continuamente um processo de CEP. Esse método requer o acompanhamento da condutividade elétrica e o conhecimento de  $\sigma_d$ , que pode ser obtido através da moagem ou do congelamento seguido de descongelamento da amostra.

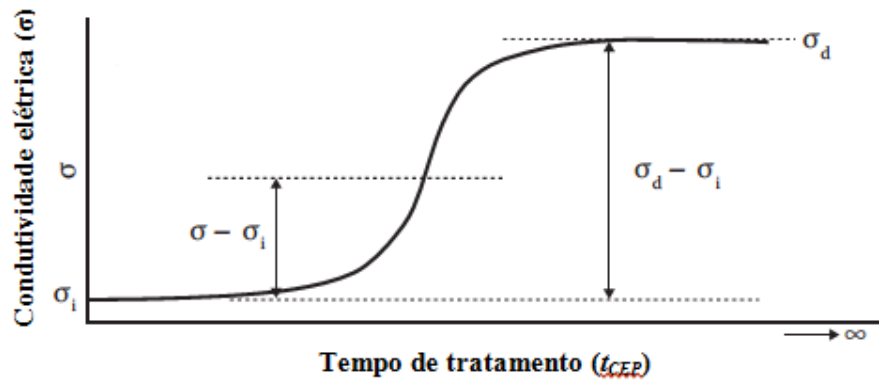


Figura 2.6 – Estimativa do  $Z_C$  em função da condutividade elétrica durante o tempo de tratamento.

Fonte: adaptado de Vorobiev e Lebovka (2011).

Outro método para a determinação do grau de danificação é o uso do coeficiente difusivo de desintegração ( $Z_D$ ), que pode ser definido como (Lebovka *et al.*, 2007b):

$$Z_D = (D - D_i)/(D_d - D_i) \quad (2.3)$$

onde  $D$  é a difusividade mássica aparente medida e  $i$  e  $d$  se referem aos valores para o tecido intacto e totalmente danificado, respectivamente. A difusividade mássica aparente pode ser determinada através de experimentos de extração sólido-líquido ou de secagem.

Os métodos que utilizam a estimativa de  $Z$  para avaliar a desintegração celular podem ser considerados métodos diretos e podem ser utilizados para uma estimativa aproximada do impacto do tratamento em tecidos vegetais e suspensões. Além desses, podem ser utilizados outros métodos para determinação dos danos causados pelo CEP, como estudos microscópicos, avaliação das características de textura e medidas acústicas (Vorobiev e Lebovka, 2011).

### *Influência do controle dos pulsos*

Sale e Hamilton (1967 apud Vorobiev e Lebovka, 2011) concluíram que os dois parâmetros mais relevantes para determinar a eficiência do tratamento por CEP são o campo elétrico aplicado ( $E$ ) e o tempo total de exposição a esse campo, já definido como  $t_{CEP}$ . Em geral, o aumento do campo elétrico aumenta o dano causado pelo tratamento (Bouzzara e Vorobiev, 2000; Praporscic *et al.*, 2005); entretanto, o consumo energético e o aquecimento

ôhmico também se tornam relevantes ao serem aplicados campos mais altos. Em geral, os valores ótimos de campo elétrico para tecidos de frutas e vegetais estão entre 300 e 500 V/cm (Vorobiev e Lebovka, 2008).

Alguns experimentos demonstraram que a eletroporação pode depender de parâmetros do pulso como amplitude, forma, duração ( $t_i$ ), número de pulsos ( $n$ ) e intervalo entre pulsos ( $\Delta t$ ) (Canatella *et al.*, 2001; Canatella *et al.*, 2004). A Figura 2.7 apresenta um protocolo típico de um pulso retangular bipolar. O protocolo experimental é, geralmente, ajustado fazendo-se um trem de pulsos seguidos de uma pausa. Dessa forma se obtém um bom controle do índice de desintegração ( $Z$ ) sem um aumento significativo de temperatura durante o tratamento (Vorobiev e Lebovka, 2011). As formas de onda mais comumente usadas em geradores de CEP são decaimento exponencial, oscilatória e retangular (Miklavcic e Towhidi, 2010).

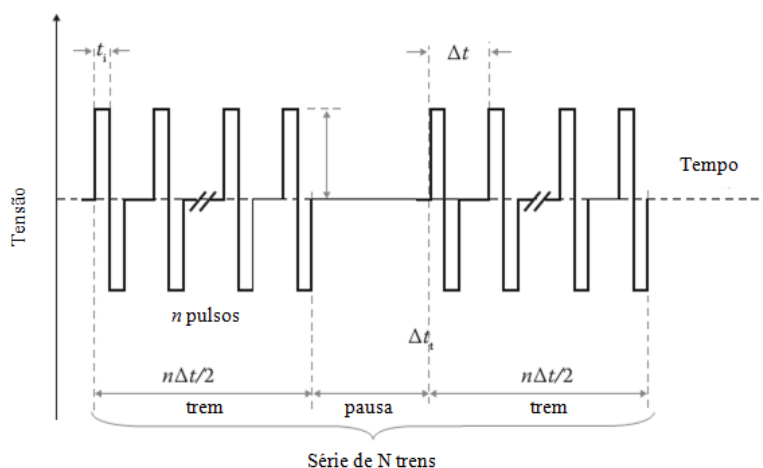


Figura 2.7 – Ilustração de um onda bipolar quadrada típica de um protocolo de CEP. Fonte: Vorobiev e Lebovka (2011).

Observando a Figura 2.7 é possível deduzir que o tempo de exposição ao campo elétrico ( $t_{CEP}$ ) pode ser calculado usando a equação 2.4:

$$t_{CEP} = Nnt_i \quad (2.4)$$

A distância entre os pulsos ( $\Delta t$ ) é um parâmetro bastante importante, tendo sido demonstrado que uma completa eletroporação é atingida quando é realizada uma longa pausa entre os pulsos ( $\Delta t > 1$  s); entretanto, esse fenômeno torna-se incompleto quando uma maior

frequência de repetição (acima de 1 Hz) é utilizada (Pavlin *et al.*, 2008 apud Vorobiev e Lebovka, 2011).

Vito *et al.* (2008) e Grimi *et al.* (2010a) avaliaram a influência do tempo de pulso ( $t_i$ ), tendo sido observada uma forte correlação entre a duração do pulso e os danos causados por eles: um tratamento de CEP eficaz requer a aplicação de pulsos relativamente longos. Para alcançar a máxima tensão transmembrana a duração do pulso deve ser maior que o tempo de carregamento elétrico. Os dados experimentais suportam essa teoria e demonstram a influência da duração dos pulsos (entre 10 e 1000  $\mu$ s) na eficiência do tratamento de CEP em uvas, maçãs e batatas (Vito *et al.*, 2008; Grimi *et al.*, 2010a).

### ***2.6.2 Tecnologia de Descargas Elétricas de Alta Tensão (DEAT)***

Existe um interesse considerável no campo da Engenharia em utilizar descargas elétricas em água. O tratamento de sistemas aquosos através de descargas elétricas tem sido estudado há algum tempo devido à sua importância em diversas aplicações práticas (Boussetta *et al.*, 2011a). Dependendo das condições da descarga, a energia elétrica pode se transformar em luz, calor ou energia mecânica (ondas de choque) (Boussetta *et al.*, 2011a). Atualmente, ela é usada para a extração em meio aquoso de óleo e compostos solúveis provenientes de vegetais em escala de bancada (Grémy-Gros *et al.*, 2008) (Boussetta *et al.*, 2009b) e para tratamento de água (Ihara *et al.*, 2014), entre outras aplicações.

As hipóteses que tentam explicar o processo que leva a ocorrência de um canal condutivo em água ainda estão sendo discutidas. Sabe-se, no entanto, que na tecnologia de DEAT são utilizados arcos elétricos pulsados de alta tensão (Boussetta e Vorobiev, 2014). A ruptura dielétrica (ou arco elétrico) é um fenômeno que pode ser definido como uma rápida redução na resistência de um componente isolante; quando a voltagem aplicada é suficientemente forte, o isolante se ioniza parcialmente e começa a conduzir corrente elétrica. Caso esse evento ocorra por um curto período de tempo, ele é chamado de arco elétrico ou descarga elétrica.

Recentemente, tem se observado que a tecnologia de DEAT induz processos físicos e químicos que agem na membrana e na parede celular e aumentam a liberação de compostos intracelulares (Boussetta *et al.*, 2011a). As descargas agem através da ruptura dielétrica em

água; quando um tratamento elétrico desse tipo é aplicado em uma solução aquosa e o campo elétrico ultrapassa o campo elétrico de ruptura é observado um fenômeno de ruptura dielétrica. A corrente elétrica passa pela água, que se comporta como uma matéria isolante, e produz ondas de choque, radiações ultravioleta e libera espécies ativas (Sun *et al.*, 1998; Zuckerman *et al.*, 2002). O processo que ocorre durante os tratamentos em meio aquoso ao utilizarem-se descargas de alta tensão é explicado em detalhes a seguir.

A aplicação de alta voltagem através dos eletrodos leva à aceleração dos elétrons que alcançam energia suficiente para excitar as moléculas de água. Se um campo elétrico é forte o suficiente, inicia-se uma “avalanche” de elétrons (em inglês, *streamer*) que se propaga do eletrodo positivo (em geral uma agulha) para o negativo (em geral uma placa com aterramento) (Vorobiev e Lebovka, 2008). Várias moléculas ativas são produzidas dentro dessa avalanche devido à ação dos elétrons excitados. Quando a avalanche atinge o eletrodo negativo, ocorre a ruptura dielétrica e um canal de descarga é criado. Isso leva a um aumento do diâmetro do arco elétrico e da corrente e a uma diminuição da voltagem (Sun *et al.*, 1998; Zuckerman *et al.*, 2002).

O estudo de Boussetta *et al.* (2013a) tentou esclarecer melhor os fenômenos envolvidos do processo de descargas elétricas. Quando utilizado um sistema composto por uma agulha em um eletrodo tipo placa plana e aplicando uma alta tensão de pulso, o processo de ruptura dielétrica é composto por duas fases distintas: uma fase pré-ruptura (chamada de avalanche de elétrons ou *streamer*) e a fase de ruptura dielétrica, que é o que chamamos de arco elétrico. A fase de *streamer* ocorre devido à ocorrência de um campo elétrico local muito alto. Em líquidos, os *streamers* são compostos de canais de gás ionizado que se propagam em direção ao eletrodo oposto. A energia elétrica de um pulso é a soma da energia liberada inicialmente quando a avalanche de elétrons se propaga e a energia dissipada no arco elétrico (Boussetta e Vorobiev, 2014). A Figura 2.8 apresenta fotografias de cavidades iniciadas pelos fenômenos de avalanche de elétrons (Figura 2.8 (a)) e arco elétrico (Figura 2.8(b)).

Durante a ruptura dielétrica ocorrem fenômenos secundários que fazem com que se formem ondas de choque de alta pressão que se propagam na água. A pressão do choque é seguida por uma onda de rarefação que produz cavitação. O colapso das bolhas formadas durante a cavitação resulta em choques secundários e esses choques podem interagir com a estrutura das células. Além de danos às estruturas celulares, esses fenômenos secundários resultam em fragmentação das partículas o que acelera a extração de compostos intracelulares

(Gros *et al.*, 2003; Boussetta *et al.*, 2012b). Após um tratamento de DEAT efetivo (pressão das ondas de choque maior do que 100 bar), a redução de tamanho das partículas tratadas é similar àquela obtida após a moagem (Boussetta *et al.*, 2012b).

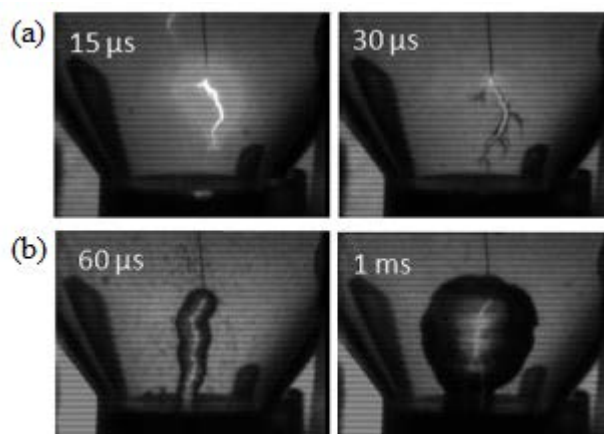


Figura 2.8 – Fotografias de cavidades iniciadas pela avalanche de elétrons (a) e pelo arco elétrico (b).

Fonte: adaptado de Boussetta *et al.* (2013a).

Os fenômenos secundários são processos físicos e químicos. Os processos físicos devido ao arco pulsado incluem a formação de luz ultravioleta (UV) (Locke *et al.*, 2005) e ondas de choque (Boussetta *et al.*, 2012b), que dependem da energia de descarga. Os processos químicos induzidos por descargas em água são a formação de radicais reativos e espécies moleculares como peróxido de hidrogênio e ozônio (Dang *et al.*, 2009). Devido a esses diferentes fenômenos, as DEAT podem ter distintas aplicações relacionadas aos seus diferentes efeitos: a luz UV na faixa de 200 a 400 nm pode ser mutagênica para as células, as ondas de choque causam a ruptura mecânica da membrana celular e, ainda, os radicais hidroxil podem levar ao dano oxidativo das células (Boussetta e Vorobiev, 2014).

A produção da ruptura dielétrica em água requer um gerador com um grande capacitor; isso se deve ao fato de ser necessária uma grande quantidade de energia para criar esse fenômeno, que fica contida no capacitor (Grémy-Gros *et al.*, 2008).

As ondas de choque têm um efeito elétrico e também mecânico sobre o produto. A tecnologia de DEAT introduz energia diretamente na solução aquosa através de um canal de plasma formado pelas descargas elétricas de alta corrente e alta tensão entre dois eletrodos submersos. Essa técnica envolve altas faixas de corrente ( $10^3 - 10^4$  A), de tensão ( $10^3 - 10^4$  V) e de frequência ( $10^{-2} - 10^{-3}$  Hz) (Chang *et al.*, 1998 apud Boussetta *et al.*, 2011b).

Entre as vantagens dessa metodologia estão o curto período de tempo necessário (alguns ms) e o baixo consumo de energia (10 – 50 kJ/kg). Além disso, a elevação da temperatura durante o tratamento é baixa, em geral menor que 5 °C (Gros *et al.*, 2003).

As equações descritas na seção 2.6.1 para quantificar a desintegração e avaliar os efeitos do processamento na ruptura das células também podem ser aplicadas para a tecnologia de DEAT, sendo os resultados também expressos em grau de danificação ( $Z$ ). Além disso, o tempo de tratamento ( $t_{DEAT}$ ), também pode ser estimado da mesma forma: multiplicando o tempo de um pulso pelo total de pulsos (Boussetta e Vorobiev, 2014).

### **2.6.3 Extração assistida por CEP e DEAT**

Nas últimas décadas, cada vez mais pesquisas têm sido realizadas no impacto da tecnologia de CEP na composição química dos alimentos, na extração de compostos e no rendimento de processos de prensagem. Essas aplicações oferecem inúmeras possibilidades para a indústria de alimentos (Jaeger *et al.*, 2008). A extração a frio ou utilizando temperaturas moderadas a partir de vegetais pode ser significativamente melhorada pelo processo de campo elétrico pulsado (Loginova *et al.*, 2011b). Além disso, o uso desse processo para aumentar a eficácia da extração, pode minimizar ou eliminar completamente o uso de solventes como acetona, metanol e etanol, sendo o processo realizado utilizando somente água.

Em alimentos *in natura*, compostos de alto valor nutricional estão, inicialmente, no interior das células, que precisam ser danificadas para facilitar a recuperação do material intracelular. As técnicas convencionais de danificação celular, como fragmentação, danos térmicos e químicos e tratamentos enzimáticos, levam a uma desintegração mais severa dos componentes do tecido incluindo as paredes e as membranas celulares. Quando se combina um pré-tratamento elétrico a um processo de difusão, o tempo total de extração é reduzido, se comparado à extração sem tratamento elétrico (Boussetta *et al.*, 2009a; Boussetta *et al.*, 2011a).

O tratamento com CEP, que é menos destrutivo do que os métodos convencionais, pode ser utilizado para uma extração mais seletiva dos componentes celulares (Vorobiev e Lebovka, 2011). A permeabilização celular induzida por CEP (eletroporação) é usada para



aumentar a formação de poros permanentes na membrana celular e aumentar o transporte de massa para fora das células (Knorr *et al.*, 1994; Knorr e Angersbach, 1998; Bazhal e Vorobiev, 2000; Fincan *et al.*, 2004; Guderjan *et al.*, 2007). Os tratamentos usando DEAT também podem ser interessantes na extração aquosa, combinando seus efeitos com o da extração clássica. Esses tratamentos podem ser usados para acelerar a extração de moléculas solúveis de determinadas matérias primas, podendo aumentar a velocidade de extração em até 50 vezes se comparada à infusão (Vorobiev e Lebovka, 2008). Ainda, quando usadas descargas elétricas, o aumento de temperatura é inferior se comparada essa tecnologia as tecnologias e CEP, micro-ondas e ultrassom (Boussetta e Vorobiev, 2014).

Entretanto, quando as tecnologias são comparadas, a principal vantagem do CEP em relação à DEAT e a moagem é o fato do produto preservar sua estrutura após o tratamento, facilitando e reduzindo as etapas subsequentes de separação sólido-líquido, como por exemplo a filtração. Devido à alta energia do tratamento as DEAT produzem pequenas partículas, dificultando a separação (Boussetta *et al.*, 2012b).

#### *Compostos bioativos e proteínas*

O aumento da eficiência da difusão de substâncias solúveis através das membranas para obtenção de substâncias bioativas como diferentes macromoléculas, pigmentos e antioxidantes é de grande interesse, não só para a indústria de alimentos, como para a produção de cosméticos e na biotecnologia. A extração de compostos intracelulares através da utilização de campos elétricos de alta intensidade se mostra como um processo eficiente em termos energéticos e de consumo de tempo (Jaeger *et al.*, 2008).

Diversos estudos foram realizados com o intuito de recuperar corantes naturais provenientes da beterraba (betalaínas). A aplicação de pulsos elétricos teve resultados positivos, melhorando a eficiência da extração (Chalermchat *et al.*, 2004; Fincan *et al.*, 2004; Loginova *et al.*, 2011a). Quando comparada ao tratamento térmico, que por sua vez também pode acelerar o processo de extração, a tecnologia de CEP teve menor consumo energético e menores níveis de degradação dos corantes. Esse último resultado se deve ao fato das betalaínas serem sensíveis a temperaturas acima de 60 °C, que não foram atingidas no tratamento por CEP (Loginova *et al.*, 2011a).

A extração de compostos fenólicos foi estudada utilizando a tecnologia de CEP por López *et al.* (2008a, 2008b), que avaliou a extração desses compostos durante a produção de vinho. Esse estudo demonstrou um aumento da eficiência da extração nas etapas de vinificação e fermentação, mesmo em temperaturas moderadas (25 °C). Os trabalhos de Grimi *et al.* (2009) e de Grimi *et al.* (2011) também tiveram bons resultados ao avaliar a extração de compostos fenólicos usando CEP em suco de maçã.

A aplicação do processo de DEAT para extração de compostos fenólicos foi estudada por Boussetta *et al.* (2009a), Boussetta *et al.* (2009b), Boussetta *et al.* (2011b) e Boussetta *et al.* (2012b). Esses estudos tiveram como base o bagaço de uva e demonstraram que a tecnologia acelerou o processo de extração e que a resposta à aplicação das descargas foi praticamente imediata. Quando comparadas as duas tecnologias para extração de fenólicos de uva, a tecnologia de CEP foi duas vezes menos eficiente que a de DEAT (Boussetta *et al.*, 2009b). Outros trabalhos demonstraram a eficiência dessa técnica para a extração de solutos de erva doce (Moubarik *et al.*, 2011) e *stevia* (Negm, 1009 apud Boussetta e Vorobiev, 2014). Contudo, deve-se observar que, para quase todos os compostos estudados, existe uma energia ótima para aplicação das descargas. Para uma energia muito alta, as reações oxidativas que ocorrem no processo, podem produzir em alta quantidade espécies que podem oxidar os compostos fenólicos (Boussetta e Vorobiev, 2014).

Até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados envolvendo sementes e os processos de CEP e DEAT. Recentemente, Boussetta *et al.* (2013b) avaliaram o da aplicação de DEAT na extração de compostos fenólicos e lignanas da torta de linhaça. O estudo mostrou que as células da linhaça perderam a sua estrutura devido aos efeitos das DEAT, o que aumentou o rendimento da extração em mais de 50 % quando aplicada uma energia de 40 kV e usando pulsos de 5 ms. Além disso, observou-se que a adição de solventes orgânicos no processo de extração teve um efeito sinérgico e aumentou ainda mais o teor total de fenólicos extraídos da torta. Ainda, Boussetta *et al.* (2014) demonstraram um efeito positivo do pré-tratamento por PEF na extração de fenólicos da casca da linhaça, atingindo uma maior eficiência no processo através da aplicação dessa tecnologia. Nesse estudo foi aplicada uma energia de 300 kJ/kg em um campo de 20 kV/cm.

Ainda são escassos na literatura estudos envolvendo campo elétrico ou descargas elétricas e extração de proteínas. Entretanto, pelas mesmas razões que os processos de CEP e DEAT aumentam eficiência da extração de compostos fenólicos, eles podem melhorar a

extração de proteínas. O estudo de Liu *et al.* (2012) demonstrou boa eficiência do processo de CEP na extração de proteínas do resíduo da produção de cerveja.

### *Óleo vegetal*

Baseado nos mesmos efeitos mencionados anteriormente (aumento do coeficiente de transferência de massa devido à eletropermeabilização), a aplicação de campos elétricos pode substituir ou melhorar técnicas convencionais de extração de óleos vegetais (Jaeger *et al.*, 2008). Os principais objetivos de uma extração de óleo são a ruptura da parede celular, para difusão do óleo e seus componentes, e a separação do óleo obtido. A literatura atual demonstra que campos elétricos podem ser utilizados como um pré-tratamento para a ruptura celular antes da separação do óleo (Guderjan *et al.*, 2007). O uso dessas metodologias pode ser uma boa alternativa à etapa de cozimento, que facilita a extração do óleo pela modificação da estrutura celular (Gros *et al.*, 2003).

A aplicação dos processos alternativos abordados nesse trabalho, CEP e DEAT, na extração de óleo foi abordada em alguns estudos prévios, discutidos a seguir.

Guderjan *et al.* (2005) e Guderjan *et al.* (2007) demonstraram a aplicação do tratamento de CEP para melhorar a eficiência da extração de óleo e a qualidade do óleo extraído. O tratamento foi testado em azeitona, soja, milho e canola. A aplicação de campo elétrico (0,6 kV/cm) fez com que a eficiência da extração chegasse a 88,4 % com alta quantidade de fitosteróis. A eficiência da extração de óleo de oliva aumentou 6,5 - 7,4 % e a quantidade de compostos bioativos do óleo de soja aumentou em torno de 20 % em comparação com as amostras de referência (Guderjan *et al.*, 2005). O estudo de Guderjan *et al.* (2007) mostrou que a maior eficiência da extração e as maiores concentrações de tocoferóis, compostos fenólicos, antioxidantes e fitosteróis foram obtidas para o óleo de canola extraído usando CEP, com um campo de 3 V/cm, quando comparada à extração usando um equipamento Soxhlet. Ainda, as propriedades de insaturação e os valores de saponificação do óleo não mudaram, enquanto maiores concentrações de ácidos graxos livres e clorofila foram observados.

Gros *et al.* (2003) avaliaram a eficiência de um processo alternativo de extração de óleo de linhaça, sem utilizar a etapa de cozimento como pré-tratamento e sem utilizar

solventes na extração. Os autores fixaram a temperatura máxima de processo como sendo de 50 °C para manter a funcionalidade das proteínas e evitar a desnaturação, que inicia a 60 °C (Curda *et al.*, 1997). Nesse estudo foi avaliado o efeito da trituração como um pré-processo (ao invés do cozimento) e foi demonstrado que, devido à redução no tamanho das partículas e ao enfraquecimento das paredes celulares, prensagem e o rearranjo das partículas quando a pressão foi aplicada foram melhorados. Ainda, foi demonstrado pelos autores que a aplicação de DEAT na semente de linhaça auxiliou na extração de mucilagem, que interfere de forma negativa no processo de extração de óleo.

Além dos trabalhos citados, o estudo de Abenoza *et al.* (2013) avaliou a aplicação de CEP na extração de óleo de oliva, utilizando um campo elétrico de 2 kV e com o objetivo de diminuir a temperatura de maceração das azeitonas (etapa necessária antes da prensagem para romper a pele da azeitona) e aumentar o rendimento. O aumento no rendimento de processo foi de 14 % e a temperatura de maceração passou de 26 para 15 °C.

Sabe-se que diferentes métodos de extração afetam a composição e a concentração de componentes minoritários do óleo. Dessa forma, o uso de tratamentos elétricos pode também afetar a qualidade do óleo e isso deve ser levado em consideração na escolha de uma tecnologia alternativa (Guderjan *et al.*, 2007).

## 2.7 Referências

- ABENOZA, M., BENITO, M., SALDAÑA, G., ÁLVAREZ, I., RASO, J. e SÁNCHEZ-GIMENO, A. C. Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil. *Food and Bioprocess Technology*, v.6, n.6, 2013/06/01, p.1367-1373. 2013.
- ABOU-GHARBIA, H. A., SHEHATA, A. A. Y. e SHAHIDI, F. Effect of processing on oxidative stability and lipid classes of sesame oil. *Food Research International*, v.33, n.5, p.331-340. 2000.
- ACHOURI, A., NAIL, V. e BOYE, J. I. Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, v.46, n.1, p.360-369. 2012.
- AFANAS'EV, I. B., DOROZHKO, A. I., BRODSKII, A. V., KOSTYUK, V. A. e POTAPOVITCH, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, v.38, n.11, p.1763-1769. 1989.
- AL-FARSI, M. A. e LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, v.108, n.3, p.977-985. 2008.

- ALBERT, C. M., GAZIANO, J. M., WILLET, W. C., MANSON, J. E. e HENNEKENS, C. H. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the physicians' health study. *Archives of Internal Medicine*, v.162, p.1382-1387. 2002.
- ALIAKBARIAN, B., CASAZZA, A. A. e PEREGO, P. Valorization of olive oil solid waste using high pressure-high temperature reactor. *Food Chemistry*, v.128, n.3, p.704-710. 2011.
- AMAROWICZ, R., PEGG, R. B., RAHIMI-MOGHADDAM, P., BARL, B. e WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the canadian prairies. *Food Chemistry*, v.84, n.4, p.551-562. 2004.
- ARAÚJO, A. E. D., SOARES, J. J., BELTRÃO, N. E. D. M. e FIRMINO, P. D. T. *Cultivo do gergelim*. EMBRAPA. Campina Grande, Paraíba. 2006
- ARUOMA, O. I., SPENCER, J. P. E., WARREN, D., JENNER, P., BUTLER, J. e HALLIWELL, B. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. *Food Chemistry*, v.60, n.2, p.149-156. 1997.
- AZIZAH, A. H., NIK RUSLAWATI, N. M. e SWEE TEE, T. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, v.64, n.2, p.199-202. 1999.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. e SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v.99, n.1, p.191-203. 2006.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., POTHAKAMURY, U. R., PALOU, E. e SWANSON, B. *Nonthermal preservation of foods*. New York: Marcel Dekker. 1998
- BAXTER, N. J., LILLEY, T. H., HASLAM, E. e WILLIAMSON, M. P. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation†. *Biochemistry*, v.36, n.18, 1997/05/01, p.5566-5577. 1997.
- BAZHAL, M. e VOROBIEV, E. Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, n.11, p.1668-1674. 2000.
- BELTRÃO, N. E. D. M., FREIRE, E. C. e LIMA, E. F. *Gergelimcultura no trópico semi-árido nordestino*. Embrapa Algodão. Circular Técnica,18, p.52. 1994
- BELTRÃO, N. E. M., J.G., S. e PEREIRA, J. R. *O agronegócio do gergelim no brasil*. Brasília: Embrapa. 2001. 348p. p.
- BIGONIYA, P., NISHAD, R. e SINGH, C. S. Preventive effect of sesame seed cake on hyperglycemia and obesity against high fructose-diet induced type 2 diabetes in rats. *Food Chemistry*, v.133, n.4, p.1355-1361. 2012.
- BILSKA, A. O., DEBRUIN, K. A. e KRASSOWSKA, W. Theoretical modeling of the effects of shock duration, frequency, and strength on the degree of electroporation. *Bioelectrochemistry*, v.51, n.2, p.133-143. 2000.
- BOCCO, A., CUVELIER, M.-E., RICHARD, H. e BERSSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.6, 2012/08/17, p.2123-2129. 1998.
- BOLLING, B. W., DOLNIKOWSKI, G., BLUMBERG, J. B. e CHEN, C. Y. O. Polyphenol content and antioxidant activity of california almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry*, v.122, n.3, p.819-825. 2010a.
- BOLLING, B. W., MCKAY, D. L. e BLUMBERG, J. B. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.19, n.1, p.117-123. 2010b.
- BORGES, G. D. S. C., VIEIRA, F. G. K., CRISTIANE COPETTI, GONZAGA, L. V. e FETT, R. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *euterpe edulis* using the response surface methodology. *Food Research International*, v.44, p.708-715. 2011.
- BOUSSETTA, N., LANOISELLÉ, J.-L., BEDEL-CLOUTOUR, C. e VOROBIEV, E. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for

polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, v.95, n.1, p.192-198. 2009a.

BOUSSETTA, N., LEBOVKA, N., VOROBIEV, E., ADENIER, H., BEDEL-CLOUTOUR, C. e LANOISELLÉ, J.-L. Electrically assisted extraction of soluble matter from chardonnay grape skins for polyphenol recovery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.4, 2014/01/15, p.1491-1497. 2009b.

BOUSSETTA, N., LESAIN, O. e VOROBIEV, E. A study of mechanisms involved during the extraction of polyphenols from grape seeds by pulsed electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.19, p.124-132. 2013a.

BOUSSETTA, N., REESS, T., VOROBIEV, E. e LANOISELLÉ, J.-L. Pulsed electrical discharges. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011a. Pulsed electrical discharges, p.145-172. (Contemporary food engineering)

BOUSSETTA, N., SOICHI, E., LANOISELLÉ, J. L. e VOROBIEV, E. Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. *Industrial Crops and Products*, v.52, p.347-353. 2014.

BOUSSETTA, N., TURK, M., DE TAEYE, C., LARONDELLE, Y., LANOISELLÉ, J. L. e VOROBIEV, E. Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, v.49, n.0, p.690-696. 2013b.

BOUSSETTA, N. e VOROBIEV, E. Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*. 2014.

BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., DELOISON, V., POCHEZ, F., FALCIMAIGNE-CORDIN, A. e LANOISELLÉ, J. L. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, v.128, n.2, p.364-370. 2011b.

BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., LE, L. H., CORDIN-FALCIMAIGNE, A. e LANOISELLÉ, J. L. Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, v.46, n.1, p.127-134. 2012.

BOUZRARA, H. e VOROBIEV, E. Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. *International Sugar Journal*, v.102, p.194-200. 2000.

BRASIL. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. *Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002*. A. N. D. V. Sanitária. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 17 de julho de 2002 2002.

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

BRUNET, M. J., BLADÉ, C., SALVADÓ, M. J. e AROLA, L. Human apo a-i and rat transferrin are the principal plasma proteins that bind wine catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.9, 2002/04/01, p.2708-2712. 2002.

CACACE, J. E. e MAZZA, G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.21, 2002/10/01, p.5939-5946. 2002.

CACACE, J. E. e MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, v.59, n.4, p.379-389. 2003a.

CACACE, J. E. e MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, v.68, n.1, p.240-248. 2003b.

CALLE ÁLVAREZ, J. Aislamiento, purificación e identificación de sesamina a partir de lodos de microfiltrado en la fabricación del aceite virgen de sesamum indicum l. (ajonjolí). *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, v.36, p.5-10. 2007.

- CANATELLA, P. J., BLACK, M. M., BONNICHSEN, D. M., MCKENNA, C. e PRAUSNITZ, M. R. Tissue electroporation: Quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environments. *Biophysical Journal*, v.86, n.5, p.3260-3268. 2004.
- CANATELLA, P. J., KARR, J. F., PETROS, J. A. e PRAUSNITZ, M. R. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability. *Biophysical Journal*, v.80, n.2, p.755-764. 2001.
- CASTRO, M. D. L. D. e PRIEGO-CAPOTE, F. Microwave-assisted extraction. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Microwave-assisted extraction, p.85-122. (Contemporary food engineering)
- CERRETANI, L., BENDINI, A., RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T., VITTADINI, E. e CHIAVARO, E. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part i. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*, v.115, n.4, p.1381-1388. 2009.
- CHALERMCHAT, Y., FINCAN, M. e DEJMEK, P. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: Mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering*, v.64, n.2, p.229-236. 2004.
- CHEN, B. H. e TANG, Y. C. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.6, 2012/08/22, p.2312-2318. 1998.
- CHEN, P. R., CHIEN, K. L., SU, T. C., CHANG, C. J., LIU, T.-L., CHENG, H. e TSAI, C. Dietary sesame reduces serum cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia. *Nutrition Research*, v.25, n.6, p.559-567. 2005.
- CHEN, Y.-M., WAN, J.-Q., HUANG, M.-Z., MA, Y.-W., WANG, Y., LV, H.-L. e YANG, J. Influence of drying temperature and duration on fiber properties of unbleached wheat straw pulp. *Carbohydrate Polymers*, v.85, n.4, p.759-764. 2011.
- CORSO, M. P., FAGUNDES-KLEN, M. R., SILVA, E. A., CARDOZO FILHO, L., SANTOS, J. N., FREITAS, L. S. e DARIVA, C. Extraction of sesame seed (*sesamun indicum* l.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.52, n.1, p.56-61. 2010.
- CURB, J. D., WERGOWSKIE, G., DOBBS, J. C., ABBOTT, R. D. e HUANG, B. Serum lipid effects of a high-monounsaturated fat diet based on macadamia nuts. *Archives of Internal Medicine*, v.160, n.8, p.1154-1158. 2000.
- CURDA, L., BELHÁCOVÁ, L., UHROVÁ, M., STETINA, J. e FUKAL, L. Assessment of heat-induced denaturation of whey proteins. *Journal of Chromatography A*, v.772, n.1-2, p.231-234. 1997.
- DABROWSKI, K. J. e SOSULSKI, F. W. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.32, n.1, 1984/01/01, p.128-130. 1984.
- DANG, T. H., DENAT, A., LESAIN, O. e TEISSEDE, G. Pulsed electrical discharges in water for removal of organic pollutants: A comparative study. *The European Physical Journal - Applied Physics*, v.47, n.02, p.null-null. 2009.
- DAS, N. P. e PEREIRA, T. A. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: Structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.67, n.4, p.255-258. 1990.
- DE-WIT, J. N. e KLARENBECK, G. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, v.67, n.11, p.2701-2710. 1984.
- DE LA ROSA, L. A., ALVAREZ-PARRILLA, E. e SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of mexican pecan (*carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, n.1, 2011/01/12, p.152-162. 2010.

- DENG, Q., PENNER, M. H. e ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, v.44, n.9, p.2712-2720. 2011.
- DIETRICH, M., TRABER, M. G., JACQUES, P. F., CROSS, C. E., HU, Y. e BLOCK, G. Does  $\gamma$ -tocopherol play a role in the primary prevention of heart disease and cancer? A review. *Journal of the American College of Nutrition*, v.25, n.4, p.292-299. 2006.
- DIÑEIRO GARCÍA, Y., VALLES, B. S. e PICINELLI LOBO, A. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chemistry*, v.117, n.4, p.731-738. 2009.
- DOLATOWSKI, Z. J. e STASIAK, D. M. Ultrasonically assisted diffusion processes. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Ultrasonically assisted diffusion processes, p.123-144. (Contemporary food engineering)
- DREHER, M. L., MAHER, C. V. e KEARNEY, P. The traditional and emerging role of nuts in healthful diets. *Nutrition Reviews*, v.54, p.241-245. 1996.
- DUH, P.-D., YEH, D.-B. e YEN, G.-C. Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.69, n.8, p.814-818. 1992.
- EL-ADAWY, T. A. Effect of sesame seed protein supplementation on the nutritional, physical, chemical and sensory properties of wheat flour bread. *Food Chemistry*, v.59, n.1, p.7-14. 1997.
- EL-ADAWY, T. A. e TAHA, K. M. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.3, 2001/03/01, p.1253-1259. 2001.
- ELIASSON, C., KAMAL-ELDIN, A., ANDERSSON, R. e ÅMAN, P. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *Journal of Chromatography A*, v.1012, n.2, p.151-159. 2003.
- ESCAMILLA-SILVA, E. M., GUZMÁN-MALDONADO, S. H., CANO-MEDINAL, A. e GONZÁLEZ-ALATORRE, G. Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, n.9, p.972-979. 2003.
- FAO. Faostat. <http://www.fao.org>: Food and Agricultural Organization of the United States 2010.
- FAO. Faostat. <http://www.fao.org>: Food and Agricultural Organization of the United States 2011.
- FELLOWS, P. J. *Tecnologia do processamento de alimentos*: Woodhead Publishing Ltd. 2006. 602 p.
- FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v.475, n.1-2, p.89-111. 2001.
- FIESP e IBOPE. Brasil food trends 2020. *Brasil Food Trends*. Fiergs e Ital 2010.
- FIGUEIREDO, A. S. e MODESTO-FILHO, J. Efeito do uso da farinha desengordurada do sesamum indicum L nos níveis glicêmicos em diabéticas tipo 2. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.77-83. 2008.
- FINCAN, M., DEVITO, F. e DEJMEK, P. Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering*, v.64, n.3, p.381-388. 2004.
- FIRMINO, P. T. *Gergelim: Sistemas de produção e seu processo de verticalização, visando produtividade no campo e melhoria da qualidade da alimentação humana*. EMBRAPA. Campina Grande, Paraíba. 1996



- FRASER, G. E., SABATE, J., BEESON, W. L. e STRAHAN, T. M. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease: The adventist health study. *Archives of Internal Medicine*, v.152, n.7, p.1416-1424. 1992.
- FUKUDA, Y., NAGATA, M., OSAWA, T. e NAMIKI, M. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil, and the effect of using the oil for frying. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.50, n.4, p.857-862. 1986.
- FUKUDA, Y., OSAWA, T., NAMIKI, M. e OZAKI, T. Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.49, n.2, p.301-306. 1985.
- GABRIEL, B. e TEISSIÉ, J. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophysical Journal*, v.73, n.5, p.2630-2637. 1997.
- GABRIEL, B. e TEISSIÉ, J. Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophysical Journal*, v.76, n.4, p.2158-2165. 1999.
- GEORGE, B., KAUR, C., KHURDIYA, D. S. e KAPOOR, H. C. Antioxidants in tomato (*lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, v.84, n.1, p.45-51. 2004.
- GHIRARDELLO, D., PROSPERINI, S., ZEPPA, G. e GERBI, V. Phenolic acid profile and antioxidant capacity of hazelnut (*corylus avellana* l.) kernels in different solvent systems. *Journal of Food and Nutrition Research*, v.49, n.4, 2010, p.195-205. 2010.
- GIL, M. A. I., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., HESS-PIERCE, B. e KADER, A. A. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin c contents of nectarine, peach, and plum cultivars from california. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.17, 2012/08/22, p.4976-4982. 2002.
- GOLI, A. H., BARZEGAR, M. e SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, v.92, n.3, p.521-525. 2005.
- GORINSTEIN, S., MARTÍN-BELLOSO, O., PARK, Y. S., HARUENKIT, R., LOJEK, A., ANTONIOU, M., CASPI, A., LIBMAN, I. e TRAKHTENBERG, S. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, v.74, n.3, p.309-315. 2001.
- GRÉMY-GROS, C., LANOISELLÉ, J.-L. e VOROBIEV, E. Application of high-voltage electrical discharges for the aqueous extraction from oilseeds and other plants. In: E. Vorobiev e N. I. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer 2008. Application of high-voltage electrical discharges for the aqueous extraction from oilseeds and other plants, p.217-235. (Food engineering series)
- GRIMI, N., LBOVKA, N., VOROBIEV, E. e VAXELAIRE, J. Effect of a pulsed electric field treatment on expression behavior and juice quality of chardonnay grape. *Food Biophysics*, v.4, n.3, p.191-198. 2009.
- GRIMI, N., MAMOUNI, F., LBOVKA, N., VOROBIEV, E. e VAXELAIRE, J. Acoustic impulse response in apple tissues treated by pulsed electric field. *Biosystems Engineering*, v.105, n.2, p.266-272. 2010.
- GRIMI, N., MAMOUNI, F., LBOVKA, N., VOROBIEV, E. e VAXELAIRE, J. Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, v.103, n.1, p.52-61. 2011.
- GROS, C., LANOISELLE, J. L. e VOROBIEV, E. Towards an alternative extraction process for linseed oil. *Chemical Engineering Research & Design*, v.81, n.A9, Oct, p.1059-1065. 2003.

- GUDERJAN, M., ELEZ-MARTÍNEZ, P. e KNORR, D. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.8, n.1, p.55-62. 2007.
- GUDERJAN, M., TÖPFL, S., ANGERSBACH, A. e KNORR, D. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering*, v.67, n.3, p.281-287. 2005.
- GUNSTONE, F. D. Vegetable oils. In: F. Shahidi (Ed.). *Bailey's industrial oil and fat products*. Hoboken: John Wiley & sons, 2005. Vegetable oils, p.213-267
- GYSIN, R., AZZI, A. e VISARIUS, T. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v.16, n.14, p.1952-1954. 2002.
- HAGERMAN, A. E., RIEDL, K. M., JONES, G. A., SOVIK, K. N., RITCHARD, N. T., HARTZFELD, P. W. e RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.5, 1998/05/01, p.1887-1892. 1998.
- HARNLY, J. M., DOHERTY, R. F., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., BHAGWAT, S. e GEBHARDT, S. Flavonoid content of us fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.26, Dec, p.9966-9977. 2006.
- HASLAM, E. e HAWORTH, R. D. The constituents of natural phenolic resins. Part xxiii. The constitution of sesamol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.32, p.827-833. 1955.
- HATAMI, T., CAVALCANTI, R. N., TAKEUCHI, T. M. e MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from macela (achyrocline satureioides) flowers: Kinetic, experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.65, n.0, p.71-77. 2012.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. e BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, n.10, p.572-584. 2002.
- HEMALATHA, S. e GHAFLOORUNISSA. Lignans and tocopherols in indian sesame cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.81, n.5, 2004/05/01, p.467-470. 2004.
- HEMALATHA, S. e GHAFLOORUNISSA. Sesame lignans enhance the thermal stability of edible vegetable oils. *Food Chemistry*, v.105, n.3, p.1076-1085. 2007.
- HERTOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. e KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet*, v.342, n.8878, p.1007-1011. 1993.
- HIBINO, M., ITOH, H. e KINOSITA JR, K. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal*, v.64, n.6, p.1789-1800. 1993.
- HO, C. H. L., CACACE, J. E. e MAZZA, G. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT - Food Science and Technology*, v.40, n.9, p.1637-1647. 2007.
- HOSNY, M. e ROSAZZA, J. P. N. Novel isoflavone, cinnamic acid, and triterpenoid glycosides in soybean molasses. *Journal of Natural Products*, v.62, n.6, 2012/08/22, p.853-858. 1999.
- HSU, D.-Z., CHU, P.-Y., CHANDRASEKARAN, V. R. M. e LIU, M.-Y. Sesame lignan sesamol protects against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. *Journal of Functional Foods*, v.1, n.4, p.349-355. 2009.

- HSU, D.-Z., CHU, P.-Y. e LIU, M.-Y. Extracts of sesame (*sesamum indicum* l.) seeds and gastric mucosal cytoprotection. In: (Ed.). *Nuts and seeds in health and disease prevention*. San Diego: Academic Press, 2011. Extracts of sesame (*sesamum indicum* l.) seeds and gastric mucosal cytoprotection, p.1019-1027
- HU, F. B., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E., RIMM, E. B., COLDITZ, G. A., ROSNER, B. A., SPEIZER, F. E., HENNEKENS, C. H. e WILLETT, W. C. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: Prospective cohort study. *British Medical Journal*, v.317, n.7169, p.1341-1345. 1998.
- HU, Q., XU, J., CHEN, S. e YANG, F. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*sesamum indicum* l.) by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.4, 2014/01/22, p.943-947. 2004.
- HUANG, K., YU, L., LIU, D., GAI, L. e WANG, J. Modeling of yeast inactivation of pef-treated chinese rice wine: Effects of electric field intensity, treatment time and initial temperature. *Food Research International*, v.54, n.1, p.456-467. 2013.
- HUDSON, B. J. e LEWIS, J. I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*, v.10, n.1, p.47-55. 1983a.
- HUDSON, B. J. F. e LEWIS, J. I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*, v.10, n.1, p.47-55. 1983b.
- HWANG, L. S. Sesame oil. In: F. Shahidi (Ed.). *Bailey's industrial oil and fat products*. Hoboken: John Wiley & sons, 2005. Sesame oil, p.537-576
- HYSON, D. A., SCHNEEMAN, B. O. e DAVIS, P. A. Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and ldl oxidation in healthy men and women. *Journal of Nutrition*, v.132, n.4, p.703-707. 2002.
- IBARZ, A. e BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. *Unit operations in food engineering*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2002 (Food preservation technology series)
- IFERE, G. O., BARR, E., EQUAN, A., GORDON, K., SINGH, U. P., CHAUDHARY, J., IGIETSEME, J. U. e ANANABA, G. A. Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. *Cancer Detection and Prevention*, v.32, n.4, p.319-328. 2009.
- IHARA, S., HIROHATA, T., KOMINATO, Y., YAMABE, C., IKE, H., HAKIAI, K., HIRABAYASHI, K. e TAMAGAWA, M. Water treatment using discharge generated in cavitation field with micro bubble cloud. *Electrical Engineering in Japan*, v.186, n.4, Mar, p.1-10. 2014.
- INYANG, U. E. e NWADIMKPA, C. U. Functional properties of dehulled sesame (*sesamum indicum* l.) seed flour. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.69, n.8, p.819-822. 1992.
- JAEGER, H., BALASA, A. e KNORR, D. Food industry applications for pulsed electric fields. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 2008. Food industry applications for pulsed electric fields, p.181-216. (Food engineering series)
- JAN, K. C., HWANG, L. S. e HO, C. T. Biotransformation of sesaminol triglucoside to mammalian lignans by intestinal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.14, Jul, p.6101-6106. 2009a.
- JAN, K. C., HWANG, L. S. e HO, C. T. Tissue distribution and elimination of sesaminol triglucoside and its metabolites in rat. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.53, n.7, Jul, p.815-825. 2009b.
- JAN, K. C., KU, K. L., CHU, Y. H., HWANG, L. S. e HO, C. T. Tissue distribution and elimination of estrogenic and anti-inflammatory catechol metabolites from sesaminol triglucoside in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, n.13, Jul, p.7693-7700. 2010.

- JEMAI, A. B. e VOROBIEV, E. Pulsed electric field assisted pressing of sugar beet slices: Towards a novel process of cold juice extraction. *Biosystems Engineering*, v.93, n.1, p.57-68. 2006.
- JEONG, S.-M., KIM, S.-Y., KIM, D.-R., JO, S.-C., NAM, K. C., AHN, D. U. e LEE, S.-C. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.11, 2012/08/22, p.3389-3393. 2004.
- JIANG, Q. e AMES, B. N.  $\Gamma$ -tocopherol, but not  $\alpha$ -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB Journal*, v.17, n.8, p.816-822. 2003.
- JOO, C. G., LEE, K. H., PARK, C., JOO, I. W., CHOE, T. B. e LEE, B. C. Correlation of increased antioxidation with the phenolic compound and amino acids contents of camellia sinensis leaf extracts following ultra high pressure extraction. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.18, n.2, p.623-628. 2012.
- KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J., RAUHA, J.-P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S. e HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n.10, 2012/08/22, p.3954-3962. 1999.
- KAMAL-ELDIN, A. e APPELQVIST, L.-A. The effects of extraction methods on sesame oil stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.72, n.8, p.967-969. 1995.
- KAMAL-ELDIN, A. e APPELQVIST, L. Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from four *sesamum* species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, n.2, p.149-156. 1994.
- KANDUSER, M. e MIKLAVCI, D. Electroporation in biological cell and tissue: An overview. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 2008. Electroporation in biological cell and tissue: An overview, p.1-37. (Food engineering series)
- KANG, M.-H., KAWAI, Y., NAITO, M. e OSAWA, T. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *The Journal of Nutrition*, v.129, n.10, October 1, 1999, p.1885-1890. 1999.
- KANU, P. J., KERUI, Z., MING, Z. H., HAIFENG, Q., KANU, J. B. e KE-XUE, Z. Sesame protein 11: Functional properties of sesame (*sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian Journal of Biochemistry*, v.2, n.5, p.289-301. 2007a.
- KANU, P. J., ZHOU, H. M., KANU, J. B., ZHU, K.-X., ZHU, K.-R. e QIAN, H. The use of response surface methodology in predicting sesame (*sesamum indicum* L.) protein extractability with water and the analysis of the protein extracted for its amino acid profile. *Biotechnology Advances*, v.6, n.4, p.447-455. 2007b.
- KNORR, D. e ANGERSBACH, A. Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science & Technology*, v.9, n.5, p.185-191. 1998.
- KNORR, D., GEULEN, M., GRAHL, T. e SITZMANN, W. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science & Technology*, v.5, n.3, p.71-75. 1994.
- KOIKE, K., LI, W., LIU, L. J., HATA, E. e NIKAIDO, T. New phenolic glycosides from the seeds of *cucurbita moschata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.53, n.2, Feb, p.225-228. 2005.
- KOTILAINEN, L., RAJALAHTI, R., RAGASA, C. e PEHU, E. Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. *Agriculture and Rural Development - World Food Bank*, v. Discussion Paper 30, p.82. 2006.
- KRASSOWSKA, W. e FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, v.92, n.2, p.404-417. 2007.

- KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E. e ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, v.113, n.9, Supplement 2, p.71-88. 2002.
- KRYGIER, K., SOSULSKI, F. e HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.30, n.2, 2012/08/22, p.330-334. 1982.
- KUBICKA, E., JEDRYCHOWSKI, L. e AMAROWICZ, R. Effect of phenolic compounds extracted from sunflower seeds on native lipoxygenase activity. *Grasas y Aceites*, v.50, n.2, p.127-130. 1999.
- LACHANCE, P. A. Nutraceuticals, for real. *Food Technology*, v.56, n.1, p.20. 2002.
- LACHANCE, P. A., NAKAT, Z. e JEONG, W. S. Antioxidants: An integrative approach. *Nutrition*, v.17, n.10, p.835-838. 2001.
- LAKSHMI, T. S. e NANDI, P. K. Aggregation, dissociation and denaturation of sesame (*Sesamum indicum* L.)  $\alpha$ -globulin in cetyl trimethyl ammonium bromide solution. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v.10, n.2, p.120-128. 1977.
- LAKSHMI, T. S. e NANDI, P. K. Dissociation, aggregation of sesame  $\alpha$ -globulin in nonionic detergent solution. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v.12, n.4, p.197-203. 1978.
- LAKSHMI, T. S. e NANDI, P. K. Studies on the effect of heat on the dissociation, denaturation, and aggregation of sesame  $\alpha$ -globulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.27, n.4, 2014/01/24, p.818-821. 1979.
- LATIF, S. e ANWAR, F. Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food Chemistry*, v.125, n.2, p.679-684. 2011.
- LAZAROU, D., GROUGNET, R. e PAPAPOULOS, A. Antimutagenic properties of a polyphenol-enriched extract derived from sesame-seed perisperm. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.634, n.1-2, p.163-171. 2007.
- LEBOVKA, N. I., BAZHAL, M. I. e VOROBIEV, E. Pulsed electric field breakage of cellular tissues: Visualisation of percolative properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.2, n.2, p.113-125. 2001.
- LEBOVKA, N. I., BAZHAL, M. I. e VOROBIEV, E. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, v.54, n.4, p.337-346. 2002.
- LEBOVKA, N. I., PRAPORSCIC, I. e VOROBIEV, E. Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.5, n.1, p.9-16. 2004.
- LEBOVKA, N. I., SHYNKARYK, N. V. e VOROBIEV, E. Pulsed electric field enhanced drying of potato tissue. *Journal of Food Engineering*, v.78, n.2, p.606-613. 2007.
- LEONARDIS, A. D., MACCIOLA, V. e ROCCO, A. D. Oxidative stabilization of cold-pressed sunflower oil using phenolic compounds of the same seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, p.523-528. 2003.
- LEONTIADOU, H., MARK, A. E. e MARRINK, S. J. Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers. *Biophysical Journal*, v.86, n.4, p.2156-2164. 2003.
- LIAO, C.-D., HUNG, W.-L., JAN, K.-C., YEH, A.-I., HO, C.-T. e HWANG, L. S. Nano/sub-microsized lignan glycosides from sesame meal exhibit higher transport and absorption efficiency in caco-2 cell monolayer. *Food Chemistry*, v.119, n.3, p.896-902. 2010a.
- LIAO, C. D., HUNG, W. L., LU, W. C., JAN, K. C., SHIH, D. Y. C., YEH, A. I., HO, C. T. e HWANG, L. S. Differential tissue distribution of sesaminol triglucoside and its metabolites in rats fed with lignan glycosides from sesame meal with or without nano/submicrosizing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, n.1, Jan, p.563-569. 2010b.

- LIU, M. Y., ZHANG, M. S., LIN, S. Y., LIU, J. B., YANG, Y. e JIN, Y. Optimization of extraction parameters for protein from beer waste brewing yeast treated by pulsed electric fields (pef). *African Journal of Microbiology Research*, v.6, n.22, Jun, p.4739-4746. 2012.
- LIYANA-PATHIRANA, C. e SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, v.93, n.1, p.47-56. 2005.
- LLAVERIAS, G., ESCOLÀ-GIL, J. C., LERMA, E., JULVE, J., PONS, C., CABRÉ, A., COFÁN, M., ROS, E., SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. e BLANCO-VACA, F. Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.24, n.1, p.39-48. 2013.
- LOCKE, B. R., SATO, M., SUNKA, P., HOFFMANN, M. J. e CHANG, J. S. Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Indust. Eng. Chem. Res.*, v.45, n.3, p.882-905. 2005.
- LOGINOV, M., BOUSSETTA, N., LEOVKA, N. e VOROBIEV, E. Separation of polyphenols and proteins from flaxseed hull extracts by coagulation and ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, v.442, n.0, p.177-186. 2013.
- LOGINOVA, K. V., LEOVKA, N. I. e VOROBIEV, E. Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, v.106, n.2, p.127-133. 2011a.
- LOGINOVA, K. V., VOROBIEV, E., BALS, O. e LEOVKA, N. I. Pilot study of countercurrent cold and mild heat extraction of sugar from sugar beets, assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, v.102, n.4, p.340-347. 2011b.
- LÓPEZ, G., FLORES, I., GÁLVEZ, A., QUIRASCO, M. e FARRÉS, A. Development of a liquid nutritional supplement using a sesamum indicum l. Protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, v.36, n.1, p.67-74. 2003.
- LÓPEZ, N., PUÉRTOLAS, E., CONDÓN, S., ÁLVAREZ, I. e RASO, J. Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: Influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, v.227, n.4, p.1099-1107. 2008a.
- LÓPEZ, N., PUÉRTOLAS, E., CONDÓN, S., ÁLVAREZ, I. e RASO, J. Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.9, n.4, p.477-482. 2008b.
- MACEK-LEBAR, A., KOPITAR, N. A., IHAN, A., SERSA, G. e MIKLAVCIC, D. Significance of treatment energy in cell electropermeabilization. *Electromagnetic Biology and Medicine*, v.17, n.2, 2014/01/13, p.255-262. 1998.
- MACEK-LEBAR, A. e MIKLAVCIC, D. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: Control by pulse parameters. *Radiologica Oncology*, v.35, p.193-202. 2001.
- MAHAWAR, M., SINGH, A. e JALGAONKAR, K. Utility of apple pomace as a substrate for various products: A review. *Food and Bioproducts Processing*, v.90, n.4, p.597-605. 2012.
- MAILLARD, M.-N. e BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, n.7, 1995/07/01, p.1789-1793. 1995.
- MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SCALBERT, A. e RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.81, p.230S-242S. 2005.
- MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.12, 2002/06/01, p.3444-3452. 2002.

- MCLELLAN, M. R., KIME, R. L. e LIND, L. R. Electroporation and other treatments to improve apple juice yield. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.57, n.2, p.303-306. 1991.
- MENNEN, L. I., WALKER, R., BENNETAU-PELISSERO, C. e SCALBERT, A. Risks and safety of polyphenol consumption. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.81, p.326S-329S. 2005.
- MEYER, A. S., HEINONEN, M. e FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human ldl oxidation. *Food Chemistry*, v.61, n.1-2, p.71-75. 1998.
- MICHAILIDES, M., CHRISTOU, G., AKRATOS, C. S., TEKERLEKOPOULOU, A. G. e VAYENAS, D. V. Composting of olive leaves and pomace from a three-phase olive mill plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.65, n.3, p.560-564. 2011.
- MIDDLETON JR., E., KANDASWAMI, C. e THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v.52, n.4, p.673-751. 2000.
- MIETTINEN, T. A., PUSKA, P., GYLLING, H., VANHANEN, H. e VARTIAINEN, E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *New England Journal of Medicine*, v.333, n.20, p.1308-1312. 1995.
- MIKLAVCIC, D. e TOWHIDI, L. Numerical study of the electroporation pulse shape effect on molecular uptake of biological cells. *Radiology and Oncology*. 44: 34 p. 2010.
- MILIC, B. L. J., DJILAS, S. M. e CANADANOVIC-BRUNET, J. M. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, v.61, n.4, p.443-447. 1998.
- MIYAHARA, Y., HIBASAMI, H., KATSUZAKI, H., IMAI, K. e 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.
- MOAZZAMI, A. A., ANDERSSON, R. E. e KAMAL-ELDIN, A. Characterization and analysis of sesamol diglucoside in sesame seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.70, n.6, p.1478-1481. 2006a.
- MOAZZAMI, A. A., ANDERSSON, R. E. e KAMAL-ELDIN, A. Hplc analysis of sesamol glucosides in sesame seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.3, 2012/11/12, p.633-638. 2006b.
- MOHDALY, A. A. A., SARHAN, M. A., SMETANSKA, I. e MAHMOUD, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.90, n.2, p.218-226. 2010.
- MOHDALY, A. A. A., SMETANSKA, I., RAMADAN, M. F., SARHAN, M. A. e MAHMOUD, A. Antioxidant potential of sesame (*sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, v.34, n.1, p.952-959. 2011.
- MOLLER, J. K. S., LINDBERG MADSEN, H., AALTONEN, T. e SKIBSTED, L. H. Dittany (*origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, v.64, n.2, p.215-219. 1999.
- MORGAN, W. A. e CLAYSHULTE, B. J. Pecans lower low-density lipoprotein cholesterol in people with normal lipid levels. *Journal of the American Dietetic Association*, v.100, n.3, p.312-318. 2000.
- MOUBARIK, A., EL-BELGHITI, K. e VOROBIEV, E. Kinetic model of solute aqueous extraction from fennel (*foeniculum vulgare*) treated by pulsed electric field, electrical discharges and ultrasonic irradiations. *Food and Bioproducts Processing*, v.89, n.4, p.356-361. 2011.

- MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J. e PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v.72, n.2, p.145-171. 2001.
- MOURE, A., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H. e PARAJÓ, J. C. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, v.39, n.9, p.945-963. 2006.
- NACZK, M., OICKLE, D., PINK, D. e SHAHIDI, F. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: Effect of ph, tannin, and protein concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, n.8, 2012/08/22, p.2144-2148. 1996.
- NAKANO, D., KURUMAZUKA, D., NAGAI, Y., NISHIYAMA, A., KISO, Y. e MATSUMURA, Y. Dietary sesamin suppresses aortic nadph oxidase in doca salt hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.35, n.3, p.324-326. 2008.
- NAMIKI, M. The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Reviews International*, v.11, n.2, 1995/05/01, p.281-329. 1995.
- NEMES, S. e ORSAT, V. Evaluation of a microwave-assisted extraction method for lignan quantification in flaxseed cultivars and selected oil seeds. *Food Analytical Methods*, v.5, n.3, 2012/06/01, p.551-563. 2012.
- NGUYEN, P. e MITTAL, G. S. Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (pef) with and without antimicrobials. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.46, n.4, p.360-365. 2007.
- NONAKA, M., YAMASHITA, K., IIZUKA, Y., NAMIKI, M. e SUGANO, M. Effects of dietary sesaminol and sesamin on eicosanoid production and immunoglobulin level in rats given ethanol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.61, n.5, p.836-839. 1997.
- ONWELUZO, J. C., OBANU, Z. A. e ONUOHA, K. C. Functional properties of some lesser known tropical legumes. *Journal of Food Science and Technology*, v.31, p.302-306. 1994.
- OOMAH, B. D., KENASCHUK, E. O. e MAZZA, G. Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, n.8, 2012/08/22, p.2016-2019. 1995.
- PARR, A. J. e BOLWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, n.7, p.985-1012. 2000.
- PATARO, G., DE LISI, M., DONSI, G. e FERRARI, G. Microbial inactivation of e. Coli cells by a combined pef-hpcd treatment in a continuous flow system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2013.
- PAVLIN, M., LEBEN, V. e MIKLAVÄÄ, D. Electroporation in dense cell suspension – theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v.1770, n.1, p.12-23. 2007.
- PERICIN, D., KRIMER, V., TRIVIC, S. e RADULOVIC, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. *Food Chemistry*, v.113, n.2, p.450-456. 2009.
- PLUMB, G. W., PRICE, K. R. e WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. *Redox Report*, v.4, n.3, p.123-127. 1999a.
- PLUMB, G. W., PRICE, K. R. e WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Report*, v.4, n.1-2, p.13-16. 1999b.
- POMPEU, D. R., SILVA, E. M. e ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of euterpe oleracea using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v.100, n.23, p.6076-6082. 2009.
- PRADHAN, R. C., MISHRA, S., NAIK, S. N., BHATNAGAR, N. e VIJAY, V. K. Oil expression from jatropha seeds using a screw press expeller. *Biosystems Engineering*, v.109, n.2, p.158-166. 2011.



- PRAKASH, V. Effect of sodium chloride on the extractability of proteins from sesame seed (*sesamum indicum* l). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.34, n.2, 2014/01/24, p.256-259. 1986.
- PRAKASH, V. e NANDI, P. K. Association-dissociation and denaturation behaviour of an oligomeric seed protein  $\alpha$ -globulin of *sesamum indicum* l. In acid and alkaline solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v.9, n.5, p.319-328. 1977.
- PRAPORSCIC, I., GHNIMI, S. e VOROBIEV, E. Enhancement of pressing of sugar beet cuts by combined ohmic heating and pulsed electric field treatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.29, n.5-6, p.378-389. 2005.
- PRASAD, K. M. N., ISMAIL, A., SHI, J. e JIANG, Y. High pressure - assisted extraction. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011a. High pressure - assisted extraction, p.303-322. (Contemporary food engineering)
- PRASAD, K. N., HASSAN, F. A., YANG, B., KONG, K. W., RAMANAN, R. N., AZLAN, A. e ISMAIL, A. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised mangifera pajang kosterm. Peels. *Food Chemistry*, v.128, n.4, p.1121-1127. 2011b.
- PRASAD, K. N., YANG, E., YI, C., ZHAO, M. e JIANG, Y. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.10, n.2, p.155-159. 2009.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NOHYNEK, L., MEIER, C., KÄHKÖNEN, M., HEINONEN, M., HOPIA, A. e OKSMAN-CALDENTY, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, v.90, n.4, p.494-507. 2001.
- QUINN, L. A. e TANG, H. H. Antioxidant properties of phenolic compounds in macadamia nuts. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.73, n.11, Nov, p.1585-1588. 1996.
- RAINEY, C. e NYQUIST, L. Nuts-nutrition and health benefits of daily use. *Nutrition Today*, v.32, n.4, p.157-163. 1997.
- RAMACHANDRAN, S., SINGH, S. K., LARROCHE, C., SOCCOL, C. R. e PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications - a review. *Bioresource Technology*, v.98, n.10, p.2000-2009. 2007.
- RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., NAMIKI, M. e KAWAKISHI, S. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a c-glycosyl flavonoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.37, n.2, p.316-319. 1989.
- RANGKADILOK, N., PHOLPHANA, N., MAHIDOL, C., WONGYAI, W., SAENGSOOKSREE, K., NOOKABKAEW, S. e SATAYAVIVAD, J. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*sesamum indicum* l.) seeds and oil products in thailand. *Food Chemistry*, v.122, n.3, p.724-730. 2010.
- REIS, S. F., RAI, D. K. e ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry*, v.135, n.3, p.1991-1998. 2012.
- RESHMA, M. V., BALACHANDRAN, C., ARUMUGHAN, C., SUNDERASAN, A., SUKUMARAN, D., THOMAS, S. e SARITHA, S. S. Extraction, separation and characterisation of sesame oil lignan for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, v.120, n.4, p.1041-1046. 2010.
- RIVAS, N. R., DENCH, J. E. e CAYGILL, J. C. Nitrogen extractability of sesame (*sesamum indicum* l.) seed and the preparation of two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.32, n.6, p.565-571. 1981.
- ROBERFROID, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition*, v.88, n.SupplementS2, p.S133-S138. 2002.

- RODIS, P. S., KARATHANOS, V. T. e MANTZAVINO, A. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.3, p.596-601. 2002.
- RODRIGUES, I. M., COELHO, J. F. J. e CARVALHO, M. G. V. S. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, v.109, n.3, p.337-346. 2012.
- RODRIGUES, S., PINTO, G. A. S. e FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (cocos nucifera) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.15, n.1, p.95-100. 2008.
- ROLS, M. P. e TEISSIÉ, J. Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophysical Journal*, v.58, n.5, p.1089-1098. 1990.
- SABIR, M. A., SOSULSKI, F. W. e KERNAN, J. A. Phenolic constituents in sunflower flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.22, n.4, 1974/07/01, p.572-574. 1974.
- SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N., PROVOST, C. e VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, n.2, 2012/08/22, p.425-431. 1999.
- SANGNARK, A. e NOOMHORM, A. Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Research International*, v.37, n.1, p.66-74. 2004.
- SANKAR, D., SAMBANDAM, G., RAMAKRISHNA RAO, M. e PUGALENDI, K. V. Modulation of blood pressure, lipid profiles and redox status in hypertensive patients taking different edible oils. *Clinica Chimica Acta*, v.355, n.1-2, p.97-104. 2005.
- SANT'ANNA, V., BRANDELLI, A., MARCZAK, L. D. F. e TESSARO, I. C. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology*, v.100, n.0, p.82-87. 2012.
- SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.10, 2012/08/17, p.4303-4306. 1998.
- SAVOIRE, R., LANOISELLE, J. L. e VOROBIEV, E. Mechanical continuous oil expression from oilseeds: A review. *Food and Bioprocess Technology*, v.6, n.1, Jan, p.1-16. 2013.
- SCHIEBER, A., STINTZING, F. C. e CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, v.12, n.11, p.401-413. 2001.
- SCHMIDT, T. J., KLAES, M. e SENDKER, J. Lignans in seeds of linum species. *Phytochemistry*, v.82, Oct, p.89-99. 2012.
- SERAFINI, M., GHISELLI, A. e FERRO-LUZZI, A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European journal of clinical nutrition*, v.50, n.1, p.28-32. 1996.
- SHAHIDI, F., ALASALVAR, C. e LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (corylus avellana l.) and hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.4, 2007/02/01, p.1212-1220. 2007.
- SHAHIDI, F., AMAROWICZ, R., ABU-GHARBIA, H. A. e SHEHATA, A. A. J. Endogenous antioxidants and stability of sesame oil as affected by processing and storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.74, p.143-148. 1997.
- SHAHIDI, F., LIYANA-PATHIRANA, C. M. e WALL, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, v.99, n.3, p.478-483. 2006.
- SHAHIDI, F. e NACZK, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004
- SHARMA, A. e 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.

- SHEABAR, F. Z. e NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.65, n.6, p.990-993. 1988.
- SHYMKARYK, M. V., LBOVKA, N. I. e VOROBIEV, E. Pulsed electric fields and temperature effects on drying and rehydration of red beetroots. *Drying Technology*, v.26, n.6, 2014/01/14, p.695-704. 2008.
- SHYU, Y.-S. e HWANG, L. S. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted burma black sesame meal. *Food Research International*, v.35, n.4, p.357-365. 2002.
- SIEMER, C., TOEPFL, S. e HEINZ, V. Inactivation of *bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (pef) in combination with thermal energy - ii. Modeling thermal inactivation of *b. Subtilis* spores during pef processing in combination with thermal energy. *Food Control*, v.39, p.244-250. 2014a.
- SIEMER, C., TOEPFL, S. e HEINZ, V. Inactivation of *bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (pef) in combination with thermal energy - i. Influence of process and product parameters. *Food Control*, v.39, p.163-171. 2014b.
- SILVA, E. M., ROGEZ, H. e LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, v.55, n.3, p.381-387. 2007.
- SILVA, E. R. D., MARTINO, H. S. D., MOREIRA, A. V. B., ARRIEL, N. H. C., SILVA, A. C. e RIBEIRO, S. M. R. Antioxidant capacity and chemical composition of whole grains of cream and black sesame. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.46, n.7, Jul, p.736-742. 2011.
- SINGH, K. K., WIESENORN, D. P., TOSTENSON, K. e KANGAS, N. Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.79, n.2, 2002/02/01, p.165-170. 2002.
- SOSULSKI, F., KRYGIER, K. e HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.30, n.2, p.337-340. 1982.
- SOTO-VACA, A., GUTIERREZ, A., LOSSO, J. N., XU, Z. e FINLEY, J. W. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.27, 2012/07/11, p.6658-6677. 2012.
- SUGANO, A., INOUE, T., KOBE, K., YOSHIDA, K., HIROSE, N., AKIMOTO, Y. e AMASHI, T. Influence of sesame lignans on various lipid parameters in rats. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.54, p.2669-2673. 1990.
- SUJA, K. P., ABRAHAM, J. T., THAMIZH, S. N., JAYALEKSHMY, A. e ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, v.84, n.3, p.393-400. 2004.
- SUJA, K. P., JAYALEKSHMY, A. e ARUMUGHAN, C. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, v.91, n.2, p.213-219. 2005.
- SUN, B., SATO, M., HARANO, A. e CLEMENTS, J. S. Non-uniform pulse discharge-induced radical production in distilled water. *Journal of Electrostatics*, v.43, n.2, p.115-126. 1998.
- TABART, J., KEVERS, C., SIPEL, A., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.-O. e DOMMES, J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry*, v.105, n.3, p.1268-1275. 2007.
- TAHA, F. S., FAHMY, M. e SADEK, M. A. Low-phytate protein concentrate and isolate from sesame seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.35, n.3, 1987/05/01, p.289-292. 1987.
- TAKEOKA, G. R. e DAO, L. T. Antioxidant constituents of almond [*prunus dulcis* (mill.) d.A. Webb] hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.2, 2011/11/28, p.496-501. 2002.

- TEISSIÉ, J., EYNARD, N., GABRIEL, B. e ROLS, M. P. Electroporation of cell membranes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.35, n.1, p.3-19. 1999.
- TEISSIÉ, J., GOLZIO, M. e ROLS, M. P. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v.1724, n.3, p.270-280. 2005.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A., SOMOZA, V. e FINLEY, J. Food bioactives research and the journal of agricultural and food chemistry. Symposium introduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.27, 2012/07/11, p.6641-6643. 2012.
- TOOR, R. K. e SAVAGE, G. P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*, v.38, n.5, p.487-494. 2005.
- TORRES, J. L. e BOBET, R. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthioflavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.10, 2012/08/22, p.4627-4634. 2011.
- TOURE, A. e XU, X. M. Flaxseed lignans: Source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, n.3, May, p.261-269. 2010.
- TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, v.60, n.2, p.297-306. 1991.
- ULMER, H. M., HEINZ, V., GÄNZLE, M. G., KNORR, D. e VOGEL, R. F. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, n.2, p.326-335. 2002.
- USDA. Nutrient database for standard reference. Research Service: U.S. Department of Agriculture 2012.
- VALTUEÑA, S., PELLEGRINI, N., FRANZINI, L., BIANCHI, M. A., ARDIGÒ, D., DEL RIO, D., PIATTI, P., SCAZZINA, F., ZAVARONI, I. e BRIGHENTI, F. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.87, n.5, May 2008, p.1290-1297. 2008.
- VELIOGLU, Y. S., MAZZA, G., GAO, L. e OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.10, 1998/10/01, p.4113-4117. 1998.
- VENKATACHALAM, M. e SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.13, 2006/06/01, p.4705-4714. 2006.
- VISAVADIYA, N. P. e NARASIMHACHARYA, A. V. R. L. Sesame as a hypocholesterolemic and antioxidant dietary component. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.6, p.1889-1895. 2008.
- VITO, F., FERRARI, G., LEBOVKA, N., SHYNKARYK, N. e VOROBIEV, E. Pulse duration and efficiency of soft cellular tissue disintegration by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, v.1, n.4, 2008/12/01, p.307-313. 2008.
- VOROBIEV, E. e LEBOVKA, N. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 2008. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications, p.39-81. (Food engineering series)
- VOROBIEV, E. e LEBOVKA, N. I. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: J. Raso e V. Heinz (Ed.). *Pulsed electric fields technology for the food industry. Fundamentals and applications*. New York: Springer, 2006. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields, p.153-194

- VOROBIEV, E. e LBOVKA, N. I. Pulse electric field-assisted extraction. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Pulse electric field-assisted extraction, p.25-84. (Contemporary food engineering)
- WANASUNDARA, U., AMAROWICZ, R. e SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, n.6, p.1285-1290. 1994.
- WANASUNDARA, U. N. e SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, v.63, n.3, p.335-342. 1998.
- WANG, L. e WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, v.17, n.6, p.300-312. 2006.
- WATANABE, M., OHSHITA, Y. e TSUSHIDA, T. Antioxidant compounds from buckwheat (*fagopyrum esculentum möench*) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, n.4, p.1039-1044. 1997.
- WEAVER, J. C. e CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v.41, n.2, p.135-160. 1996.
- WEISZ, G. M., KAMMERER, D. R. e CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*helianthus annuus l.*) kernels and shells by hplc-dad/esimn. *Food Chemistry*, v.115, n.2, p.758-765. 2009.
- WHO, W. H. O. *Fact sheets: Chronic diseases*. [http://www.who.int/topics/chronic\\_diseases/factsheets/en/index.html](http://www.who.int/topics/chronic_diseases/factsheets/en/index.html). Acessado
- WILLEMS, P., KUIPERS, N. J. M. e DE HAAN, A. B. Hydraulic pressing of oilseeds: Experimental determination and modeling of yield and pressing rates. *Journal of Food Engineering*, v.89, n.1, p.8-16. 2008.
- WILLIAMSON, K. S., MORRIS, J. B., PYE, Q. N., KAMAT, C. D. e HENSLEY, K. A survey of sesamin and composition of tocopherol variability from seeds of eleven diverse sesame (*sesamum indicum l.*) genotypes using hplc-pad-ecd. *Phytochemical Analysis*, v.19, n.4, p.311-322. 2008.
- WOLF, H., ROLS, M. P., BOLDT, E., NEUMANN, E. e TEISSIÉ, J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal*, v.66, n.2, Part 1, p.524-531. 1994.
- WOLLGAST, J. e ANKLAM, E. Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health? *Food Research International*, v.33, n.6, p.449-459. 2000.
- XIE, L. Y., ROTO, A. V. e BOLLING, B. W. Characterization of ellagitannins, gallotannins, and bound proanthocyanidins from california almond (*prunus dulcis*) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.49, Dec, p.12151-12156. 2012.
- XU, L. e DIOSADY, L. L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research International*, v.35, n.1, p.23-30. 2002.
- YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, n.10, p.1573-1580. 2009.
- YANG, J., LIU, R. H. e HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, n.1, p.1-8. 2009.
- YILMAZ, E. E., ÖZVURAL, E. B. e VURAL, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.55, n.3, p.924-928. 2011.
- YOKOTA, T., MATSUZAKI, Y., KOYAMA, M., HITOMI, T., KAWANAKA, M., ENOKI-KONISHI, M., OKUYAMA, Y., TAKAYASU, J., NISHINO, H., NISHIKAWA, A., OSAWA, T. e SAKAI, T. Sesamin, a lignan of sesame, down-regulates cyclin d1 protein expression in human tumor cells. *Cancer Science*, v.98, n.9, p.1447-1453. 2007.

YOSHIDA, H. e TAKAGI, S. Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*sesamum indicum*) oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.75, n.1, p.19-26. 1997.

ZDUNCZYK, Z., MINAKOWSKI, D., FREJNAGEL, S. e FLIS, M. Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein. *Nahrung-Food*, v.43, n.6, Dec, p.392-395. 1999.

ZHANG, H.-Y. Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.76, n.6, p.745-748. 1999.

ZHANG, Q.-A., ZHANG, Z.-Q., YUE, X.-F., FAN, X.-H., LI, T. e CHEN, S.-F. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry*, v.116, n.2, p.513-518. 2009.

ZHANG, Q., BARBOSA-CÁ;NOVAS, G. V. e SWANSON, B. G. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*, v.25, n.2, p.261-281. 1995.

ZHANG, Z.-S., LI, D., WANG, L.-J., OZKAN, N., CHEN, X. D., MAO, Z.-H. e YANG, H.-Z. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, v.57, n.1, p.17-24. 2007.

ZIMMERMANN, U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, v.694, n.3, p.227-277. 1982.

ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. e RIEMANN, F. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*, v.14, n.11, p.881-899. 1974.

ZUCKERMAN, H., KRASIK, Y. E. e FELSTEINER, J. Inactivation of microorganisms using pulsed high-current underwater discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.3, n.4, p.329-336. 2002.

### **CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES TORTAS DERIVADAS DA PRODUÇÃO DE ÓLEO COMESTÍVEL**

Neste capítulo é apresentado o estudo de caracterização de diferentes tortas de nozes e sementes provenientes indústria de óleo comestível. Especificamente foi avaliado o teor de diferentes classes de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de oito diferentes tortas e os resultados obtidos foram comparados. São apresentadas as metodologias utilizadas para caracterização dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante das tortas. Posteriormente, são demonstrados e discutidos os resultados obtidos, sendo realizada uma comparação entre as tortas estudadas. Esses resultados estão apresentados na forma de artigo, na língua inglesa.

#### **3.1 Materiais e métodos**

##### ***3.1.1 Preparo das tortas***

As tortas das nozes amêndoa (*Prunus dulcis*), avelã (*Corylus avellana*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), pecã (*Carya illinoensis*) e das sementes de abóbora (*Cucurbita moschata*), gergelim (*Sesamun indicum*), girassol (*Helianthus annuus*) e linhaça (*Linum usitalissimum*) utilizadas nesse trabalho foram fornecidas pela empresa *Vital Átman* situada em Uchoa, São Paulo, Brasil. A empresa é produtora de óleos a partir dessas nozes e sementes; o processo de produção é constituído apenas pelas etapas de prensagem a frio e decantação dos

sólidos. As tortas são provenientes da etapa de prensagem. Previamente às análises, as amostras foram trituradas, usando liquidificador de inox (Siemsem, modelo LI-1,5, Brasil), passadas por uma peneira com abertura de mesh 8 (2,36 mm) e homogeneizadas a fim de minimizar os erros experimentais. As amostras foram mantidas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

Previamente ao processo de extração, a torta de gergelim passou pela etapa de desengorduramento. Esse processo foi necessário devido ao alto teor de gordura presente nas amostras. A gordura foi detectada durante uma tentativa inicial de extração dos compostos fenólicos e tornou o extrato obtido turvo, impossibilitando as análises espectrofotométricas. Para o processo de desengorduramento, 5 g de amostra ( $\pm 1\text{ g}$ ) foram colocadas em cartuchos extratores, que foram inseridos em um extrator de gordura (*Tecnal*, modelo TE-044, Brasil), demonstrado na Figura 3.1. Inicialmente, os cartuchos foram imersos em 50 mL de hexano a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , após uma hora os cartuchos foram suspensos e a temperatura do equipamento modificada para  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os cartuchos foram mantidos suspensos e o hexano passou por inúmeros ciclos de evaporação e condensação por um período de duas horas. As amostras foram coletadas em cápsulas e secas a temperatura ambiente por 1,5 h até a completa evaporação do hexano. Esse processo não foi realizado para as demais tortas porque o extrato obtido a partir delas não apresentou turbidez e as análises puderam ser realizadas de forma satisfatória.



Figura 3.1 – Equipamento extrator de gordura.



### *Determinação da umidade*

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, de acordo com metodologia da AOAC (1990). Este método consiste em pesar, em balança analítica, com precisão de 0,0001 g (*BOSH*, modelo SAE 200, Alemanha), 5 g de amostra em uma cápsula de alumínio previamente seca e colocar em estufa (De Leo, modelo A3, Brasil) a 105 °C. As amostras foram deixadas durante a noite na estufa e pesadas após, aproximadamente, 15 h. A umidade foi calculada através da diferença de massa antes e após a secagem da água, utilizando a Equação 3.1 e o resultado obtido em porcentagem. Todas as análises de umidade deste trabalho foram realizadas em triplicata.

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

onde,  $x^w$  é a umidade em porcentagem,  $m_{au}$  é a massa de amostra úmida e  $m_{as}$  é a massa de amostra seca. Os valores de umidade obtidos foram utilizados para apresentação dos resultados em base seca.

Para o gergelim, foi realizada uma nova análise de umidade a fim de se verificar se a torta absorveu água durante o processo de desgorduramento. Esse valor de umidade foi utilizado para expressão dos resultados referentes a essa torta.

### **3.1.2 Extração dos compostos fenólicos**

Comumente, a recuperação de compostos bioativos de fontes naturais é efetuada pelo processo de extração sólido-líquido empregando solventes orgânicos. Métodos alternativos a esse processo são: a extração assistida por ultrassom ou micro-ondas, a extração utilizando campo elétrico pulsado ou moderado ou a extração supercrítica (Wang e Weller, 2006). Diversos fatores influenciam os processos de extração como o tipo de solvente, a temperatura, o tempo, a relação soluto-solvente, o número de ciclos, entre outros. Esta etapa do trabalho teve como objetivo realizar uma análise preliminar comparativa entre as tortas, portanto, a influência desses parâmetros não foi avaliada e essas variáveis foram pré-fixadas. As variáveis envolvidas no processo de extração serão abordadas de forma mais aprofundada no Capítulo 4.

A extração foi realizada utilizando solventes orgânicos dissolvidos em água, estudos demonstram que a adição de água aumenta a eficiência da extração até que seja alcançado um limite máximo (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). O solvente escolhido para a extração foi uma mistura de etanol 96 % P.A. (Vetec, Brasil) e água destilada contendo 80 % etanol. Apesar de, em alguns casos, solventes como a acetona e o metanol apresentarem melhores rendimentos de extração (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008), esses solventes são tóxicos, e devem ser completamente removidos previamente à aplicação em alimentos; como a aplicação como ingrediente em alimentos é um dos empregos do extrato obtido nesse trabalho, foi escolhido o etanol como solvente extrator.

A extração foi realizada em um *shaker* (Cientec, CT 712RN, Brasil), com rotação de 250 rpm, utilizando um ciclo de 1 h e a razão sólido-solvente foi de 1:5. Aproximadamente 5 g de amostra foram pesados em balança analítica (BOSH, modelo SAE 200, Alemanha), sendo o peso anotado para posterior correção, e diluídos em 25 mL do solvente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Cientec, modelo CT 5000R, Brasil) por 30 min, a 4757 g e a temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi coletado em balão volumétrico de 25 mL e seu volume foi ajustado utilizando a solução extratora. O extrato contendo os compostos fenólicos foi, então, armazenado refrigerado até o momento das análises. Tanto as extrações, quanto as análises apresentadas a seguir, foram realizadas em triplicata.

### **3.1.3 Análises espectrofotométricas dos compostos fenólicos**

#### *Varredura*

A análise de absorvância utilizando a espectroscopia na faixa do ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica útil para avaliação da estrutura dos compostos fenólicos presentes nos extratos. Os compostos fenólicos exibem duas principais bandas de absorção: a primeira banda na faixa de 320 e 380 nm e a segunda entre 250 e 280 nm (Matthäus, 2002). Foi realizada uma varredura das absorvâncias dos extratos na faixa entre 200 e 800 nm. Para que os valores de absorvância se mantivessem dentro da faixa de leitura do espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 1E, Estados Unidos) durante a varredura, os extratos foram diluídos na solução extratora em diferentes proporções.

*Análise de compostos fenólicos totais*

Dentre os possíveis padrões para análise de compostos fenólicos estão o ácido tânico, a catequina, o ácido cinâmico e o ácido gálico. Para este trabalho foi escolhido como padrão o ácido gálico. Esse padrão é comumente empregado na análise utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC), sendo essa análise e esse padrão escolhidos por serem amplamente utilizados, facilitando a comparação com dados da literatura (Waterhouse, 2002). A colorimetria do método de Folin-Ciocalteu é baseada na redução química do reagente, composto por uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio. Os produtos da redução desses óxidos são de coloração azul e apresentam alta absorção da luz, tendo sua absorbância máxima no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 765 nm, sendo a intensidade da absorção de luz nesse  $\lambda$  proporcional à concentração de fenólicos (Waterhouse, 2002).

A metodologia de avaliação dos compostos fenólicos utilizada neste trabalho foi adaptada de Waterhouse (2002). Para avaliação do teor de fenólicos totais nas amostras, 40  $\mu$ L de extrato (ou padrão de ácido gálico, no caso da curva de calibração) foram adicionados de 3,2 mL de água destilada e 200  $\mu$ L do reagente de FC, a mistura foi levemente agitada e deixada no escuro por 5 min em um tubo Falcon de 15 mL. Após esse período, a solução foi adicionada de 600  $\mu$ L de uma solução saturada de carbonato de sódio, agitada em vortex (Phoenix Luferco, modelo AP 56, Brasil) por alguns segundos e deixada no escuro, a temperatura ambiente por 1 h. Por fim, as amostras foram transferidas para cubetas de plástico e foram realizadas as medidas de absorbância utilizando um espectrofotômetro (*Pró-Análise*, modelo UV 1600, Brasil) e  $\lambda$  igual a 765 nm. Os resultados são apresentados na forma de mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de amostra em base seca. O branco foi elaborado da mesma forma que as amostras para evitar a leitura de compostos interferentes, apenas substituindo o extrato por água destilada. O valor obtido para o branco foi lido no espectrofotômetro e diminuído das absorbâncias encontradas para as amostras.

Para quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado um padrão externo, preparado separadamente da amostra. A calibração foi realizada através da elaboração de uma curva de calibração, obtendo-se o sinal de resposta (absorbância) como função da concentração conhecida do analito. Para elaboração da curva padrão foram elaboradas soluções de ácido gálico (Dinâmica Química, Diadema, Brasil) com as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm. Em todas as análises espectrofotométricas, as curvas de calibração foram elaboradas diversas vezes durante os experimentos devido a sua variação

com diferentes reagentes e a possíveis alterações do espectrofotômetro. Em todos os casos foi obtido um coeficiente de determinação superior a 0,99. Um exemplo de curva de calibração é apresentado na Figura 3.2.

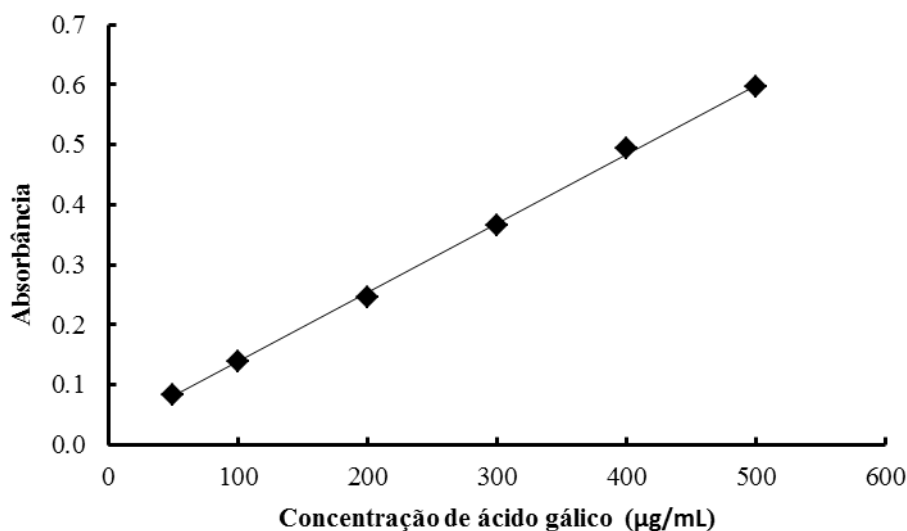


Figura 3.2 – Curva de calibração da absorbância versus a concentração de ácido gálico utilizada para determinação do teor de compostos fenólicos totais ( $R^2 = 0,9992$ ).

#### *Análise de taninos condensados ou proantocianidinas*

Para os extratos em estudo, foi realizada análise de taninos condensados utilizando o método da vanilina. O método vanilina depende da reação da vanilina com os taninos condensados para formação de complexos coloridos (Monteiro *et al.*, 2005). Embora o reagente da vanilina detecte tanto flavonoides monoméricos quanto poliméricos, ele é específico para uma classe limitada de compostos. Leucoantocianidinas (catequinas) e proantocianidinas (taninos) reagem com a vanilina na presença de HCl para produzir um produto de condensação vermelho (Agostini-Costa *et al.*, 2003). Procedeu-se de acordo com Price *et al.* (1978), utilizando a metodologia adaptada por Villarreal-Lozoya *et al.* (2007) e realizando algumas modificações que serão descritas a seguir.

Em tubos Falcon de 15 mL, foram coletadas alíquotas de 500 µL das amostras sendo, para elaboração do branco, utilizados 500 µL de metanol grau analítico. Essas alíquotas foram adicionadas de 5 mL de solução de vanilina. A solução de vanilina foi elaborada adicionando-se 0,5 g de vanilina em 200 mL de uma solução de metanol contendo 4 % de HCl (v/v). Para o branco foram adicionados 5 mL da solução de HCl 4 % em metanol, não sendo utilizada a vanilina. Os tubos foram agitados em um vortex por alguns segundos, mantidos ao abrigo da

luz por um período de 15 min e as medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (*Pró-Análise*, modelo UV 1600, Brasil) com comprimento de onda de 500 nm. O valor da absorvância das amostras foi corrigido com o branco e a quantificação dos resultados foi realizada através da elaboração de uma curva de calibração, utilizando como padrão a (-) – epicatequina (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) diluída em metanol, assim, os resultados foram expressos como mg de equivalentes de epicatequina por 100 g de amostra seca (mg EE/100 g). As curvas de calibração utilizando o padrão foram elaboradas na faixa entre 250 e 5000 ppm e sempre resultaram em coeficientes de determinação de 0,99 ou maiores.

#### *Análise de flavan-3-óis ou monômeros de procianidinas*

O teor de flavan-3-óis foi determinado através da coloração azulada apresentada por esses compostos ao reagirem com aldeídos aromáticos, conforme primeiramente observado por Thies e Fischer (1971). A quantidade desses compostos nas amostras foi determinada pelo método de Li *et al.* (1996) conforme descrito por Arnous *et al.* (2001). Inicialmente, foi elaborada uma solução de 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (DMACA) (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) através da diluição do reagente em uma solução acidificada de metanol (HCl 1M) na concentração de 0,1 %. Uma amostra de 0,4 mL de cada extrato foi adicionada 2 mL da solução de DMACA. A mistura foi agitada em um vortex e deixada no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi elaborado um branco, no qual 0,4 mL de metanol foi misturado à solução de DMACA. As leituras do branco e das amostras foram realizadas no comprimento de onda de 640 nm e o valor obtido para o branco foi descontado da absorvância das amostras.

A concentração de monômeros de procianidinas nas amostras foi determinada através da elaboração de uma curva de calibração utilizando a (-) – epicatequina (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) como padrão. A faixa de concentração usada foi de 0,5 a 7,5 ppm e o coeficiente de determinação das curvas ficou sempre acima de 0,99. Assim como para os taninos, os resultados foram expressos como em mg EE/100 g.

### *Análise de flavonoides*

O teor de flavonoides pode ser determinado pela reação dessa classe de compostos com nitrito de sódio, seguida pelo desenvolvimento de um composto colorido de flavonoide-alumínio que tem absorvância máxima a 510 nm (Abu Bakar *et al.*, 2009). Neste estudo foi utilizada a metodologia de Yang *et al.* (2009), com pequenas modificações. Inicialmente, 250 µL de amostra (no caso do branco foi utilizada água destilada) foram diluídas em 1,75 mL de água destilada e 75 µL de solução de nitrito de sódio 5 % (em água destilada, p/v). Essa mistura foi agitada em vortex e deixada reagir por 5 min no escuro à temperatura ambiente. Transcorrido o tempo necessário, 150 µL de solução de cloreto de alumínio (10% em água destilada, p/v) foram adicionados à mistura, que foi deixada reagir por mais 6 minutos. Por fim, 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1mol/L foram adicionados e a mistura foi novamente agitada em vortex. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 510 nm.

A curva de calibração para quantificação de flavonoides também foi elaborada utilizando diferentes soluções de (-) – epicatequina (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) em metanol. As concentrações utilizadas foram de 50 a 500 ppm e, assim como nas demais análises, a quantidade de flavonoides foi expressa em mg EE/100 g.

#### **3.1.4 Análises espectrofotométricas de atividade antioxidante**

As análises de atividade antioxidante apresentadas nesse trabalho foram realizadas no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

##### *Captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila)*

Nesta análise, foi utilizado o método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila, ou DPPH, descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Esse método consiste na reação entre o extrato obtido e esse radical em uma solução de metanol. A redução do radical DPPH é monitorada pela observação da diminuição da absorvância no comprimento de onda de 517 nm; em forma de radical o DPPH absorve nesse comprimento, entretanto, se reduzido por um antioxidante essa absorção desaparece.

Para a análise, no mesmo dia de realização dos experimentos, foi preparada uma solução de DPPH (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) com concentração de 60  $\mu\text{mol/L}$  em metanol. Alíquotas de 0,1 mL dos extratos, com concentração de 200 mg de amostra por mL, foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 3,9 mL da solução contendo o radical DPPH e homogeneizadas. Da mesma forma que as amostras, foi preparada uma solução controle com uma mistura de água, metanol e acetona, que foi utilizada no lugar do extrato. As misturas reagiram por 45 min e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. Os resultados foram expressos de acordo com a Equação 2.2.

$$CA(\%) = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

onde  $CA$  é a capacidade antioxidante, que se refere à porcentagem de radicais sequestrados,  $A$  é a absorbância das soluções contendo os extratos e  $A_0$  é a absorbância da solução controle.

#### *Captura do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfônico))*

Nesta análise foi utilizado o método de Re *et al.* (1999). Inicialmente, o reagente ABTS (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) foi dissolvido em água em um concentração de 7 mmol/L. O cátion ABTS foi produzido reagindo essa solução com persulfato de potássio 140 mM e deixando essa mistura no escuro por 12 h antes do uso. Para o ensaio, a solução contendo o radical ABTS foi diluída com tampão fosfato-salino, ou tampão PBS, de pH 7,0 e concentração 5 mmol/L até que a absorbância de 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm fosse atingida. Alíquotas de extrato de 10  $\mu\text{L}$  foram misturadas com 1 mL da solução de ABTS ( $A_{734} = 0,70 \pm 0,02$ ) e a absorbância foi determinada após 6 min a 734 nm. Foram utilizados extratos em diferentes concentrações de forma que as absorbâncias ficassem entre 20 e 80 % da absorbância da solução controle. A solução controle foi elaborada usando etanol 80 % no lugar dos extratos. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a Equação 2.2

Foi utilizada uma curva de calibração utilizando Trolox (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) como padrão em concentrações entre 100 e 2000  $\mu\text{mol/L}$  e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$  de Trolox equivalente. Uma das curvas de calibração elaboradas é apresentada na Figura 3.3.

### Poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método de Oyaizu (1986) descrito por Zhu *et al.* (2006). Este método avalia a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  na presença dos extratos. Para a análise, foi realizada uma diluição em etanol 80 % 1:20 dos extratos de forma que a absorbância ficasse dentro da faixa de leitura do espectrofotômetro para todas as amostras; essa diluição fez com que a concentração das amostras utilizadas nas análises fosse de 9,52 mg/mL. Para análise do poder redutor, 2,5 mL de extrato diluído foram misturados a 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1% e incubados a 50 °C por 20 min. Então, 2,5 mL de ácido tricloroacético (ou *Trichloroacetic acid*, TCA) 10 % foram adicionados à mistura e foi realizada uma centrifugação a 3000 g por 10 min. O sobrenadante (1 mL) foi adicionado de 2,5 mL de água destilada e 0,2 mL de cloreto de ferro 0,1 % (p/v) e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 700 nm. Para comparação, BHT na mesma concentração das amostras foi utilizado. A maior absorbância da reação indica um maior poder redutor.

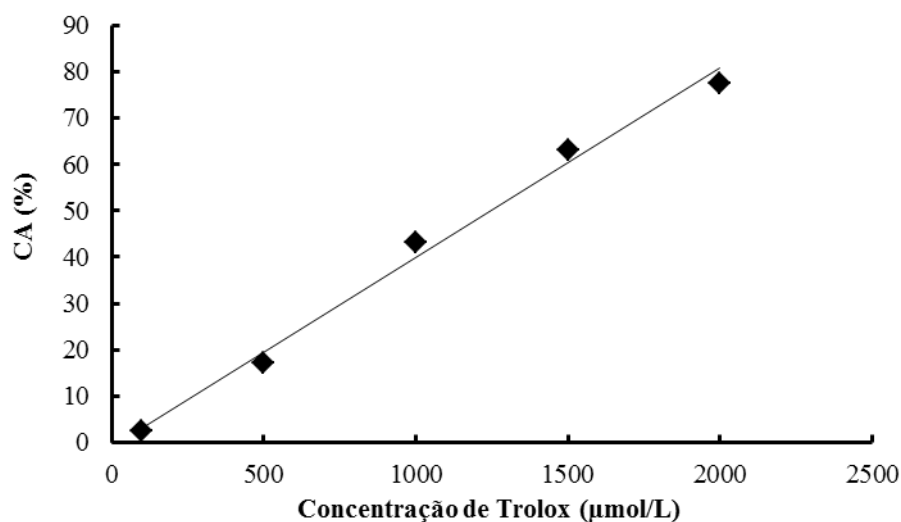


Figura 3.3 – Curva de calibração da concentração do padrão Trolox *versus* porcentagem de radicais sequestrados, utilizada para determinação da capacidade antioxidante ( $R^2 = 0,9909$ ).

### Atividade quelante de ferro

Para determinação da atividade quelante de ferro, foi utilizado o método de Decker e Welch (1990) descrito por Chang *et al.* (2007), com algumas modificações. Amostras de 1 mL dos extratos, com concentração de 200 mg de torta por mL, foram misturadas com 3,7 mL de água destilada e adicionou-se 0,1 mL de sulfato ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ , 2 mmol/L) e 0,2 mL



de solução de ferrozina (5 mmol/L). A mistura foi agitada, deixada reagir por 10 min e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 562 nm. Um complexo  $\text{Fe}^{2+}$ /ferrozina tem uma forte absorbância a 562 nm, portanto, uma alta habilidade de quelar os íons férricos resulta em baixa absorbância. Para elaboração do controle foi utilizada solução de etanol 80 % no lugar da amostra. Os resultados foram expressos de acordo com a Equação 2.3.

$$AQ(\%) = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad (3.3)$$

onde  $AQ$  é a atividade quelante,  $A$  é a absorbância das soluções contendo os extratos e  $A_0$  é a absorbância da solução controle.

### 3.1.5 Hidrólise dos compostos fenólicos e análise por HPLC

Os extratos das tortas de noz pecã, semente de girassol e de gergelim foram analisados utilizando HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* ou, em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) a fim de se identificar individualmente alguns dos compostos presentes nessas amostras.

Previamente à injeção, os extratos das sementes de girassol e gergelim foram apenas filtrados em membranas com 13 mm de diâmetro e tamanho de poro nominal de 0,45  $\mu\text{m}$ . O extrato de noz pecã, por sua vez, precisou ser hidrolisado antes das análises. Essa etapa foi necessária para melhor resolução dos picos obtidos na cromatografia, permitindo a identificação adequada dos compostos. Apesar da possibilidade de degradação de alguns compostos durante a hidrólise, a necessidade desse processo previamente as análises foi demonstrado por Villarreal-Lozoya *et al.* (2007) e De La Rosa *et al.* (2010). A hidrólise e a análise dos compostos foram realizadas de acordo com Villarreal-Lozoya *et al.* (2007). Para hidrólise básica, 1 mL de extrato foi adicionado de 1 mL de solução de NaOH 8N, agitado em vortex e deixado reagir por 16h no escuro à temperatura ambiente. Após esse processo, foram adicionados 1,35 mL de solução de HCl 6mol/L à mistura, para realização da hidrólise ácida. Os compostos foram deixados reagir por 45 min em banho termostático (*Lauda*, modelo TYP T, Alemanha) à 85 °C. Finalmente, os extratos foram resfriados e filtrados em membranas com poro nominal de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

A análise de cada torta seguiu diferentes metodologias, conforme elucidado a seguir. As análises das tortas de noz pecã e semente de girassol foram realizadas em um mesmo equipamento. Foi utilizado um HPLC da marca Agilent (modelo 1260 *infinity*, Estados Unidos), equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático, um forno para controle de temperatura e um detector DAD UV-Vis (*Diode Array Detector*), todos também da marca Agilent e do modelo 1260 *infinity*. Para separação dos compostos fenólicos foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, Estados Unidos) de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e com partículas de 5 µm de diâmetro médio, acoplada a uma pré coluna de 12,5 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno da mesma marca e modelo. O equipamento utilizado para o gergelim é descrito a seguir, junto à metodologia de análise dessa torta. Em seguida, são apresentadas as condições cromatográficas utilizadas para as diferentes tortas.

Torta de semente de girassol: a análise de compostos fenólicos do girassol foi realizada de acordo com Lemos *et al.* (2012). Para tal, 30 µL de extrato foram injetados no sistema cromatográfico. A coluna foi mantida a 25 °C, o fluxo foi constante de 0,9 mL/min e, para a separação dos compostos, foi utilizado um gradiente de ácido acético aquoso (1 %, v/v), fase móvel A, e metanol grau HPLC (Vetec, Brasil), fase móvel B. A eluição se deu da seguinte forma: 0 min, 0 % B; 0-25 min, 40 % B; 25-27 min, 40 % B; 27-37 min, 5 % A; 37-42 min, 5 % B; 42-45 min, 0 % B. A detecção foi realizada a 280 nm.

Torta de noz pecã: a análise de compostos fenólicos da torta de noz pecã foi realizada conforme a metodologia de Villarreal-Lozoya *et al.* (2007), com algumas modificações. As fases móveis utilizadas foram: água Mili-Q (Milipore, França) acidificada a um pH de 3 com uma solução de HCl 2 M (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O gradiente de eluição dos solventes foi utilizado da seguinte forma: 0 min, 5 % B; 0-5 min, 15 % B; 5-10 min, 15 % B; 10-30 min, 72 % B; 30-31 min, 100 % B. Após a separação voltou-se para as condições iniciais e a coluna foi deixada equilibrar por 5 min. O volume de injeção foi de 20 µL e a vazão de 1 mL/min. Os picos foram detectados no comprimento de onda de 260 nm.

Torta de gergelim: a análise das lignanas e seus glicosídeos por HPLC foi realizada de acordo com a metodologia de Rangkadilok *et al.* (2010). Foi utilizado um cromatógrafo (*PerkinElmer*, modelo Series 200, Estados Unidos) equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno e detector de ultravioleta-visível também da *PerkinElmer* modelo Series

200. A separação foi realizada com uma coluna de fase reversa C18 (*PerkinElmer*, Brownlee Validated RP-18 Spheri-5, Estados Unidos) de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e com partículas de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio, acoplada a uma pré coluna de 15 mm de comprimento e 3,2 mm de diâmetro interno (*PerkinElmer*, Brownlee Validated C18 Newguard Column, Estados Unidos). O volume de injeção foi 20  $\mu\text{L}$ , o comprimento de onda utilizada foi de 280 nm e a temperatura e a vazão foram controladas em 40 °C e 1 mL/min, respectivamente. As fases móveis utilizadas consistiram em água Mili-Q (Milipore, França), que foi a fase móvel A e metanol grau HPLC (Vetec, Brasil), que foi a fase móvel B. A eluição seguiu um gradiente linear de acordo com o sistema: 0 min, 5 % B; 0-5 min, 18 % B; 5-10 min, 35 % B; 10-15 min, 62 % B; 15-18 min, 80 %; 18-22 min, 80 %; 22-23 min, 5 % B; 23-26 min, 5% B.

Para tentar identificar os compostos presentes nas amostras foram comparados os tempos de retenção dos picos observados para cada extrato e de padrões adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Para utilização dos padrões foram preparadas soluções de cada composto separadamente, com concentrações de 1000 mg/mL. Para elaboração dessas soluções os padrões foram diluídos em metanol, com exceção do sesamol e da sesamina que foram diluídos em etanol 95 %. O padrão de ácido clorogênico foi avaliado nas mesmas condições cromatográficas do extrato de girassol e os padrões de ácido elágico, catequina e epicatequina, nas mesmas condições cromatográficas empregadas para avaliação do extrato de noz pecã. Nas mesmas condições utilizadas para o gergelim, tentou-se identificar os padrões de sesamol e sesamina.

### 3.2 Artigo 1

#### EVALUATION OF THE PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DIFFERENT CAKES ORIGINATED FROM THE EDIBLE OIL INDUSTRY

Artigo submetido à revista *Journal of the American Oil Chemists' Society*.

Authors: Júlia Ribeiro Sarkis<sup>1</sup>, Ana Paula Folmer Côrrea<sup>2</sup>, Iuri Michel<sup>1</sup>, Adriano Brandeli<sup>2</sup>, Isabel Cristina Tessaro<sup>1</sup> and Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemical Engineering Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Abstract:** The objective of this work was to extract water-soluble compounds from different seed and nut cakes under the same conditions and compare the phenolic content and antioxidant activity of the cake extracts. Seed cakes of sunflower, pumpkin, flaxseed and defatted sesame, and nut cakes of almond, pecan, macadamia and hazelnut were used in the experiments. Extracts were obtained by solid-liquid extraction with a water/ethanol solution (20:80, v/v). Total phenolic content, flavonoids, flavan-3-ols and condensed tannins in the extracts were determined using spectrophotometric analysis. Antioxidant properties of the extracts were determined by the DPPH and ABTS radical scavenging methods, and by determination of the reducing power and chelating activity. The extract from pecan nut cake presented the highest amounts of all compounds analyzed, followed by sunflower seed and hazelnut cake extracts. These samples also had the highest effects on the ABTS and DPPH radicals, as well as the uppermost reducing powers. The extracts from pecan nut and sunflower and sesame seeds were analyzed using HPLC and individual phenolics were further characterized.

**Key-words:** seed cakes, nut cakes, phenolics compounds, antioxidant activity, HPLC.

### 3.2.1 Introduction

Over the last decades, the investigation of possible applications for by-products from agricultural and industrial sources has been intensified. These residues are a disposal problem for the industry, but they also could represent a promising sources of compounds with technological and nutritional interest (Schieber *et al.*, 2001). Cakes or meals are considered the by-products obtained after oil removal by cold pressing of different seeds and nuts used in the edible oil industry. Among the cakes evaluated in this study, the most expressive in volume of production are sunflower, sesame and linseed. Worldwide oil production from these seeds was 13, 1 and 0.5 million tons for sunflower, sesame and linseed, respectively (FAO, 2011).

Seed and nut cakes have high nutritional value, with protein contents between 15 and 50 % and due to this high protein proportion, they are frequently used as cattle feed (Ramachandran *et al.*, 2007). However, these residues could have more diverse applications, since they are considered an important source of antioxidants, as it has been previously demonstrated for sesame seed (Shahidi *et al.*, 2006; Rangkadilok *et al.*, 2010; Mohdaly *et al.*, 2011), flaxseed (Oomah *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2012), sunflower seed (Kubicka *et al.*, 1999; Matthäus, 2002; Weisz *et al.*, 2009), pumpkin seed (Koike *et al.*, 2005; Pericin *et al.*, 2009), pecan, almonds, hazelnut and macadamia (Harnly *et al.*, 2006; Pellegrini *et al.*, 2006; Venkatachalam and Sathe, 2006; Yang *et al.*, 2009).

Although tocopherols and part of the phospholipids are removed during oil extraction, the high phenolic content remaining in the defatted residues demonstrates that the extraction process does not diminish the amount of these compounds. In this way, the cakes have a great potential as suitable and economically viable by-products for recovery of phenolic compounds (Matthäus, 2002; Weisz *et al.*, 2009). Considering the antioxidant activity of some cakes and their extracts, they could be used as functional ingredients, added for food fortification or as natural antioxidant for oils and fat containing products (Weisz *et al.*, 2009). Sunflower and sesame seed cakes were evaluated as alternatives for the stabilization of sunflower and soybean oil (Leonardis *et al.*, 2003; Mohdaly *et al.*, 2011). Seed cakes could be also used in the production of enzymes, antibiotics, biopesticides, vitamins and other biochemicals (Ramachandran *et al.*, 2007).

Role nuts and seeds are known to have a variety of compounds that have cardioprotective and anticarcinogenic effects and play a role in the reduction of the risk of diabetes; these effects were initially attributed only to the lipid profile of these products (Li and Hu, 2011; Baum *et al.*, 2012). Nowadays, it is known that the phytochemical components of seeds and nuts need to be considered when the health benefits of these foods are evaluated since they have showed to have great antioxidant and antiproliferative activity (Dreher *et al.*, 1996; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Lazarou *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009).

Most studies evaluating the phenolic content and antioxidant activity of seeds and nuts use role products and carry out defatting process using solvents in bench scale. Also, very little work has been found concerning cakes provided from industrial processes. Considering this scenario, the objective of this work was to extract water-soluble phenolic compounds from different industrial seed and nut cakes under the same conditions and compare the phenolic content and antioxidant activity of these cakes.

### 3.2.2 *Materials and methods*

#### *Preparation of the seed and nut cakes*

All cakes were supplied by *Vital Âtman* company (Uchoa, São Paulo, Brazil), which produces oil by cold pressing of seeds and nuts. Seed cakes of sesame (*Sesamun indicum*), sunflower (*Helianthus annuus*), pumpkin (*Cucurbita moschata*) and flaxseed (*Linum usitalissimun*) and nut cakes of pecan (*Carya illinoensis*) macadamia (*Macadamia integrifolia*), almond (*Prunus dulcis*) and hazel nut (*Corylus aveliana*) were used in the experiments. Prior to analysis, samples were ground to powder using a stainless steel blender, homogenized and stored at -18 °C. For sesame seed cake only, a defatting process was carried out using a fat extraction apparatus (*Tecnal*, model TE-044, Brazil). The cake was immersed in hexane for 1 h followed by solvent recirculation for 2 h and air-drying. This procedure was necessary due to the high fat content observed in initial extractions. For all cakes, the moisture content was determined according to the gravimetric method (AOAC, 1990).

### *Preparation of the extracts*

The extracts were obtained by solid-liquid extraction. Approximately 5 g of the plant material was mixed with 25 mL of 80 % (v/v) ethanol and agitated using a shaker (*Cientec*, model CT-712RN, Brazil) at  $25 \pm 1$  °C for 1 h. As the application of the extracts in foods and supplements is a future purpose, ethanol was chosen as the solvent for this extraction. After extraction, samples were centrifuged (*Cientec*, model CT 5000R, Brazil) for 30 min at 4757 g and 25 °C. The supernatant was collected, the volume was adjusted to 25 mL with 80 % ethanol aqueous solution and the extracts were stored at -20°C. Extractions were realized in triplicate.

### *Determination of total phenolic compounds*

Prior to the analysis of polyphenolic compounds, an ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy scanning was performed between 200 and 800 nm. This is a useful technique for structure analyses of phenolics in the extracts. These compound exhibit two major absorption bands: the first between 320 and 380 nm, is a result of the ring A absorption, and the second around 250-280 nm, representing the ring B absorption (Matthäus, 2002). Samples were diluted in different proportions to maintain the absorbance in the best work range of the spectrophotometer, being this analysis only qualitative.

The method for determination of total phenolic compounds was adapted from Waterhouse (2002). Briefly, 40 µL of extract (or water, for the blanks) were dissolved in 3.2 mL of distilled water and 200 µL of the Folin-Ciocalteu reagent (Vetec, São Paulo, Brazil) reagent was added; the mixture was agitated and left in the dark for 5 min. After this period, 600 µL of saturated sodium carbonate solution was added to the mixture and agitation was carried out in a vortex equipment (Phoenix Luferco, model AP 56, Brazil). After 1 h the absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer (*Pró-Análise*, model UV 1600, Brazil). Concentration was calculated using a calibration curve developed with gallic acid (0.05 – 0.5 mg/g,  $R^2=0.998$ ) as a standard. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 g of sample in a dry basis (mg GAE/100 g).

#### *Determination of procyanidin monomers (flavan-3-ols)*

Determination of flavan-3-ols was performed according to Poudel *et al.* (2008). Aliquots of 0.4 mL of each sample were mixed with 2 mL of 4-(Dimethylamino)-cinnamaldehyde (DMACA) solution (0.1 % DMACA in 1 mol/L HCl methanolic solution). The sample was vortexed and left in the dark for 15 min at room temperature. After this period, the absorbance was measured at 640 nm. The concentration of procyanidin monomers was determined using a calibration curve with (-) – epicatechin as a standard in the range of 0.001 to 0.01 mg/mL ( $R^2=0.999$ ). Results were expressed as mg of epicatechin equivalents per 100 g of sample in dry basis (mg EE/100 g).

#### *Determination of flavonoids*

Flavonoids were determined in the extracts according to Yang *et al.* (2009) with some modifications. The extracts (250  $\mu$ L) were diluted in 1.75 ml of water and 75  $\mu$ L of 5 % sodium nitrite was added. The mixture was agitated and left to react for 5 min. Then 150  $\mu$ L of 10% aluminum chloride was added and allowed to further react for 6 min before 0.5 mL of 1 mol/L sodium hydroxide was added. The mixture was vortexed and its absorbance immediately measured at a wavelength of 510 nm against a prepared blank using a spectrophotometer. The flavonoid content was determined by a (-) - epicatechin standard curve (0.2 – 1.0 mg/g,  $R^2=0.996$ ) and stated as mg of epicatechin equivalents per 100 g of sample in a dry basis (mg EE/ 100 g).

#### *Determination of condensed tannins*

Condensed tannins or proanthocyanidins in the extracts were determined using the vanillin assay. Analyses were performed according to Villarreal-Lozoya *et al.* (2007) with some modifications. Aliquots of 500  $\mu$ L of the extracts (or methanol, for the blanks) were diluted in 5 mL of vanillin solution (0.5 g of reagent and 200 mL of 4% HCl methanol). The blanks were diluted in 5 mL of 4% HCl in methanol. The test tubes were agitated in a vortex equipment and kept in the dark for 15 min. Absorption measurements were performed in a spectrophotometer (*Pró-Análise*, model UV 1600, Brazil) at 500 nm. Samples absorbance was rectified with the blank standard and compared against a standard curve. The calibration curve



was made with (-) – epicatechin (0.5 – 5.0 mg/g,  $R^2=0.995$ ) and the results expressed as mg of epicatechin equivalents per 100 g of extract in a dry basis (mg EE/100 g).

#### *Determination of antioxidant capacity with the DPPH radical*

The 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical method was used to determine the antioxidant capacity of the extracts ( $AC_{DPPH}$ ) as described by Brand-Williams *et al.* (1995). The DPPH radical has high absorbance at 517 nm thus, the reduction of DPPH by an antioxidant results in a loss of absorbance in this wavelength.

For the analysis, 0.1 mL of the extracts with a concentration of 200 mg/mL were mixed with 3.9 mL of DPPH solution (60  $\mu$ mol/L in methanol) and homogenized. The mixture reacted for 45 min and the solution absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer (*Shimadzu*, model Uv1240, Japan). For the blanks, a mixture of water, methanol and acetone was used instead of the plant extracts. The antioxidant capacities (AC) of the extracts were expressed according to Equation (1):

$$AC(\%) = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

where  $A$  is the absorbance of the sample and  $A_0$  is the absorbance of the control.

#### *Determination of antioxidant capacity with the ABTS radical*

The antioxidant capacity of the extracts was also determined by using the ABTS decolorization assay as described by (Re *et al.*, 1999). ABTS radical was produced by mixing an ABTS solution (7 mmol/L) with potassium persulfate (140 mmol/L) and keeping the mixture in the dark at room temperature for 12 h. For analysis, the ABTS radical solution was diluted in a TBS buffer (pH 7.0, 5 mmol/L) until an absorbance of 0.7 ( $\pm 0.02$ ) at 734 nm was reached. Aliquots of 10  $\mu$ L of the extracts (or water, for the control) and 1 mL of the ABTS solution ( $A_{734} = 0.70 \pm 0.02$ ) were mixed and absorption was determined after 6 min. Plant extracts were diluted to different concentrations to perform the readings. The percentage of radical inhibition ( $AC_{ABTS}$ ) was calculated using Equation 1 and the standard calibration curves were constructed by plotting percent inhibition values as a function of the

concentration of Trolox (100 – 2000  $\mu\text{mol/L TE}$ ,  $R^2=0.993$ ). Using this curve, the antioxidant activity of the samples was calculated in terms of Trolox equivalents ( $\mu\text{mol/L TE}$ ). The values obtained were corrected according to the dilution factor.

#### *Determination of reducing power*

Reducing power of the samples was determined according to the method of Oyazu (1986) described by Zhu *et al.* (2006), which evaluates the reduction of ferrous ions in the presence of the extracts. To obtain proper absorbance values, samples were diluted in 80 % ethanol, 1:20, and the samples final concentration was 9.5 mg/mL. In the analysis, 2.5 mL of diluted extracts and 2.5 mL of potassium ferricyanide (1 %) were mixed and incubated at 50 °C for 20 min. Afterwards, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 4757 g for 10 min. Finally, the supernatant (1 mL) was diluted in 2.5 mL of distilled water and 0.2 mL of  $\text{FeCl}_3$  0.1 % was added. Readings were performed in a spectrophotometer (*Shimadzu*, model Uv1240, Japan) at 700 nm. For comparison, experiments using BHT in the same concentration as the samples were performed. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power.

#### *Determination of ferrous ion chelating ability*

The methodology of Decker and Welch (1990) described by Chang *et al.* (2007) was applied with a few modifications. Aliquots of 1 mL of the extracts (or water, for the control sample), with a concentration of 200 mg/mL, were diluted in 3.7 mL of distilled water and mixed with 0.1 mL of  $\text{FeSO}_4$  ( $\text{Fe}^{2+}$ , 2 mmol/L) and 0.2 mL of ferrozine solutions (5 mmol/L). After reaction for 10 min, the absorbance was recorded at 562 nm using a spectrophotometer. A complex of  $\text{Fe}^{2+}$  and ferrozine has a strong absorbance at this wavelength, therefore, a high ferrous ion chelating ability in the test sample results in a low absorbance. Results were expressed as a percentage of chelating activity (CA) using Equation 2.

$$CA(\%) = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

*Phenolic hydrolysis and HPLC analysis*

Extracts of sunflower and sesame seeds and pecan nut cakes were analyzed using HPLC for individual identification of the phenolic compounds in the samples. All mobile phase solvents used were HPLC grade and standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Sunflower and sesame seeds cake extracts, obtained as previously described, were filtered through a 0.45 µm membrane filter before HPLC analyzes. Pecan nut cake extract was hydrolyzed as described by Villarreal-Lozoya *et al.* (2007): 1 mL of extract was transferred to an assay tube, diluted with 1 mL of 8 mol/L NaOH and samples were allowed to react for 16 h in the dark. After basic hydrolysis, 1.35 mL of 6 mol/L HCl was added to the tubes and the mixture was heated for 45 min at 85 °C using a water bath (*Lauda*, model TYP T, Germany).

HPLC equipment: pecan and sunflower seed cake extracts HPLC was performed using an Agilent 1260 Infinity system. The system is equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, and UV-Vis diode array detector (UV-DAD). Extracts or standards were injected onto a 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm, C18 reversed phase column (Agilent, USA) attached to an Agilent guard column (12.5 × 4.6 mm i.d., 5 µm). For sesame seed cake, extracts were analyzed by HPLC using a different chromatography system, equipped with a quaternary pump, a UV-Vis detector and a column oven (series 200, PerkinElmer, Waltham, USA). Separation was also conducted on a C18 reversed-phase (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm, PerkinElmer) column coupled to a C18 (15 × 3.2 mm i.d., PerkinElmer, USA) guard column.

Analysis for sunflower and sesame seeds cake extracts were performed as by Lemos *et al.* (2012) and Rangkadilok *et al.* (2010), respectively. Pecan nut cake extract was analyzed according to Villarreal-Lozoya *et al.* (2007), with some modifications. Mobile phases A and B were Mili-Q water, acidified to pH 3.0 with 2 M HCl and acetonitrile, correspondingly. Solvent gradient was used as follows: 0 min, 5 % B; 0-5 min, 15 % B; 5-10 min, 15 % B; 10-30 min, 72 % B; 30-31 min, 100 % B. Peaks were detected at 260 nm.

For all three extracts, peaks were identified by congruent retention times compared with standard solutions (1000 µg/mL). Using the same methodology applied for sunflower cake, chlorogenic acid was tentatively identified in this sample. For pecan cake, catechin,

epicatechin and ellagic acid were injected using the conditions described above. Finally, sesamin and sesamol were tentatively identified in sesame cake extracts and were injected according to the methodology used for this sample.

### *Statistical analyses*

All analyses presented were performed, at least, in duplicate. Experimental results were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Data were subjected to ANOVA and differences among extracts were tested by Tukey post hoc comparison. To establish relations between phenolic compounds in samples and antioxidant properties, the determination coefficients between analyses were determined. Software Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA) was used for the statistical analyses.

### **3.2.3 Results and discussion**

It is important to point out that, several factors influence extraction procedures such as temperature, time, solid-liquid ratio, number of cycles, among others. Nevertheless, since this study is a preliminary comparison between different seed and nut cakes all these factors were fixated and kept the same for each cake. Also, it is important to point out the influence of the agronomical source of the cakes. Once these products were obtained directly from the industry, the industrial oil extraction process could have a strong influence on the characteristics of the cakes, and as a consequence the content of the different compounds analyzed in this study. A detailed evaluation of the processing parameters is currently being carried out in our laboratory.

#### *Total phenolics compounds*

Total phenolics were determined using the Folin-Ciocalteu reagent and are presented in Table 3.1. Sunflower seed and pecan nut cakes showed the highest amounts of total extractable phenolics. Almond and pumpkin seed cakes presented absorbance values lower than the quantification limit and the total phenolics content could not be determined. Significant differences were found in the phenolic content in comparisons between pecan,

sunflower and hazelnut cakes and the other cakes ( $p < 0.05$ ); however no significant differences were observed between sesame, flaxseed and macadamia residues ( $p > 0.05$ ).

The work performed by Wu *et al.* (2004), using also the Folin-Ciocalteu method to determine total phenolics in nuts, showed similar results. Pecan nut presented the highest phenolic content, followed by hazelnut and macadamia. The same ranking was also observed in other studies (Kornsteiner *et al.*, 2006; Chen and Blumberg, 2008). Yang *et al.* (2009) determined the phenolic content (bound and free) of almonds, hazelnuts, macadamia nuts and pecans among others. The researchers found that, among these products, pecan had the highest soluble-free phenolics which could be a possible explanation for the higher values obtained for pecan in this analysis. Dabrowski and Sosulski (1984) analyzed phenolic content of defatted oilseeds and found higher amounts of phenolic in sunflower when compared to sesame and flaxseed. The sunflower seed cake was also analyzed by Matthäus (2002) that found phenolic contents between 2.7 and 38.8 mg GAE/g, depending on the solvent used.

Table 3.1 - Total phenolics and flavan-3-ols content  $\pm$  SD in the seeds and nuts cakes (milligrams per 100 g of dry weight). For each cake, values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p < 0.05$  by ANOVA.

	Total Phenolics	Flavan-3-ols
Seed cakes		
Flaxseed	$56 \pm 5^d$	$1.4 \pm 0.1^c$
Pumpkin	-	-
Sesame	$71 \pm 7^d$	-
Sunflower	$247 \pm 4^b$	$2.3 \pm 0.3^c$
Nut cakes		
Almond	-	$5.1 \pm 0.4^c$
Hazelnut	$151 \pm 6^c$	$41 \pm 1^b$
Macadamia	$51 \pm 7^d$	$2.0 \pm 0.2^c$
Pecan	$690 \pm 30^a$	$180 \pm 20^a$

(-) Values were lower than detection limit.

Previous literature described similar amounts of total phenolics than the reported in this study (Dabrowski and Sosulski, 1984; Mohdaly *et al.*, 2011). However, higher (Velioglu *et al.*, 1998; Shahidi *et al.*, 2007; De La Rosa *et al.*, 2010) and lower (Harnly *et al.*, 2006) amounts of phenolic compounds than the observed in our research were also found in literature. Phenolic composition varies widely among different researches and different seeds and nuts. A possible explanation for these differences could be due to agronomical and environmental factors, which play important roles in the phenolic content (Tomás-Barberán and Espín, 2001). Also, the method for determination of the total phenolic compounds based on the reaction with the Folin-Ciocalteu reagent is not specific for phenolics and is possible that other reducing compounds such as ascorbic acid and proteins interfere in the analysis (Escarpa and González, 2001; Matthäus, 2002). Another possible explanation for the varied phenolic content when different studies are compared is the extraction processes, which can differ in solvent, extraction time, solid to solvent ratio and others.

#### *Further characterization of the phenolic compounds*

The UV-Vis absorption spectroscopy presented similar behavior for most of the extracts; this behavior is exemplified by the pecan nut cake extract showed in Figure 3.4. For these extracts high absorption bands were found between 210 and 280 nm, which could be related to the presence of flavonoids (Matthäus, 2002). This was an expected result, considering that flavonoids are one of the most common phenolic classes in foods (Bravo, 1998). Sunflower seed cakes extract had one additional very high absorption band in the range of 300 and 380 nm, which, according to Matthäus (2002), is a result of the B ring absorption. This could be explained by the high content of chlorogenic acid that is found in sunflower oil residues (Weisz *et al.*, 2009), this acid, when isolated has a similar UV-Vis absorption spectra between 300 and 380 nm (Belay and Gholap, 2009).

Small amounts of flavan-3-ols were found in all cakes, with the exception of pumpkin and sesame. As observed for total phenolics, pecan nut cake had the highest amount of flavan-3-ols, significantly differing from all other samples ( $p < 0.05$ ). Almond, flaxseed, sunflower and macadamia nut cakes had no difference between each other ( $p > 0.05$ ). Although in smaller amounts, Harnly *et al.* (2006) also found pecan to have the highest concentrations of flava-3-ols among the evaluated nuts followed by hazelnut, almond and macadamia, as

observed in this study. Also the values for flavan-3-ols found for the cakes were higher than the reported by the US database (Bolling *et al.*, 2011). This could be due to the industrial extraction process, which was through cold pressing.

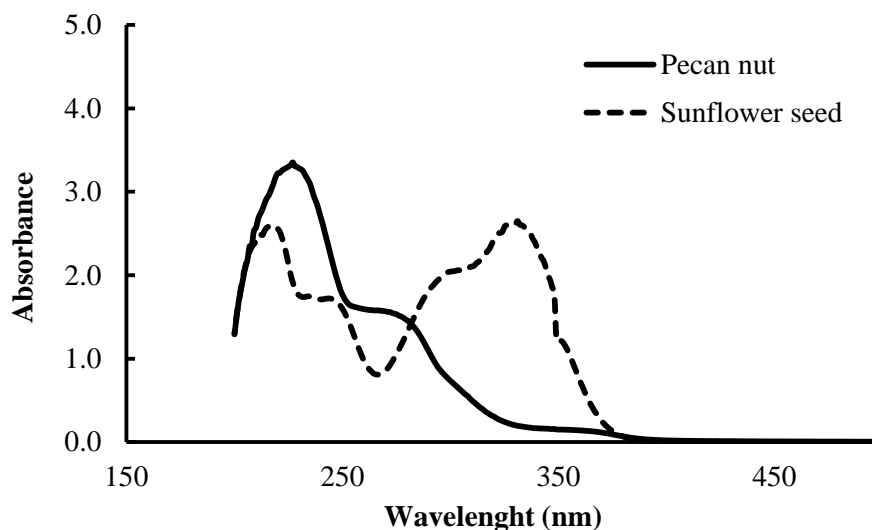


Figure 3.4 – Scanning absorbance in the ultraviolet-visible absorption spectroscopy for pecan nut and sunflower seed cakes extracts.

The total amounts of flavonoids and condensed tannins are presented in Figure 3.5. Flavonoids were observed only in pecan, hazelnut and sunflower cakes extracts; pecan had the highest content, followed by sunflower and hazelnut. For the other extracts, values were below the quantification limit. Bolling *et al.* (2010b) also observed that pecans have the uppermost total flavonoid content among nuts and that hazelnuts have an appreciable content of flavonoids. The flavonoid content of defatted sunflower seed is within the range found by (Matthäus, 2002). Condensed tannins were found only in the extracts of pecan and hazelnut. (Gu *et al.*, 2004), also found proanthocyanidins in hazelnut and pecan as well as in almonds. High amounts of tannins in pecans have been previously reported by Weisz *et al.* (2009) and Venkatachalam and Sathe (2006).

Nuts are considered to be rich in tannins, which were also observed in this work for pecans and hazel nut cakes extracts. Additionally, in oil seed the main phenolics are phenolic acids, which were showed for sunflower seed cake extract by the high absorbance values obtained in the chlorogenic acid absorption band. Thus, these results corroborate with those found in the literature (Bravo, 1998).

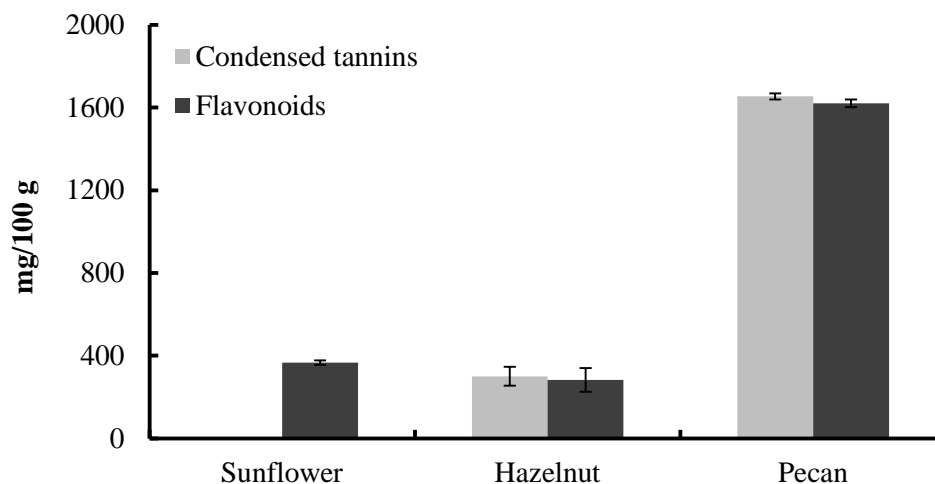


Figure 3.5 - Total flavonoids and condensed tannins content of pecan, hazelnut and sunflower seed cakes. Values are the mean of triplicates  $\pm$  SD.

#### *Antioxidant properties of the extracts*

Four different methods were used to determine the antioxidant capacity of the extracts of different seed and nuts residues: DPPH and ABTS free radical scavenging, reducing power and ferrous ion chelating activity. Results obtained for these analyses are presented in Table 3.2.

Pecan nut cake extract had a significantly higher effect on the ABTS free radical ( $p < 0.05$ ) followed by the sunflower seed cake extract. There was no significant difference between, flaxseed, hazelnut, macadamia and sesame cake extracts ( $p > 0.05$ ). The effect on the DPPH radical was higher for the sunflower, pecan and hazelnut extracts and no significant differences were found between these samples ( $p > 0.05$ ). Macadamia, almond and pumpkin seed extracts had significantly lower antioxidant capacities.

As observed in the ABTS and DPPH free radical assays, pecan nut cake had the uppermost antioxidant activity, showing highest reducing power, followed by the sunflower seed and hazelnut cakes extract. The extracts of flaxseed, sesame and macadamia presented no significant differences between their reducing powers ( $p > 0.05$ ). The lowest reducing powers were observed for almond and pumpkin seed cakes. The reducing power of BHT, at the same concentration as the samples, 9.5 mg/L, was also evaluated and showed an



absorbance of  $1.45 \pm 0.06$ . This presented no significant difference ( $p > 0.05$ ) when compared to the reducing power of the pecan nut extract.

Table 3.2 - ABTS and DPPH antioxidant capacities, reducing power and chelating activities  $\pm$  SD in the seeds and nuts cakes. For each cake, values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p < 0.05$ .

	$AC_{ABTS}$ ( $\mu$ M TE)	$AC_{DPPH}$ (%)	Reducing power (Abs)	Chelating activity (%)
Seed cakes				
Flaxseed	$3090 \pm 399^c$	$50.3 \pm 0.8^b$	$0.171 \pm 0.061^{de}$	$52.7 \pm 2.9^b$
Pumpkin	$539 \pm 22^d$	$6.2 \pm 0.2^d$	$0.093 \pm 0.012^e$	$38.0 \pm 0.8^c$
Sesame	$1146 \pm 102^{cd}$	$27.2 \pm 0.2^c$	$0.140 \pm 0.006^{de}$	$7.4 \pm 1.1^e$
Sunflower	$6241 \pm 256^b$	$98.2 \pm 4.4^a$	$1.021 \pm 0.024^b$	$39.3 \pm 2.0^c$
Nut cakes				
Almond	$599 \pm 25^d$	$15.8 \pm 0.8^{cd}$	$0.099 \pm 0.013^e$	$33.4 \pm 0.5^c$
Hazelnut	$1893 \pm 28^{cd}$	$89.2 \pm 13.2^a$	$0.411 \pm 0.014^c$	$93.3 \pm 2.0^a$
Macadamia	$1596 \pm 16^{cd}$	$19.7 \pm 1.2^{cd}$	$0.224 \pm 0.001^d$	$25.1 \pm 1.6^d$
Pecan	$34125 \pm 1568^a$	$91.6 \pm 5.8^a$	$1.586 \pm 0.061^a$	$47.5 \pm 2.3^b$

The evaluation of ferrous ion chelating activity showed very different behavior than the observed for the other tests. Hazelnut had the highest chelating activity, followed by flaxseed, pecan, sunflower, pumpkin, almond, macadamia and, finally, sesame. As emphasized by Moure *et al.* (2001), the antioxidant potential of a compound is different according to the different assays given that the antioxidant activity is strongly dependent on the interaction of the antioxidant with other compounds.

In all tests, with the exception of the chelating activity analysis, pecan and sunflower seed cake extracts presented the highest values of antioxidant capacities and reducing power and almond and pumpkin seed cake extracts had the lowest values. Yang *et al.* (2009) and Wu *et al.* (2004) also found a very high antioxidant activity for pecan nuts and lower for hazelnut, followed by almond and macadamia. A research by Halvorsen *et al.* (2002)

evaluated the reducing power of several products and found that sunflower seed had higher reducing power than sesame seeds, followed by hazelnut and almond. The high antioxidant activity of the pecan nut cake extract is possibly due to its high content of condensed tannins, this compounds have been reported to have elevated antioxidant capacity (Hagerman *et al.*, 1998).

#### *Phenolic compounds vs. antioxidant capacity*

To evaluate the relation between the different antioxidant capacity assays with the total phenolic content and the flavan-3-ols content the determination coefficients were calculated. For this analysis, values that were below the quantification limit, were considered zero.

Table 3.3 shows the determination coefficients obtained. In this table, it is possible to observe that, among the antioxidant properties analyses, the ABTS assay showed a strong correlation with the total phenolics and the flavan-3-ols content in the samples. The reducing power also showed a strong relation with the total phenolics and was less related to the presence of flavan-3-ols. This demonstrates that the phenolics present in the cakes are probably the main responsible for the reduction of ferrous ions and the inhibition of the ABTS radical. Weaker correlations can be observed for the DPPH and chelating activity assays.

Table 3.3 - Determination coefficients between total phenolics and flavan-3-ols and the antioxidant capacity analyses.

<b>Determination coefficients</b>		
	<b>Total Phenolics</b>	<b>Flavan-3-ols</b>
AC <sub>ABTS</sub>	0.944	0.922
AC <sub>DPPH</sub>	0.509	0.294
Reducing power	0.926	0.679
Chelating activity	0.040	0.076

The literature provides different results regarding the relation between phenolic content and antioxidant capacity of seeds and nuts. The work of Yang *et al.* (2009) with edible nuts showed a positive correlation between phenolics and flavonoids and total antioxidant activity, suggesting that these compounds are responsible for a general portion of this ability. Also, a high correlation between flavan-3-ols content and antioxidant activity in barley was found by Goupy *et al.* (1999). In contrast, Matthäus (2002) which evaluated different oilseeds, found no relation between the total phenolic content and the antioxidant activities measured, using the DPPH radical scavenging method, the  $\beta$ -carotene bleaching method and Electron Spin Resonance (ESR).

#### *Identification of phenolic compounds*

The phenolic compounds of three cakes were tentatively identified using HPLC: pecan nut, sunflower seed and sesame. Pecan nut cake was chosen since it was the richest cake in phenolics and had the highest antioxidant activity, based on the results obtained in this study. Sunflower and sesame seed cakes were chosen because they are economically important oilseeds. As previously pointed out, world production of these residues is the most expressive if compared to the other by-products analyzed in our research. Also, the sunflower seed cake, showed high phenolic content and antioxidant capacity.

The HPLC analysis of sunflower seed cake ethanolic extract revealed the presence of chlorogenic acid (peak 1), as can be seen in Figure 3.6a. Chlorogenic acid has been previously described as one of the main phenolics in sunflower seeds (Weisz *et al.*, 2009). In Figure 3.6b is presented the chromatogram for pecan nut cake. Using external standards catechin, epicatechin and ellagic acid were detected (peaks 2, 3 and 4, respectively). According to the results of Villarreal-Lozoya *et al.* (2007), and considering that the compounds tend to follow the same elution order, the first peak observed in Figure 3.6b it is likely to be gallic acid. These results are in agreement with literature for pecan nut cake (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2009; De La Rosa *et al.*, 2010). The peaks for catechin and epicatechin are considerably smaller than the observed for ellagic acid and the tentatively identified as gallic acid. This could be related to the alkaline oxidation of these compounds during basic hydrolysis (Jorgensen *et al.*, 2004). During hydrolysis, precipitation was observed, which could be related to presence of condensed tannins. The same behavior was described by

Villarreal-Lozoya *et al.* (2007). In sesame cake extracts sesamol (peak 5) and sesamin (peak 6) were detected; both peaks showed very small areas. The low amounts of these compounds in sesame cake are in accordance with previous studies, as they are reported to be mainly found in sesame oil. The lignan glucosides (peaks observed between 18 and 22 min) remain in the cake in more significant amounts after oil extraction since they are more polar compounds (Kamal-Eldin *et al.*, 1995; Shyu and Hwang, 2002).

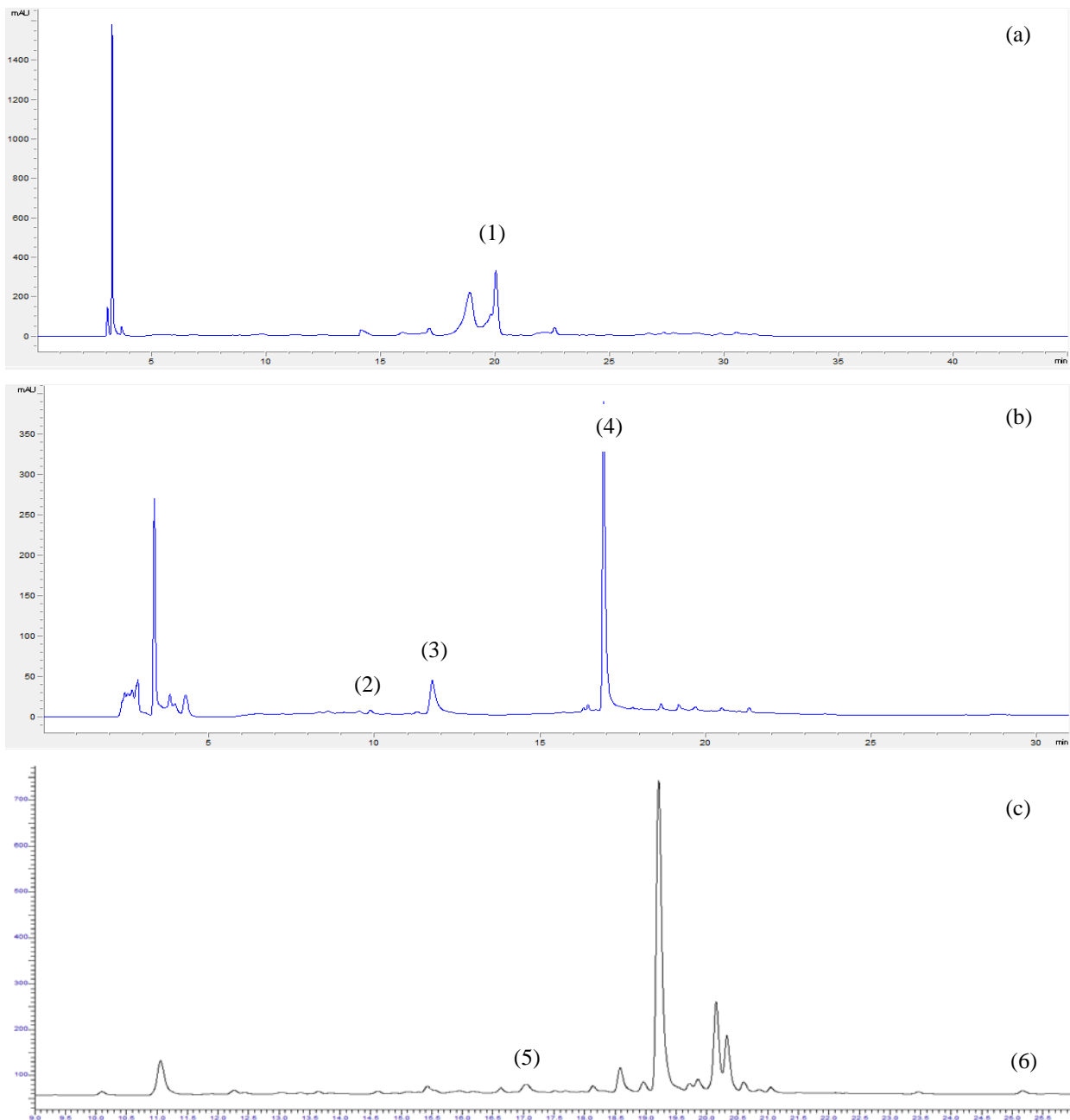


Figure 3.6 – Chromatograms of sunflower seed cake (a), pecan nut cake (b) and sesame cake (c). Peak assignment: (1) chlorogenic acid, (2) catechin, (3) epicatechin, (4) ellagic acid, (5) sesamol and (6) sesamin.

### 3.2.4 Conclusions

The present work comprised the extraction of water-soluble compounds from different seed and nut cakes, supplied directly by an industrial process, under the same conditions and compared the phenolic content and antioxidant activity of these cakes. Overall, pecan cake extracts presented the highest amounts of all compounds analyzed, followed by sunflower and hazelnut cake extracts. These samples also had the highest effects on the ABTS and DPPH radicals, as well as the uppermost reducing powers. The evaluation of the determination coefficients revealed a strong correlation between total phenolics, flavan-3ols and the antioxidant capacity of the extracts when the ABTS radical and reducing power methodologies were used. Chlorogenic acid was identified in sunflower cake, catechin, epicatechin and ellagic acid were identified in pecan nut cake and sesamol and sesamin were identified in sesame cake.

These results provide new knowledge about different residues from the edible oil industry. The specific constituents of the each extract remain to be fully identified and characterized. More work should be done in this field in order to assign certain antioxidant effects to individual compounds of the resulting extracts and better understand the possible application of these by-products. Furthermore, pecan nut and sunflower and sesame seed cakes could be considered alternative sources for obtaining phenolic compounds from industrial by-products. Work to optimize the extraction of phenolics from these sources is currently being carried out in our laboratory.

### 3.3 Referências

- ABU BAKAR, M. F., MOHAMED, M., RAHMAT, A. e FRY, J. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*mangifera pajang*) and tarap (*artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, v.113, n.2, p.479-483. 2009.
- AGOSTINI-COSTA, T. D. S., LIMA, A. e LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: Método da vanilina versus método do butanol ácido. *Química Nova*, v.26, p.763-765. 2003.
- AOAC, A. O. O. A. C. *Official method of analysis of aoac*. Allentgon, Washington D. C. 1990

- ARNOUS, A., MAKRIS, D. P. e KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.12, 2001/12/01, p.5736-5742. 2001.
- BAUM, S. J., KRIS-ETHERTON, P. M., WILLETT, W. C., LICHTENSTEIN, A. H., RUDEL, L. L., MAKI, K. C., WHELAN, J., RAMSDEN, C. E. e BLOCK, R. C. Fatty acids in cardiovascular health and disease: A comprehensive update. *Journal of Clinical Lipidology*, v.6, n.3, p.216-234. 2012.
- BELAY, A. e GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (cga) in coffee beans by uv-vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v.3, n.11, p.234-240. 2009.
- BOLLING, B. W., CHEN, C. Y. O., MCKAY, D. L. e BLUMBERG, J. B. Tree nut phytochemicals: Composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition Research Reviews*, v.24, n.2, Dec, p.244-275. 2011.
- BOLLING, B. W., MCKAY, D. L. e BLUMBERG, J. B. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.19, n.1, p.117-123. 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E. 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.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v.56, n.11, p.317-333. 1998.
- CHANG, C.-Y., WU, K.-C. e CHIANG, S.-H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, v.100, n.4, p.1537-1543. 2007.
- CHEN, C. Y. e BLUMBERG, J. B. Phytochemical composition of nuts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.17, n.s. 1, p.329-332. 2008.
- DABROWSKI, K. J. e SOSULSKI, F. W. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.32, n.1, 1984/01/01, p.128-130. 1984.
- DE LA ROSA, L. A., ALVAREZ-PARRILLA, E. e SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of mexican pecan (*carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, n.1, 2011/01/12, p.152-162. 2010.
- DECKER, E. A. e WELCH, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, n.3, 1990/03/01, p.674-677. 1990.
- DREHER, M. L., MAHER, C. V. e KEARNEY, P. The traditional and emerging role of nuts in healthful diets. *Nutrition Reviews*, v.54, p.241-245. 1996.
- ESCARPA, A. e GONZÁLEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, v.427, n.1, p.119-127. 2001.
- FAO. Faostat. <http://www.fao.org>: Food and Agricultural Organization of the United States 2011.
- GOUPY, P., HUGUES, M., BOIVIN, P. e AMIOT, M. J. Antioxidant composition and activity of barley (*hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.79, n.12, p.1625-1634. 1999.
- GU, L., KELM, M. A., HAMMERSTONE, J. F., BEECHER, G., HOLDEN, J., HAYTOWITZ, D., GEBHARDT, S. e PRIOR, R. L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition*, v.134, n.3, p.613-617. 2004.
- HAGERMAN, A. E., RIEDL, K. M., JONES, G. A., SOVIK, K. N., RITCHARD, N. T., HARTZFELD, P. W. e RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins)

- as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.5, 1998/05/01, p.1887-1892. 1998.
- HALVORSEN, B. L., HOLTE, K., MYHRSTAD, M. C. W., BARIKMO, I., HVATTUM, E., REMBERG, S. F., WOLD, A.-B., HAFFNER, K., BAUGERØD, H., ANDERSEN, L. F., MOSKAUG, J. Ø., DAVID R. JACOBS, J. e BLOMHOFF, R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, v.132, n.3, p.461-471. 2002.
- HARNLY, J. M., DOHERTY, R. F., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., BHAGWAT, S. e GEBHARDT, S. Flavonoid content of us fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.26, Dec, p.9966-9977. 2006.
- JORGENSEN, E. M., MARIN, A. B. e KENNEDY, J. A. Analysis of the oxidative degradation of proanthocyanidins under basic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.8, 2004/04/01, p.2292-2296. 2004.
- KAMAL-ELDIN, A., PETTERSSON, D. e APPELQVIST, L.-Å. Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum. *Lipids*, v.30, n.6, 1995/06/01, p.499-505. 1995.
- KOIKE, K., LI, W., LIU, L. J., HATA, E. e NIKAIDO, T. New phenolic glycosides from the seeds of cucurbita moschata. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.53, n.2, Feb, p.225-228. 2005.
- KORNSTEINER, M., WAGNER, K.-H. e ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, v.98, n.2, p.381-387. 2006.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E. e ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, v.113, n.9, Supplement 2, p.71-88. 2002.
- KUBICKA, E., JEDRYCHOWSKI, L. e AMAROWICZ, R. Effect of phenolic compounds extracted from sunflower seeds on native lipoxygenase activity. *Grasas y Aceites*, v.50, n.2, p.127-130. 1999.
- LAZAROU, D., GROUGNET, R. e PAPADOPOULOS, A. Antimutagenic properties of a polyphenol-enriched extract derived from sesame-seed perisperm. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.634, n.1-2, p.163-171. 2007.
- LEMONS, M. R. B., SIQUEIRA, E. M. D. A., ARRUDA, S. F. e ZAMBIAZI, R. C. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*dipteryx alata* vog.]. *Food Research International*, v.48, n.2, p.592-597. 2012.
- LEONARDIS, A. D., MACCIOLA, V. e ROCCO, A. D. Oxidative stabilization of cold-pressed sunflower oil using phenolic compounds of the same seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, p.523-528. 2003.
- LI, D. e HU, X. Chapter 4 - fatty acid content of commonly available nuts and seeds. In: R. P. Victor, W. Ronald Ross, R. R. W. Vinood B. Patela2 - Victor R. Preedy e B. P. Vinood (Ed.). *Nuts and seeds in health and disease prevention*. San Diego: Academic Press, 2011. Chapter 4 - fatty acid content of commonly available nuts and seeds, p.35-42
- LI, Y.-G., TANNER, G. e LARKIN, P. The dmca-hcl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.70, n.1, p.89-101. 1996.
- MALIK, N. S. A., PEREZ, J. L., LOMBARDINI, L., CORNACCHIA, R., CISNEROS-ZEVALLOS, L. e BRAFORD, J. Phenolic compounds and fatty acid composition of organic and conventional grown pecan kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.89, n.13, p.2207-2213. 2009.
- MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.12, 2002/06/01, p.3444-3452. 2002.

- MOHDALY, A. A. A., SMETANSKA, I., RAMADAN, M. F., SARHAN, M. A. e MAHMOUD, A. Antioxidant potential of sesame (*sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, v.34, n.1, p.952-959. 2011.
- MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P. D., ARAÚJO, E. D. L. e AMORIM, E. L. C. D. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v.28, p.892-896. 2005.
- MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J. M., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J. e PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v.72, n.2, p.145-171. 2001.
- MUKHOPADHYAY, S., LUTHRIA, D. L. e ROBBINS, R. J. Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.86, n.1, p.156-162. 2006.
- OOMAH, B. D., KENASCHUK, E. O. e MAZZA, G. Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, n.8, 2012/08/22, p.2016-2019. 1995.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, v.44, p.307-315. 1986.
- PELLEGRINI, N., SERAFINI, M., SALVATORE, S., DEL RIO, D., BIANCHI, M. e BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.50, n.11, p.1030-1038. 2006.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ- RUBIO, M. E., SERRANO, J., GOÑI, I. e 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.
- PERICIN, D., KRIMER, V., TRIVIC, S. e RADULOVIC, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. *Food Chemistry*, v.113, n.2, p.450-456. 2009.
- POUDEL, P. R., TAMURA, H., KATAOKA, I. e MOCHIOKA, R. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.21, n.8, p.622-625. 2008.
- PRICE, M. L., VAN SCOYOC, S. e BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.26, n.5, 2012/01/10, p.1214-1218. 1978.
- RAMACHANDRAN, S., SINGH, S. K., LARROCHE, C., SOCCOL, C. R. e PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications - a review. *Bioresource Technology*, v.98, n.10, p.2000-2009. 2007.
- RANGKADILOK, N., PHOLPHANA, N., MAHIDOL, C., WONGYAI, W., SAENGSOOKSREE, K., NOOKABKAEW, S. e SATAYAVIVAD, J. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*sesamum indicum* l.) seeds and oil products in thailand. *Food Chemistry*, v.122, n.3, p.724-730. 2010.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. e RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, n.9, p.1231-1237. 1999.
- SCHIEBER, A., STINTZING, F. C. e CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, v.12, n.11, p.401-413. 2001.
- SCHMIDT, T. J., KLAES, M. e SENDKER, J. Lignans in seeds of linum species. *Phytochemistry*, v.82, Oct, p.89-99. 2012.



- SHAHIDI, F., ALASALVAR, C. e LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.4, 2007/02/01, p.1212-1220. 2007.
- SHAHIDI, F., LIYANA-PATHIRANA, C. M. e WALL, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, v.99, n.3, p.478-483. 2006.
- SHYU, Y.-S. e HWANG, L. S. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted burma black sesame meal. *Food Research International*, v.35, n.4, p.357-365. 2002.
- THIES, M. e FISCHER, R. Über eine neue farbreaktion zum mikrochemischen nachweis und zur quantitativen bestimmung von catechinen. *Microchimica Acta*, v.59, n.1, 1971/01/01, p.9-13. 1971.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. e ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, n.9, p.853-876. 2001.
- VELIOGLU, Y. S., MAZZA, G., GAO, L. e OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.10, 1998/10/01, p.4113-4117. 1998.
- VENKATACHALAM, M. e SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.13, 2006/06/01, p.4705-4714. 2006.
- VILLARREAL-LOZOYA, J. E., LOMBARDINI, L. e CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*carya illinoensis* (wangenh.) k. Koch] cultivars. *Food Chemistry*, v.102, n.4, p.1241-1249. 2007.
- WANG, L. e WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, v.17, n.6, p.300-312. 2006.
- WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: R. E. Wrolstad (Ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc., v.Supplement 6, 2002. Determination of total phenolics, p.II.1.1-8
- WEISZ, G. M., KAMMERER, D. R. e CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*helianthus annuus* L.) kernels and shells by hplc-dad/esimsn. *Food Chemistry*, v.115, n.2, p.758-765. 2009.
- WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., GEBHARDT, S. E. e PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.12, 2004/06/01, p.4026-4037. 2004.
- YANG, J., LIU, R. H. e HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, n.1, p.1-8. 2009.
- ZHU, K., ZHOU, H. e QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (wgph) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, v.41, n.6, p.1296-1302. 2006.



#### **CAPÍTULO 4 - EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO CONVENCIONAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA TORTA DE GERGELIM**

Para dar continuidade ao presente trabalho foi escolhida a torta de gergelim, ainda que ela não apresente um alto teor de compostos fenólicos ou atividade antioxidante. Essa torta é rica em glicosídeos de lignanas que têm despertado um grande interesse da indústria devido às suas propriedades nutracêuticas e, somado a isto, deve-se levar em conta o volume alto de óleo de gergelim produzido mundialmente, fazendo com que o aproveitamento desse subproduto seja ainda mais relevante. Conforme demonstrado no Capítulo 3, as tortas de noz pecã e avelã apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e as maiores atividades antioxidantes. Entretanto, a produção de óleo de avelã e noz pecã é bastante limitada e, dessa forma, as tortas são produzidas em um volume bastante reduzido, o que fez com que essas matérias primas fossem preteridas em relação ao gergelim.

Neste capítulo será apresentado o procedimento utilizado para extração dos compostos fenólicos e as ferramentas usadas para otimizar o processo de extração. Na sequência, serão demonstrados e discutidos os resultados obtidos na forma de um artigo escrito em língua inglesa publicado na revista *Separation and Purification Technology*. O objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a influência de alguns parâmetros na extração de compostos bioativos da torta de semente de gergelim, com a finalidade de se obter a condição ótima de extração desses compostos e, assim, possibilitar a melhor utilização desse subproduto.

## 4.1 Materiais e Métodos

A torta de semente gergelim utilizada nos experimentos descritos a seguir foi preparada conforme descrito no capítulo anterior.

### 4.1.1 Extração dos compostos fenólicos

A extração convencional dos compostos fenólicos foi realizada em uma célula de vidro encamisada, acoplada a um condensador. A célula usada para extração tem 7,5 cm de diâmetro externo e altura de 10 cm. Durante o processo, ela foi conectada a um banho de aquecimento (Lauda, modelo TYP T, Alemanha) e posicionada sobre um agitador magnético (Fisatom, modelo 706A, Brasil). O condensador, por sua vez, foi ligado a um banho de resfriamento mantido a 5 °C (Lauda, modelo RM 12, Alemanha). Uma fotografia desse aparato experimental é apresentada na Figura 4.1.

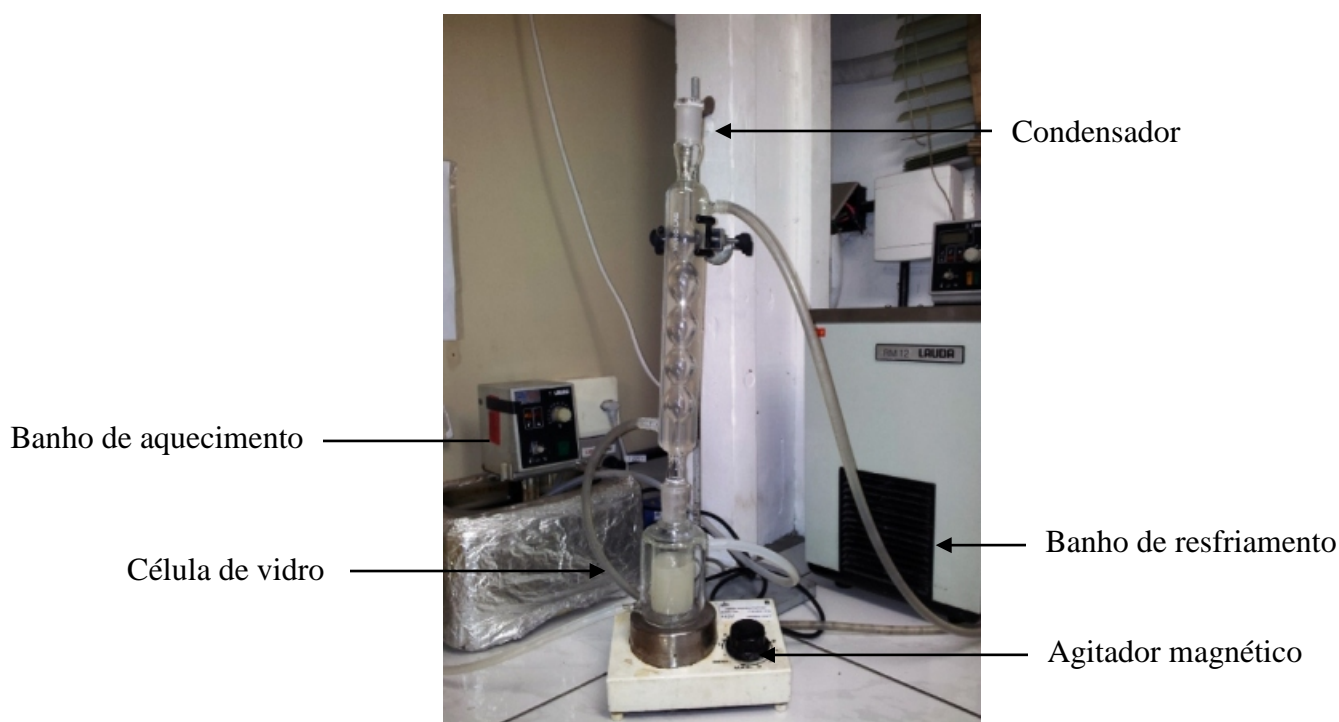


Figura 4.1 – Aparato experimental utilizado para extração convencional.

As extrações foram realizadas no aparato da Figura 4.1 em um ciclo de 40 minutos. A temperatura, a concentração de etanol e o volume de solvente utilizado foram determinados de

acordo com as condições estabelecidas no planejamento fatorial. Aproximadamente 1 g de amostra foi pesada em balança analítica (Bosh, modelo SAE 200, Alemanha) e seu peso foi anotado para posterior correção da concentração. A solução extratora foi inserida na célula e deixada estabilizar na temperatura de extração; a seguir, a amostra foi inserida. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Cientec, modelo CT 5000R, Brasil) por 15 min, a 4757 g e a temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi coletado em uma proveta e seu volume foi ajustado utilizando a solução extratora. Esse extrato foi centrifugado mais uma vez, nas mesmas condições, para completa remoção dos sólidos. O extrato contendo os compostos fenólicos foi, então, armazenado refrigerado até a realização das análises.

#### ***4.1.2 Planejamento experimental e análise estatística***

Foi realizado um planejamento experimental para avaliar a influência de três variáveis independentes na concentração de fenólicos no extrato. As variáveis analisadas foram: temperatura de extração, razão sólido-solvente e concentração de etanol na solução extratora. Os experimentos foram planejados utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), sendo essa análise estatística recomendada para experimentos com três fatores independentes (Rodrigues e Iemma, 2005). Com o DCCR é possível calcular os efeitos de cada variável, verificar quais parâmetros exercem influência significativa, ou quais parâmetros têm interações significativas com os demais, e analisar a superfície de resposta proveniente dos experimentos. Utilizou-se um fatorial completo  $2^3$ , incluindo 6 pontos axiais e 5 pontos centrais para a avaliação do erro puro. A Tabela 4.1 apresenta os valores codificados e originais das variáveis de estudo analisadas no planejamento experimental da extração de fenólicos da torta de gergelim.

A faixa de temperaturas foi definida de acordo com os limites do banho de aquecimento utilizado. O faixa de volume de solvente utilizado foi de 9 a 35 mL; nesse volume foi dissolvido 1 g de torta sendo os quocientes entre o peso de torta e o volume de solvente os valores apresentados na Tabela 4.1 para  $X_2$ . O limite inferior foi definido em 9 mL pois em torno de 3 mL de solvente são absorvidos pela torta durante a extração, não conseguindo ser separado pela centrifugação. Volumes inferiores a esse valor iriam dificultar a obtenção de extrato. O limite superior de volume de solvente foi escolhido como sendo a diluição máxima da amostra na qual é possível realizar a análise de fenólicos totais sem ser necessária uma etapa prévia de

concentração. As concentrações de etanol para extração de fenólicos da torta de gergelim foram escolhidas a fim de abranger a maior faixa possível, que foi de 0 a 95 % de etanol.

Tabela 4.1 – Planejamento fatorial: valores codificados e originais das variáveis de estudo, temperatura, razão sólido-solvente e concentração de etanol.

Variáveis independentes		Níveis codificados				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	$X_1$	25	38	58	77	90
Razão sólido-solvente (g/mL)	$X_2$	0,03	0,05	0,07	0,09	0,11
Concentração de etanol (%)	$X_3$	0	19,2	47,5	75,8	95

As respostas avaliadas estatisticamente foram o teor de fenólicos totais, de sesaminol triglicosídeo e de sesamina nos extratos, além da sua atividade antioxidante pela captura do radical ABTS. Para análise dos resultados, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta através do *software* Statistica® versão 7.0 (*Statsoft Inc.*, Tulsa, Estados Unidos). O modelo polinomial apresentado na Equação 3.2 foi utilizado para modelagem dos dados experimentais:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.1)$$

onde  $\beta_n$  são os coeficientes de regressão;  $Y$  é a variável de resposta e  $X_i$  são as variáveis independentes.

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

$$E(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_{\text{exp}} - y_{\text{calc}}|}{y_{\text{exp}}} \quad (4.2)$$

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

Ainda, foram calculados os valores das variáveis independentes que maximizam cada variável de resposta através do *software* Matlab® 5.3, utilizando-se os modelos obtidos nesse

estudo e Método de Programação Sequencial Quadrático implementado na função *fmincon*. Utilizando as condições otimizadas, foi realizada a validação do modelo obtido. Foram realizados experimentos em duplicata nas condições ótimas e os valores obtidos foram comparados com os calculados pelo modelo.

#### 4.1.3 Análises dos resultados

Conforme mencionado anteriormente, as variáveis de resposta (resultados) do planejamento experimental foram fenólicos totais, atividade antioxidante, teor de sesamina e de sesaminol triglicosídeo. As análises de fenólicos totais e de captura do radical ABTS para os extratos de torta de gergelim foram realizadas conforme descrito nos itens 3.1.3 e 3.1.4 do capítulo anterior. As análises de sesamina e de glicosídeos de lignanas, incluído o sesaminol triglicosídeo, foram realizadas utilizando HPLC. As condições cromatográficas utilizadas foram apresentadas no item 3.1.5.

Nesse capítulo, além da identificação dos compostos por HPLC, foi realizada também a sua quantificação. Para tal, foram utilizadas curvas de calibração cuja montagem foi feita com padrões de sesamina e sesamol (*Sigma*, Estados Unidos); esses padrões são os únicos padrões de lignanas encontrados comercialmente. Foram elaboradas soluções estoque de sesamina e sesamol separadamente, da seguinte forma: os padrões foram pesados em balança analítica e diluídos em etanol 95 % (Vetec, Brasil), agitados em vortex (Phoenix Lufenco, modelo AP 56, Brasil) e deixados no ultrassom (*Unique*, modelo Ultracleaner 1600A, Brasil) por 3 min para homogeneização do padrão no etanol. A concentração inicial das soluções estoque foi de 800 µg/mL. A partir dessas soluções foi possível observar, através da comparação dos tempos de retenção, que os extratos não continham quantidades detectáveis de sesamol, apenas sesamina. Portanto, prosseguiu-se com a curva de calibração apenas desse padrão.

A solução estoque de sesamina foi diluída nas concentrações de 3, 5, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL. Cada uma das diluições elaboradas e cada um dos extratos de torta de gergelim foram injetados em triplicata no cromatógrafo. A curva obtida para as diferentes concentrações de sesamina é apresentada na Figura 4.2. Essa curva foi utilizada para quantificação da sesamina e do sesaminol triglicosídeo.

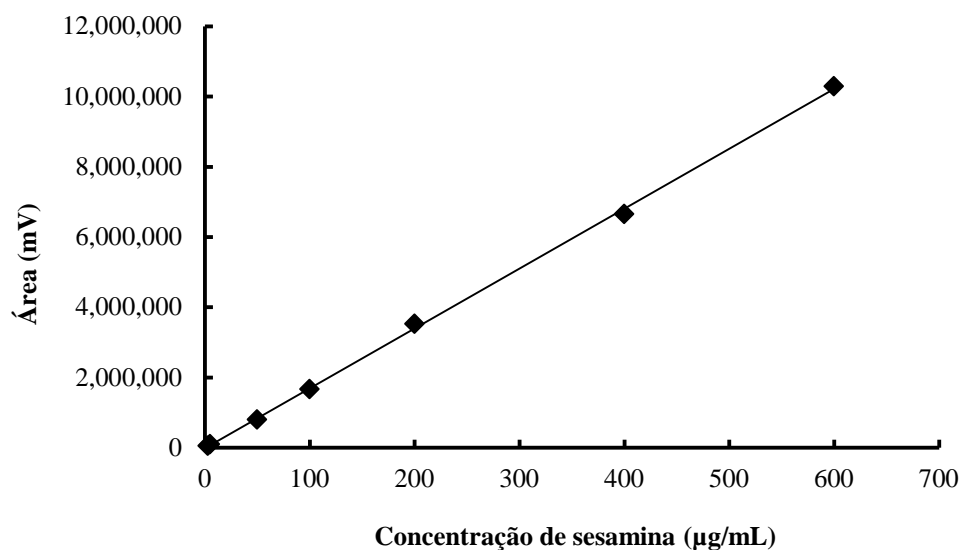


Figura 4.2 - Curva de calibração da concentração do padrão de sesamina versus a área do pico obtido ( $R^2=0,9995$ ).

#### *Identificação do sesaminol triglicosídeo*

Para identificação do sesaminol triglicosídeo, foi utilizado um cromatógrafo equipado com um detector DAD (Diodo Array Detector) UV-Visível. O equipamento de HPLC utilizado foi da marca Agilent (modelo 1260 *infinity*, Estados Unidos), equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático e um forno para controle de temperatura, todos também da marca Agilent e do modelo 1260 *infinity*. Para separação dos compostos fenólicos foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, Estados Unidos) de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e com partículas de 5 µm de diâmetro médio, acoplada a uma pré coluna de 12,5 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno da mesma marca e modelo. Nesse equipamento foi possível obter o espectro UV do pico a ser identificado e determinar os comprimentos de onda de máxima absorbância para comparação com a literatura referente a esse composto.



## 4.2 Artigo 2

### OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF PHENOLICS FROM SESAME SEED CAKE

Artigo publicado na revista *Separation and Purification Technology*, volume 122, páginas 506-514.

Authors: Júlia Ribeiro Sarkis, Iuri Michel, Isabel Cristina Tessaro and Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Chemical Engineering Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Abstract:** Sesame seed cake is considered to be a by-product of the oil industry, being commonly used as cattle feed in several producing countries. However, this residue can be recovered and value added. The main phenolics found in sesame seed are lignans, which are important bioactive compounds of this seed. The main lignans in defatted sesame were identified as sesaminol triglucoside, sesamolol diglucoside and sesaminol diglucoside. The objective of this study was to optimize the extraction of total phenolics and lignans from sesame seed cake. A second-order polynomial model was set up to predict the responses using response surface methodology (RSM). The independent variables analyzed were temperature (25–90 °C), solid/solvent ratio (0.03 – 0.11 g/mL) and ethanol concentration (0 – 95%). Response variables were the concentrations of total phenolics (TP), sesamin (SES), sesaminol triglucoside (ST) and antioxidant activity (ABTS). The extracted amount of TP ranged between 129.7 and 355.3 mg GAE/100 g, SES from 3.2 to 25.7 mg SES/100 g, ST from 208.1 to 537.5 mg SE/100 g and the ABTS of the extracts was between 8460 and 24311 µM TE. Among the analyzed compounds, ST is presented in the highest quantity in sesame cake. Solid to liquid ratio and ethanol concentration were the most important factors affecting extraction, whereas temperature showed reduced influence. The model obtained to describe the effect of these factors on the extraction of ST was satisfactorily validated.

#### 4.2.1 Introduction

Sesame (*Sesamum indicum*L.) is an oilseed that belongs to the pedaliaceae family. The sesame seed is an important crop around the world due to its high oil content, being the ninth most cultivated oilseed (Namiki, 1995; Beltrão *et al.*, 2001). World production of sesame in 2011 was 4.092 million ton, with a harvested area of 6.628 million ha. The main producing countries of this seed are China, India and Myanmar (FAO, 2010). Sesame seed cake is the product obtained after oil is removed from sesame, usually by cold pressing. The cake obtained from sesame is composed by 35.6% protein, 7.6% crude fiber and 11.8% ash and has 83.2% of dry matter (Ramachandran *et al.*, 2007). The production of sesame cake is estimated to be very high, considering that 70% of these seeds are cultivated for oil production (Namiki, 1995).

Sesame seed cake is considered to be a by-product of the oil industry, being commonly used as cattle feed in several producing countries. However, this residue can be recovered and value added. The main phenolics found in sesame seed are lignans, which are physiologically active and are important functional compound of this seed (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994; Suja *et al.*, 2004a; Suja *et al.*, 2005; Mohdaly *et al.*, 2010; Reshma *et al.*, 2010; Mohdaly *et al.*, 2011). Studies involving sesame lignans have been done for a long time. The main oil soluble lignans in sesame are sesamin and sesamolin, while sesamol and sesaminol are found in the seed (Haslam and Haworth, 1955; Fukuda *et al.*, 1985; Kamal-Eldin *et al.*, 1995; Namiki, 1995). More recently, the presence of high amounts of lignin glucosides were found in sesame cake; these glucosides can be considered as hydrophilic antioxidants. Among them, are sesaminol, pinoresinol and sesamololol glucosides (Kang *et al.*, 1999; Shyu and Hwang, 2002). The main lignans in defatted sesame were identified as sesaminol triglucoside, sesamololol diglucoside and sesaminol diglucoside. These compounds should be considered when breeding new sesame seeds or for any potential incorporation of the seeds into functional foods (Moazzami *et al.*, 2006a, 2006b). The amount of lignans in sesame seeds has been reported to be of 0.63%, which makes them a rich source of lignans (Moazzami and Kamal-Eldin, 2006). Sesame seeds and flaxseeds are considered to be the richest sources of lignans of all plant foods (Eliasson *et al.*, 2003; Smeds *et al.*, 2012). Sesame lignans have demonstrated several health benefits in disease treatment and prevention, being considered bioactive compounds (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Studies performed with sesame seed cake or defatted sesame flour show that this product can reduce susceptibility to oxidative stress (Kang *et al.*, 1999), prevent obesity and hyperglycemia

(Bigoniya *et al.*, 2012), reduce cholesterol levels (Visavadiya and Narasimhacharya, 2008), among other effects (Lazarou *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2011).

The extraction and purification of antioxidants from natural sources is of high interest, especially from residues. These bioactive substances are used in functional foods, food additives, nutraceuticals, pharmaceuticals and cosmetic industries (Shahidi and Naczki, 2004). The extraction yield is dependent on several parameters; solvent and extraction method (Goli *et al.*, 2005), extraction time and temperature (Goli *et al.*, 2005; Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005; Silva *et al.*, 2007; González-Montelongo *et al.*, 2010) and solid to solvent ratio (Cacace and Mazza, 2003a), among others. For this reason, an appropriate choice of these variables may significantly enhance extraction efficiency. It is important to consider that, the role of each factor in the extraction process is not always obvious. Each natural product has a different composition and structure and this will interact with the chemical characteristics of the solvent in a diverse way (Al-Farsi and Lee, 2008). This variability reinforces the importance of researching the extraction process for different food matrixes.

To the best of our knowledge, very little research has been published on the evaluation of the influence of different parameters on lignans extraction from oilseeds (Moazzami *et al.*, 2006b; Ho *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Nemes and Orsat, 2012) and most of the referenced works are aimed to extract flaxseed lignans. The objective of this study was to optimize the extraction of total phenolics and lignans from sesame seed cake. A second-order polynomial model was set up to predict the responses using response surface methodology (RSM). The effects and interactions among extraction temperature, solid/liquid ratio and ethanol concentration were investigated by the response surface analysis.

#### **4.2.2 Materials and Methods**

##### *Plant material*

Sesame (*S. indicum* L.) seed cake was kindly provided by the company Vital Âtman (São Paulo, Brazil). The seeds for cake production were cultivated in Brazil, cropped in 2010, and the cake was obtained after cold pressing of the seeds. The sample was ground to powder using a stainless steel blender and passed through a 2.36 mm sieve. Prior to the extraction, a defatting

process was carried out using a fat extraction apparatus (Tecnal, model TE-044, Brazil). The cake was immersed in hexane for 1 h, then suspended and submitted to solvent recirculation for 2 h, followed by air-drying. After the complete oil removal, the moisture content of the cake was determined according to the gravimetric method (AOAC, 1990). This defatted cake was used for extractions, thus results are presented as mg per 100 g of defatted cake.

### *Chemicals*

Ethanol 95 % and the Folin-Ciocalteu reagent were obtained from (Vetec São Paulo, Brazil). HPLC grade methanol was used for the chromatographic analysis Vetec (São Paulo, Brazil). Gallic acid was purchased from Dinâmica (Diadema, Brazil) and ABTS, as well as sesamin (CAS 607-80-7), sesamol (CAS 533-31-3) and Trolox (CAS 53188-07-1) standards, were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

### *Extraction Procedure*

The extraction process was performed in a Pyrex glass vessel (7.5 cm external diameter and 10.0 cm height) equipped with a water jacket. Using a water bath (*Lauda*, modelo TYP T, Alemanha), hot water was passed through the jacket for the duration of the experiments in the desired temperature. During extraction, the glass cell was placed over a magnetic stirrer (Fisatom, model 706A, Brazil) and attached to a condenser, which was connected to a water bath (*Lauda*, model RM 12, Germany) maintained at 5 °C. According to the experimental design, a certain volume of solvent containing a pre-determined amount of ethanol was added to the glass cell and, after, the sesame seed cake (approximately 1.0 g) was inserted. The mixture was agitated and extractions were carried out for 40 min. To set this time, previous experiments were performed with the defatted cake. Contact time was evaluated up to 2 h for total phenolics and the extraction yield did not significantly increase after 40 min (data not shown). The test was performed at 58 °C, using 0.11 g/mL and ethanol 48% as a solvent. Subsequent to the extraction, samples were centrifuged (*Cientec*, model CT 5000R, Brazil) for 15 min, at 4757 g and 25 °C. The supernatant was collected and the volume of extract was adjusted according to the initial ratio. Finally, extracts were cooled until analysis. Preceding the HPLC analysis, the extracts were filtered through a 0.45 µm membrane filter.

*Experimental design and statistical data analysis*

A central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM) were used to optimize experimental conditions for the extraction of total phenolics, lignans and antioxidants from sesame seed cake and to analyze the influence of three independent variables. The independent variables chosen were temperature ( $X_1$ ), solid to solvent ratio ( $X_2$ ) and ethanol concentration ( $X_3$ ); the levels in which the variables were analyzed are shown in Table 4.2. To determine the influence of the selected parameters on the response variables, a  $2^3$  full factorial design with 6 axial and 5 central points was used. The complete set of experiments is presented in Table 4.3. Using the results presented in Table 4.3, multiple linear regressions with the second order polynomial model (Equation (1)) were performed. Also, an analysis of variance (ANOVA) was used to estimate the statistical significance of each factor and their interactions. The regression coefficients, the determination coefficient, the F-value for the model and the average error between the experimental and the predicted values (calculated using Equation (2)) are presented in Table 4.4. The model obtained considered only the influences of significant factors ( $p < 0.05$ ); thus, the insignificant effects are absent in the equations and were not considered in the response surface graphics. The regression coefficients presented in Table 4.4 are valid for variables in their coded form. The error between the repetitions of the central point was of 2.8%, 0.85%, 1.6% and 11.8% for TP, SES, ST and ABTS, respectively.

Table 4.3. The order in which the experiments were performed was randomized to minimize error due to extraneous factors.

Table 4.2 – Coded and uncoded levels of the independent variables.

Independent variables	Code units	Code Levels				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperature (°C)	X1	25	38	58	77	90
Solid to solvent ratio (g/mL)	X2	0.03	0.05	0.07	0.09	0.11
Ethanol concentration (%)	X3	0	19.2	47.5	75.8	95

Multiple linear regression analysis was performed using software Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). Experimental data were fitted to the second-order polynomial model presented in Equation 1, and regression coefficients ( $\beta$ 's) were obtained.

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

where  $Y$  represents the dependent variables (estimated responses) and  $\beta$ 's represent the equation coefficients. An analysis of variance (ANOVA) was performed for each response and the  $p$ -values, at a probability of 0.05, indicated whether the terms were significant or not. Terms that were not significant were removed from the final models. The significance of the regression was also evaluated using ANOVA. To verify the adequacy of the models, the experimental data were compared to the values predicted by the regression models and the average error was determined using Equation 2:

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

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

### *Determination of the optimum conditions and validation of the model*

The values of the independent variables that maximize the extraction yield for each response variable were determined through Matlab® 5.3 software using the *fmincon* function that uses Sequential Quadratic Programming (SQP) method and the experimental models obtained in this work. The verification of the validity and adequacy of the predictive extraction model was realized in these optimum conditions of solvent composition, temperature and solid to solvent ratio. Two experimental replicates were performed at the optimized conditions and the experimental and predicted values were compared.

### *Analysis of the response variables*

#### Total Phenolics

The method for determination of total phenolic compounds (TP) was adapted from Waterhouse (2002). Briefly, 40 µL of extract (or water, for the blanks) were dissolved in 3.2 mL of distilled water and 200 µL of the Folin-Ciocalteu reagent; the mixture was agitated and left in the dark for 5 min. Subsequently, 600 µL of saturated sodium carbonate solution was added and agitation was performed in a vortex equipment. Absorbance was measured at 765 nm after the solution was kept in the dark for 1 h. Concentration was calculated using calibration curve with gallic acid (0.05 – 0.5 mg/g,  $R^2=0.999$ ) as standard. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 g of sample in a dry basis (mg GAE/100 g).

#### Sesamin, sesamol and sesaminol triglucoside

Lignan and lignan glucosides were analyzed using HPLC according to the procedure of Rangkadilok *et al.* (2010). The analysis was carried out in a PerkinElmer chromatography system equipment with a quaternary pump, a UV-Vis detector and a column oven. Separation was conducted on a reversed-phase C18 column (5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d.) coupled to a C18 guard column (5 µm, 15 mm × 3.2 mm i.d.). The extracts were separated using mixtures of water (mobile phase A) and methanol (mobile phase B). The eluent flow rate was maintained at 1.0 mL/min, the injection volume was 20 µL, and the detection wavelength and column temperature were set to 280 nm and 40 °C, respectively. The elution program with a linear gradient was as follows: 0 min, 5 % B; 0-5 min, 18 % B; 5-10 min, 35 % B; 10-15 min, 62 % B; 15-18 min, 80 %; 18-22 min, 80 %; 22-23 min, 5 % B; 23-26 min, 5% B.

For lignans detection the only two commercially available standards were purchased: sesamin and sesamol. The standards were individually dissolved in ethanol to prepare 800 µg/mL stock solutions. The identity of the analytes was confirmed by comparing their HPLC retention time with the analytical standard. Sesamol was not detected, or present in very small amounts, in the samples. For this reason the calibration curve was made for sesamin only. The absence of sesamol in sesame cake extracts is in agreement with previous literature (Shyu and Hwang, 2002). Sesamin stock solution was dissolved in appropriate volume of ethanol to obtain concentrations of: 3, 5, 50, 100, 200, 400 and 600 µg/mL. All stock and working solution were maintained at -4 °C in a freezer and thawed to room temperature before use. Sesamin (SES) was quantified using the calibration curve of the appropriate standard compound (mg/100 g). The response linearity of the analysis was tested over the range of concentrations used; the determination coefficient of the calibration curve was 0.999.

For sesaminol triglucoside identification a chromatographer, equipped with a DAD UV-Vis detector, was used (Agilent, model 1260 Infinity, USA). In this system, a C18 column (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, USA) was also used for the separation of the compounds. With this HPLC equipment it was possible to obtain an UV spectrum of the peaks; the spectrum was compared with the available literature to identify this compound. Sesaminol triglucoside (ST) was quantified as sesamin equivalents (mg SE/100 g) using the calibration curve for this standard.

### Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of the extracts was determined by using the ABTS decolorization assay as described by Rufino *et al.* Rufino *et al.* (2007). ABTS radical was produced by mixing an ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate (140 mM) and keeping the mixture in the dark at room temperature for 12 h. Afterwards, the ABTS radical solution was diluted in ethanol 95 % until absorbance at 734 nm reached 0.7 ( $\pm 0.02$ ). Aliquots of 30 µL of the extracts (or water, for the control) and 3 mL of the ABTS solution ( $A_{734} = 0.70 \pm 0.02$ ) were mixed using a vortex and absorption was determined after 6 min. The percentage of radical inhibition (ABTS) was calculated using Equation 3:

$$AC_{ABTS}(\%) = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$



The standard calibration curves were constructed by plotting percent inhibition values as a function of the concentration of Trolox (100 – 2000  $\mu\text{M TE}$ ,  $R^2=0.997$ ). Using this curve, the antioxidant activity of the samples was calculated in terms of Trolox equivalents ( $\mu\text{M TE}$ ).

All of the analyses in this study were performed in triplicate and the standard deviations (SD) are presented with the results.

### **4.2.3 Results and discussion**

#### *HPLC analysis of sesamin and sesaminol triglucoside*

HPLC analysis was performed for qualification and quantification of lignans and their glucosides from sesame seed cake. Two of the obtained chromatograms are shown in Figure 4.3. Sesamin (peak 11) and sesamol (peak 1) were identified using external calibration standards. According to the applied HPLC methodology, peaks in the first portion of the chromatograms are lignan glucosides. Since sesamin has lower polarity, when compared to the lignan glucosides, the peak referring to this compound appears after a longer period of time (Shyu and Hwang, 2002; Rangkadilok *et al.*, 2010). The observed results are in agreement to the literature, considering that lignan glucosides appear approximately from 18 to 24 min (peaks 2–10) and sesamin is detected latter, approximately at 25.3 min. In all experiments the peak with the highest area was peak 3, which could be sesaminol triglucoside. This lignan glucoside has been reported to be the main lignan in sesame cake and, due to its low polarity, it is one of the first peaks observed in lignan chromatograms (Ryu *et al.*, 1998; Shyu and Hwang, 2002; Moazzami *et al.*, 2006b). The UV spectrum of peak 3 showed maximum absorption at the wave lengths of 238 and 291 nm, which is consistent with the literature for sesaminol triglucoside (Moazzami *et al.*, 2006b). Peak 3 accounted for a percentage between 40.2% and 62.3% if added all areas from peaks 2 to 10 (lignan glucosides) and it was considered to be the main lignin glucoside in the sesame cake used in these experiments. For these reasons, the area of peak 3, tentatively identified as sesaminol triglucoside, was used as a response variable for extraction optimization.

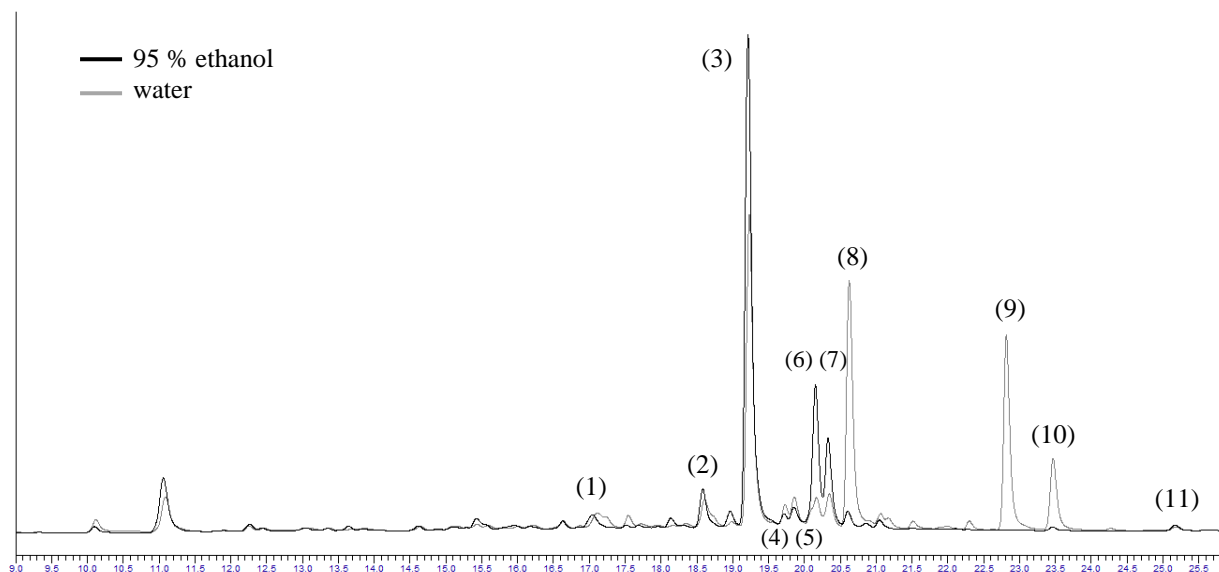


Figure 4.3 – HPLC chromatogram of the sesame seed cake for extractions performed with: (a) water, (b) 95 % ethanol. Peak assignment: (1) sesamol, (2) to (10) lignan glucosides and (11) sesamin.

In Figure 4.3, two different chromatograms are presented. The results differ from each other when different solvents were used in the extractions. Figure 4.3 shows the chromatograms of the extracts using different solvent solutions and in the same temperature (58 °C) and solid to liquid ratio (0.07 g/mL). It is possible to observe that peaks 8, 9 and 10 increase when water is used as solvent, whereas peaks 6 and 7 decrease. These changes are probably due to different polarities of sesame lignans. Very different chromatograms were also observed by Shyu and Hwang (2002), when sesame cake lignan extract was fractionated in diverse methanol concentrations between 25% and 100%. According to their study, extracts obtained using 100% methanol presented high amounts of sesamin and sesamolin and very low amounts of sesaminol triglucosides, while sesaminol diglucoside was the main lignan glucoside when 75% methanol was used. The 50% methanol extract showed sesaminol triglucoside as the main lignan, followed by sesaminol diglucoside. When 25% methanol was used none of the above mentioned lignans was detected, however peaks in the first portion of the chromatograms were detected and reported as highly polar compounds.

#### *Experimental ranges and determination of relevant variables*

At the beginning of the present research, the three independent variables were investigated to determine the ranges in which the studies would be conducted to optimize

extraction. Temperature ranges were selected based on the limitations of the extraction system, which was unpressurized and used water as the heating medium. The lower limit of the solid to solvent ratio was chosen to yield a significant amount of extract even after some of the solvent was absorbed by the cake after centrifugation (approximately 3 mL); the upper limit was determined based on the detection limits of the response variables analysis. Different water-ethanol mixtures were chosen as solvents. Since the extraction of polyphenols depends on the polarity of the solvents and compounds, a single solvent might not be effective for this process. Thus, is more efficient to use a combination of alcohol and water (Markom *et al.*, 2007). Although studies shown the efficiency of other solvent combinations using methanol (Suja *et al.*, 2005; Reshma *et al.*, 2010), ethanol was chosen since is a preferable solvent from considerations of safety to health and handling (Zhang *et al.*, 2007). Also, according to the research of Chang *et al.* (2002), there was no difference between the yield and the antioxidant activity of extracts from sesame coat when ethanol, methanol or acetone were used.

In addition to the independent variables studied in this work, other parameters also influence the extraction of phenolic compounds such as solvent pH, contact time and number of extraction cycles. The contact time and the number of extraction cycles were fixated in 40 min and 1 cycle, respectively. Kinetic studies are currently being performed with more than one cycle, using the optimized conditions obtained in this study. Also, preliminary tests were performed using acidified ethanol (0.01 and 0.1 mol/L HCl) and the obtained extracts presented high turbidity, probably due to protein denaturation. The turbidity made it impossible to perform spectrophotometric analysis and this parameter was not evaluated.

### *Response surface analysis*

The extraction of total phenolics, SES and ST, as well as the antioxidant capacity of the extracts, was optimized through the RSM approach. A pre fixated time (40 min) was used in all extractions. The design arrangement and the experimental results of TP, SES, ST, and ABTS for all runs are reported in Table 4.3. The extracted amount of TP ranged between 129.7 and 355.3 mg GAE/100 g, SES from 3.2 to 25.7 mg SES/100 g, ST from 208.1 to 537.5 mg SE/100 g and the ABTS of the extracts was between 8460 and 24311IM TE. Among the analyzed compounds, ST is presented in the highest quantity, which is agreement with the literature for the sesame cake (Shyu and Hwang, 2002; Moazzami *et al.*, 2006b). Also, the determined quantities of ST

are in the range observed by the same authors. SES quantities detected are below than those reported in literature for sesame cake (Shyu and Hwang, 2002; Suja *et al.*, 2005). However, the mentioned studies used methanol as the extraction solvent which could have improved sesamin extraction. TP found in the extracts are in agreement with literature regarding sesame and sesame cake (Suja *et al.*, 2005; Mohdaly *et al.*, 2011). Still, the low amounts of total phenolics could be an indicative that lignans may show a poor response to the Folin–Ciocalteu method.

Using the results presented in Table 4.3, multiple linear regressions with the second order polynomial model (Equation (1)) were performed. Also, an analysis of variance (ANOVA) was used to estimate the statistical significance of each factor and their interactions. The regression coefficients, the determination coefficient, the F-value for the model and the average error between the experimental and the predicted values (calculated using Equation (2)) are presented in Table 4.4. The model obtained considered only the influences of significant factors ( $p < 0.05$ ); thus, the insignificant effects are absent in the equations and were not considered in the response surface graphics. The regression coefficients presented in Table 4.4 are valid for variables in their coded form. The error between the repetitions of the central point was of 2.8%, 0.85%, 1.6% and 11.8% for TP, SES, ST and ABTS, respectively.

Table 4.3 – Rotable central composite design in the original and coded form<sup>a</sup> of the independent variables ( $X_1$ ,  $X_2$  and  $X_3$ ) and experimental results ( $\pm$  SD) for the response variables, total phenolics (TP), sesamin (SE), sesaminol triglucoside (ST) and antioxidant capacity (ABTS)<sup>b</sup>.

$X_1$ T (°C)	$X_2$ Ratio (g/mL)	$X_3$ EtOH (%)	TP (mg GAE/100 g)	SES (mg /100 g)	ST (mg SE/100 g)	ABTS ( $\mu$ M TE)
38 (-1)	0.045 (-1)	19.2 (-1)	300.4 $\pm$ 3.5	11.7 $\pm$ 0.8	352.6 $\pm$ 2.0	24101 $\pm$ 271
77 (1)	0.045 (-1)	19.2 (-1)	266.2 $\pm$ 10.1	13.2 $\pm$ 0.6	464.9 $\pm$ 0.8	17834 $\pm$ 515
38 (-1)	0.09 (1)	19.2 (-1)	223.0 $\pm$ 9.6	3.3 $\pm$ 0.1	208.1 $\pm$ 2.2	16779 $\pm$ 285
77 (1)	0.09 (1)	19.2 (-1)	165.3 $\pm$ 3.5	4.1 $\pm$ 0.04	326.4 $\pm$ 3.5	10244 $\pm$ 229
38 (-1)	0.045 (-1)	75.8 (1)	248.1 $\pm$ 13.1	23.0 $\pm$ 0.01	515.6 $\pm$ 2.3	15190 $\pm$ 157
77 (1)	0.045 (-1)	75.8 (1)	270.6 $\pm$ 5.1	24.5 $\pm$ 0.8	456.3 $\pm$ 12.1	17096 $\pm$ 723
38 (-1)	0.09 (1)	75.8 (1)	194.5 $\pm$ 5.5	17.9 $\pm$ 0.2	404.9 $\pm$ 2.4	10865 $\pm$ 130
77 (1)	0.09 (1)	75.8 (1)	172.8 $\pm$ 6.0	19.4 $\pm$ 0.03	375.3 $\pm$ 3.1	10890 $\pm$ 111
25 (-1.68)	0.07 (0)	47.5 (0)	219.5 $\pm$ 17.8	17.9 $\pm$ 0.1	416.8 $\pm$ 8.4	14661 $\pm$ 856
90 (1.68)	0.07 (0)	47.5 (0)	275.8 $\pm$ 9.7	17.3 $\pm$ 1.1	378.4 $\pm$ 5.3	11141 $\pm$ 215
58 (0)	0.029 (-1.68)	47.5 (0)	355.3 $\pm$ 16.3	24.7 $\pm$ 0.2	537.5 $\pm$ 12.3	21155 $\pm$ 909
58 (0)	0.11 (1.68)	47.5 (0)	188.1 $\pm$ 7.7	13.1 $\pm$ 0.5	354.9 $\pm$ 4.6	12816 $\pm$ 1086
58 (0)	0.07 (0)	0 (-1.68)	304.5 $\pm$ 12.3	3.2 $\pm$ 0.1	238.4 $\pm$ 7.6	24311 $\pm$ 5860
58 (0)	0.07 (0)	95 (1.68)	129.7 $\pm$ 2.7	21.8 $\pm$ 0.2	219.0 $\pm$ 3.5	8460 $\pm$ 34
58 (0)	0.07 (0)	47.5 (0)	249.2 $\pm$ 10.6	18.2 $\pm$ 0.8	426.6 $\pm$ 3.8	14831 $\pm$ 146
58 (0)	0.07 (0)	47.5 (0)	241.5 $\pm$ 0.0	18.4 $\pm$ 0.4	435.7 $\pm$ 0.1	13601 $\pm$ 223
58 (0)	0.07 (0)	47.5 (0)	246.7 $\pm$ 3.5	18.6 $\pm$ 0.8	418.4 $\pm$ 3.2	14012 $\pm$ 1776
58 (0)	0.07 (0)	47.5 (0)	231.8 $\pm$ 8.4	18.5 $\pm$ 0.3	433.1 $\pm$ 4.0	11141 $\pm$ 116
58 (0)	0.07 (0)	47.5 (0)	246.3 $\pm$ 2.7	18.3 $\pm$ 0.8	429.3 $\pm$ 12.0	13359 $\pm$ 607

<sup>a</sup> Values in parenthesis are the coded forms of variables.

<sup>b</sup> All results are presented in dry basis.

Good fits were achieved and most of the responses variability was explained by the models. The lower value of the determination coefficient for the total phenolic model can be explained by the influence of partially dissolvable proteins in the extracts from the sesame cake. These compounds show an important interference when the Folin–Ciocalteu reagent is used for

total phenolics determination (Escarpa and González, 2001). Also, it is important to point out that the proteins present in the extracts can also react in antioxidant capacity assays and overestimate the antioxidant capacity of the samples (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008).

Table 4.4 – Significant regression coefficients of the predicted polynomial models for the investigated responses and model parameters.

Coefficients	Responses							
	TP	<i>p</i> -value	SES	<i>p</i> -value	ST	<i>p</i> -value	ABTS	<i>p</i> -value
$\beta_0$	247.8	$\leq 0.0001$	17.8	$\leq 0.0001$	435.5	$\leq 0.0001$	13200	$\leq 0.0001$
$\beta_1$	-	-	-	-	-	-	-1230	0,0292
$\beta_2$	-44.8	$\leq 0.0001$	-3.5	$\leq 0.0001$	-57.3	$\leq 0.0001$	-2891	$\leq 0.0001$
$\beta_{22}$	-	-	-	-	-	-	1267	0.0244
$\beta_3$	-26.6	0,0041	6.1	$\leq 0.0001$	26.9	0.0249	-3045	$\leq 0.0001$
$\beta_{33}$	-13.2	0,1075*	-2.3	$\leq 0.0001$	-64.6	$\leq 0.0001$	1055	0.0534*
$\beta_{13}$	-	-	-	-	-39.9	0.0128	1842	0.0150
$\beta_{23}$	-	-	0.9	0,0489	-	-	-	-
$R^2$	0.752		0.974		0.852		0.888	
$F_{\text{model}}$	15.7		128.6		20.1		15.9	
E (%)	9.3		11.1		7.8		10.9	

\* Significant at a confidence level of 90 %.

The visualization of the predicted model equation can be obtained by the surface response plot. Since there were three independent variables and the visualization is possible only for two variables, the response surfaces for dependent variables (TP, SES, ST and ABTS) were plotted in function of two factors when the third factor was kept constant at middle level (Table 4.2). The response surfaces are presented in Figures 4.4 to 4.6 and were drawn by software Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). The analysis for each independent variable will be presented separately as follows.

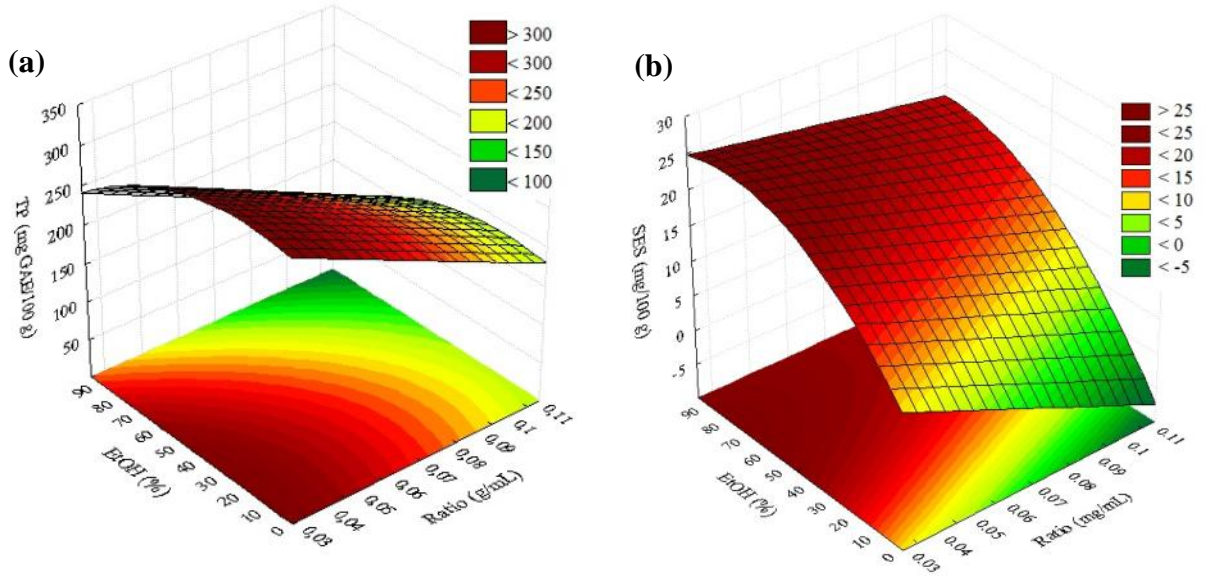


Figure 4.4 – Response surfaces and contour plots showing the effect of ethanol concentration and solid to liquid ratio on the extraction of TP (a) and SES (b) when fixing temperature at the centre point.

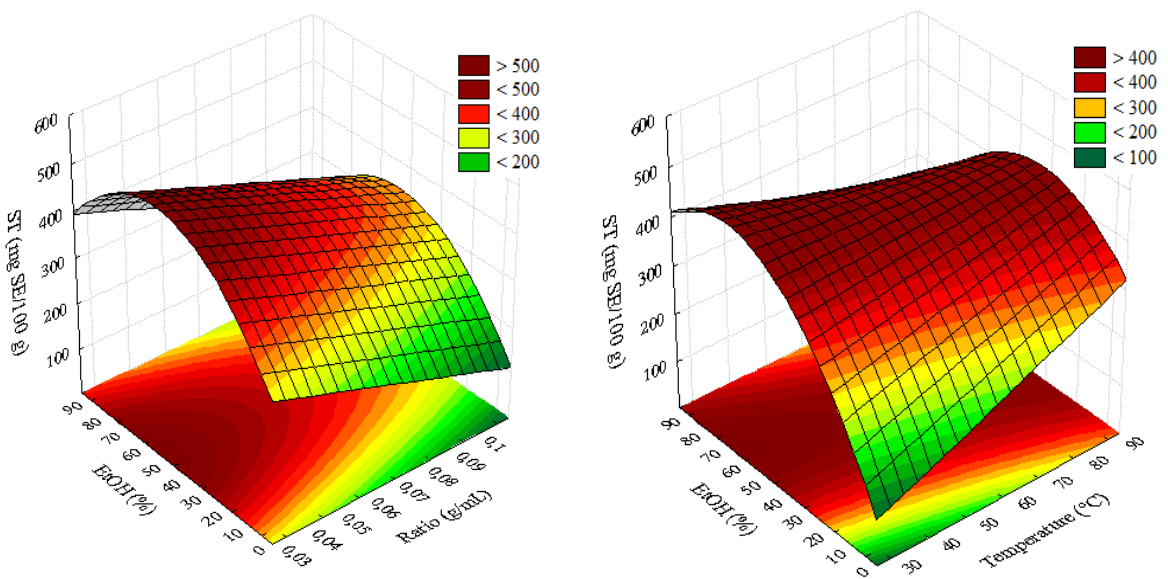


Figure 4.5 - Response surfaces and contour plots showing the effect of ethanol concentration, solid to liquid ratio and temperature on ST extraction. The value of the missing independent variable in each plot was kept at the centre point.

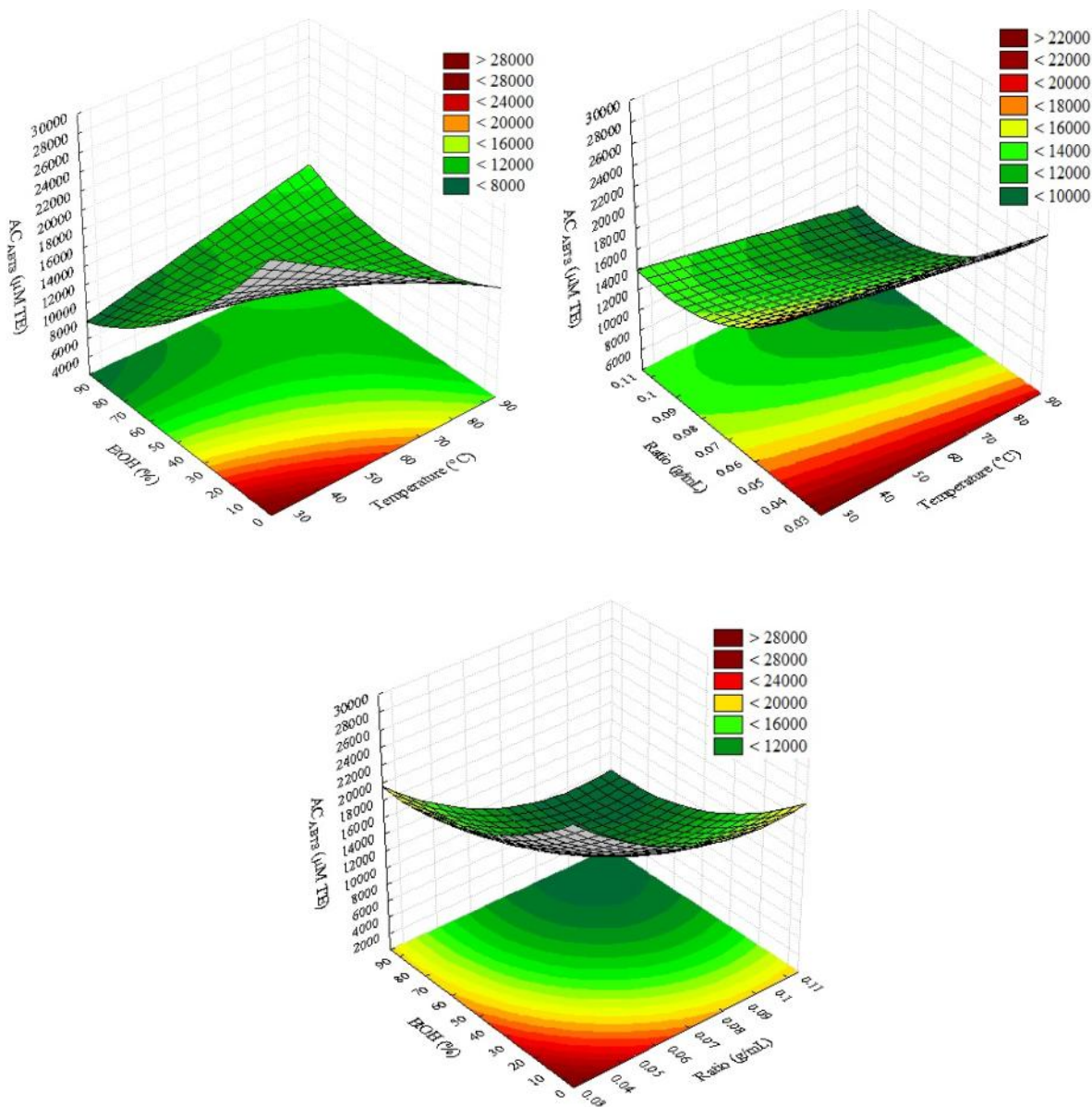


Figure 4.6 - Response surfaces and contour plots showing the effect of ethanol concentration, solid to liquid ratio and temperature on the antioxidant capacity of the extracts. The value of the missing independent variable in each plot was kept at the centre point.

### Temperature

Temperature showed no significant influence on the extraction of TP and SES and, for this reason, there are no surface response plots including this variable in Figure 4.4. Also, according to Cacace and Mazza (Cacace and Mazza, 2003a), temperatures between 6 and 74 °C did not influence TP extraction from berries. Temperature showed a significant interaction with ethanol concentration in the extraction of ST (Figure 4.5). It is possible to observe in the



response surface that for lower temperatures a higher amount of ethanol was needed for extraction, while for higher temperatures a good yield was obtained with less ethanol in the extracting solvent. This behavior could be related to both a modification in the diffusion coefficient of the phenolic compounds and to an increase in their solubility in the solvents (Cacace and Mazza, 2002, 2003a). For ABTS, lower temperatures yielded better results, as can be seen in Figure 4.6. Temperature had a linear influence in this response, which could be related to the degradation of compounds that presented some antioxidant capacity.

The results suggest that the changes in solid to liquid ratio and ethanol concentration had a more significant effect than the temperature. Studies were performed by Moazzami *et al.* (2006a) in temperatures between 20 and 55 °C for the extraction of sesaminol di and triglucosides. The authors found no significant differences in the temperature range analyzed. Similar results are observed in literature for flaxseed lignans. Zhang *et al.* (2007) also found that lower temperatures, around 30 °C, are optimum for lignan extraction and Eliasson *et al.* (2003) reported no influence of the temperature in the extraction yield.

#### Solid to liquid ratio

The solid to liquid ratio exerted high influence in all the response variables analyzed. For TP, ST and ABTS, when more solvent is used more compounds are extracted (Figures 4.4-4.6). The same behavior is observed for ABTS; in a more diluted system higher antioxidant capacities are observed (Figure 4.6). Regarding SES, interaction between ratio and ethanol concentration was significant. The interaction, which can be observed in Figure 4.4(b), shows that with a lower ethanol concentration a higher volume of solvent is needed, whereas when a more concentrated ethanol solution is used, experiments can be performed with a smaller solvent volume producing the same extraction yield. This behavior can be related to the polarity of this compound. SES is a more apolar lignan if compared to glucosides, being considered an oil soluble lignan (Kamal-Eldin *et al.*, 1995). It is, therefore, expected for this compound to be more soluble in a less polar solvent than water as ethanol.

A linear increase in the extraction of different compounds extraction was observed for flaxseed lignans by Ho *et al.* (2007) and for date seed phenolics by Al-Farsi and Lee (2008). The work of Moazzami *et al.* (2006b) with sesame cake, showed that a significantly higher amount of lignan glucosides were extracted with a ratio of 0.025 g/mL when compared to 0.08 g/mL; however, the authors found that there was no significant difference between the ratios of 0.025

and 0.045 g/mL. These results differ partially from those observed in the present work, where ratio had only a linear effect in most of the response variables (with the exception of SES). Our analyses show that, the higher the volume of solvent the higher the extraction yield for the evaluated range (0.029–0.11 g/mL). These results are consistent with mass transfer principles. The driving force during mass transfer is considered to be the concentration gradient between the solid and the liquid which is greater when a smaller solid to solvent ratio is used, resulting in an increase of the diffusion rate. Modifications in the solid to solvent ratio modify the solubility and equilibrium constants of the process Cacace and Mazza (2003a).

#### Ethanol concentration

Ethanol concentration was a significant parameter for all response variables. When extracting TP, the maximum yield was reached with 19% ethanol, when the highest solvent volume was used. For ST extraction, a quadratic effect was observed. This response showed an increasing region until the maximum is reached at 68%, in the most diluted condition, followed by decrease in the ST yield. For SES extraction a higher ethanol concentration was necessary to reach the maximum yield, 76%. Finally, to obtain the extract with the highest antioxidant capacity, it is better to use only water as a solvent. These behaviors can be observed in Figures 4.4-4.6.

In almost all cases, with the exception of ABTS, ethanol concentration followed a parabola shape. This behavior was also observed for flaxseed lignans by Zhang *et al.* (2007), these authors pointed out that the extraction of lignans increased with increasing water content according to the “like dissolves like” principle. However, after a certain water proportion, the extraction yield began to decrease. This can be explained by the fact that lignans are organic matter and ethanol is an organic solvent, while water is inorganic. So, by the same principle above mentioned, an organic matter dissolves better in organic solvents. For this reason, the acquired amount of lignans was reduced after a certain water concentration was reached. The lower ethanol concentration obtained as the optimum for extraction of total phenolics can be related to the higher amounts of proteins that could have been extracted in these conditions and interfered in the reaction with the Folin–Ciocalteu reagent. The fact that ABTS was higher when only water was used as a solvent could also be related to the higher amounts of protein extracted that possess antioxidant activity. Still, further studies accessing the antioxidant activity of the extracts are necessary in order to fully comprehend de biological activity of the extracted compounds.

### *Correlation analysis*

The SES and ST content had no significant correlation with any other response variable ( $R^2 < 0.6$ ). The correlation between TP and ABTS were higher than the others, but moderate, with  $aR^2$  value of 0.650. There was no correlation for ST and ABTS; however, studies show that lignan glucosides have high antioxidant capacity (Suja *et al.*, 2004b; Suja *et al.*, 2005). These results indicate that, to deeper investigate the antioxidant capacity of the obtained extracts, would be preferable to use different (more than one) methods to determine this response.

### *Determination and experimental validation of the optimal conditions*

In order to verify the predictive capacity of the model, the experiments were performed in the optimal conditions obtained for sesaminol triglucoside: temperature of 25 °C, ratio of 0.03 g/mL and solvent solution containing 68% of ethanol. Experiments in the optimal conditions were performed in duplicate and revealed a content of  $514 \pm 6$  mg SE/100 g and the model provided a value of 566 mg SE/100 g. The difference between the values obtained by the model and experimentally is lower than 7%. These results confirm the predictability of the model for the extraction of sesaminol triglucoside from sesame cake.

### **4.2.4 Conclusions**

This study aimed to optimize the extraction conditions to obtaining bioactive compounds from sesame cake. Among the analyzed components of sesame cake, sesaminol triglucoside was present in more significant amounts. The experimental design approach was successfully applied in the optimization of the conditions for the extraction of total phenolics, sesamin and sesaminol triglucoside from sesame cake. The second order polynomial model gave a satisfactory description of most of the experimental data. Solid to liquid ratio and ethanol concentration where the most important factors affecting extraction, whereas temperature showed reduced influence. Further work is required to investigate the contribution of individual compounds to the antioxidant capacity of the extracts of sesame cake. As a conclusion, the sesame cake can be considered a suitable source for lignan glucosides and, in future researches, the obtained model validated in this work, could be used. This study may be applied in the development of industrial

processes, enhancing the efficacy of large scale systems and in future work regarding kinetics of extractions and optimal number of sequential steps.

### 4.3 Referências

- AL-FARSI, M. A. e LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, v.108, n.3, p.977-985. 2008.
- AOAC, A. O. O. A. C. *Official method of analysis of aoac*. Allentown, Washington D. C. 1990
- BELTRÃO, N. E. M., J.G., S. e PEREIRA, J. R. *O agronegócio do gergelim no brasil*. Brasília: Embrapa. 2001. 348p. p.
- BIGONIYA, P., NISHAD, R. e SINGH, C. S. Preventive effect of sesame seed cake on hyperglycemia and obesity against high fructose-diet induced type 2 diabetes in rats. *Food Chemistry*, v.133, n.4, p.1355-1361. 2012.
- CACACE, J. E. e MAZZA, G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.21, 2002/10/01, p.5939-5946. 2002.
- CACACE, J. E. e MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, v.59, n.4, p.379-389. 2003.
- CHANG, L.-W., YEN, W.-J., HUANG, S. C. e DUH, P.-D. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chemistry*, v.78, n.3, p.347-354. 2002.
- ELIASSON, C., KAMAL-ELDIN, A., ANDERSSON, R. e ÅMAN, P. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *Journal of Chromatography A*, v.1012, n.2, p.151-159. 2003.
- ESCARPA, A. e GONZÁLEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, v.427, n.1, p.119-127. 2001.
- FAO. Faostat. <http://www.fao.org>: Food and Agricultural Organization of the United States 2010.
- FUKUDA, Y., OSAWA, T., NAMIKI, M. e OZAKI, T. Studies on antioxidative substances in sesame seed. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.49, n.2, p.301-306. 1985.
- GOLI, A. H., BARZEGAR, M. e SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, v.92, n.3, p.521-525. 2005.
- GONZÁLEZ-MONTELONGO, R., LOBO, M. G. e GONZÁLEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology*, v.71, n.3, p.347-355. 2010.
- HASLAM, E. e HAWORTH, R. D. The constituents of natural phenolic resins. Part xxiii. The constitution of sesamol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.32, p.827-833. 1955.
- HO, C. H. L., CACACE, J. E. e MAZZA, G. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT - Food Science and Technology*, v.40, n.9, p.1637-1647. 2007.

- HSU, D.-Z., CHU, P.-Y. e LIU, M.-Y. Extracts of sesame (*sesamum indicum* L.) seeds and gastric mucosal cytoprotection. In: (Ed.). *Nuts and seeds in health and disease prevention*. San Diego: Academic Press, 2011. Extracts of sesame (*sesamum indicum* L.) seeds and gastric mucosal cytoprotection, p.1019-1027
- KAMAL-ELDIN, A. e APPELQVIST, L. Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from four *sesamum* species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, n.2, p.149-156. 1994.
- KAMAL-ELDIN, A., PETTERSSON, D. e APPELQVIST, L.-Å. Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum. *Lipids*, v.30, n.6, 1995/06/01, p.499-505. 1995.
- KANG, M.-H., KAWAI, Y., NAITO, M. e OSAWA, T. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *The Journal of Nutrition*, v.129, n.10, October 1, 1999, p.1885-1890. 1999.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E. e ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, v.113, n.9, Supplement 2, p.71-88. 2002.
- LAZAROU, D., GROUGNET, R. e PAPADOPOULOS, A. Antimutagenic properties of a polyphenol-enriched extract derived from sesame-seed perisperm. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.634, n.1-2, p.163-171. 2007.
- LIYANA-PATHIRANA, C. e SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, v.93, n.1, p.47-56. 2005.
- MARKOM, M., HASAN, M., DAUD, W. R. W., SINGH, H. e JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *phyllanthus niruri* linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, v.52, n.3, p.487-496. 2007.
- MOAZZAMI, A. e KAMAL-ELDIN, A. Sesame seed is a rich source of dietary lignans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.83, n.8, 2006/08/01, p.719-723. 2006.
- MOAZZAMI, A. A., ANDERSSON, R. E. e KAMAL-ELDIN, A. Characterization and analysis of sesamol diglucoside in sesame seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.70, n.6, p.1478-1481. 2006a.
- MOAZZAMI, A. A., ANDERSSON, R. E. e KAMAL-ELDIN, A. Hplc analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.3, 2012/11/12, p.633-638. 2006b.
- MOHDALY, A. A. A., SARHAN, M. A., SMETANSKA, I. e MAHMOUD, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.90, n.2, p.218-226. 2010.
- MOHDALY, A. A. A., SMETANSKA, I., RAMADAN, M. F., SARHAN, M. A. e MAHMOUD, A. Antioxidant potential of sesame (*sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, v.34, n.1, p.952-959. 2011.
- NAMIKI, M. The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Reviews International*, v.11, n.2, 1995/05/01, p.281-329. 1995.
- NEMES, S. e ORSAT, V. Evaluation of a microwave-assisted extraction method for lignan quantification in flaxseed cultivars and selected oil seeds. *Food Analytical Methods*, v.5, n.3, 2012/06/01, p.551-563. 2012.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ- RUBIO, M. E., SERRANO, J., GOÑI, I. e 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.

- RAMACHANDRAN, S., SINGH, S. K., LARROCHE, C., SOCCOL, C. R. e PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications - a review. *Bioresource Technology*, v.98, n.10, p.2000-2009. 2007.
- RANGKADILOK, N., PHOLPHANA, N., MAHIDOL, C., WONGYAI, W., SAENGSOOKSREE, K., NOOKABKAEW, S. e SATAYAVIVAD, J. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*sesamum indicum* L.) seeds and oil products in thailand. *Food Chemistry*, v.122, n.3, p.724-730. 2010.
- RESHMA, M. V., BALACHANDRAN, C., ARUMUGHAN, C., SUNDERASAN, A., SUKUMARAN, D., THOMAS, S. e SARITHA, S. S. Extraction, separation and characterisation of sesame oil lignan for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, v.120, n.4, p.1041-1046. 2010.
- RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Campinas: Casa do Pão Editora. 2005. 324 p.
- RUFINO, M. D. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S. D., MORAIS, S. M. D., SAMPAIO, C. D. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J. e SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre abts. *Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical. Online)*. 2007.
- RYU, S. N., HO, C.-T. e OSAWA, T. High performance liquid chromatographic determination of antioxidant lignan glycosides in some varieties of sesame. *Journal of Food Lipids*, v.5, n.1, p.17-28. 1998.
- SHAHIDI, F. e NACZK, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004
- SHYU, Y.-S. e HWANG, L. S. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted burma black sesame meal. *Food Research International*, v.35, n.4, p.357-365. 2002.
- SILVA, E. M., ROGEZ, H. e LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, v.55, n.3, p.381-387. 2007.
- SMEDS, A. I., EKLUND, P. C. e WILLFÖR, S. M. Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chemistry*, v.134, n.4, p.1991-1998. 2012.
- SUJA, K. P., ABRAHAM, J. T., THAMIZH, S. N., JAYALEKSHMY, A. e ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, v.84, n.3, p.393-400. 2004a.
- SUJA, K. P., JAYALEKSHMY, A. e ARUMUGHAN, C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*sesamum indicum* L.) in dpph• system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.4, 2004/02/01, p.912-915. 2004b.
- SUJA, K. P., JAYALEKSHMY, A. e ARUMUGHAN, C. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, v.91, n.2, p.213-219. 2005.
- VISAVADIYA, N. P. e NARASIMHACHARYA, A. V. R. L. Sesame as a hypocholesteremic and antioxidant dietary component. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.6, p.1889-1895. 2008.
- WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: R. E. Wrolstad (Ed.). *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc., v.Supplement 6, 2002. Determination of total phenolics, p.II.1.1-8
- ZHANG, Z.-S., LI, D., WANG, L.-J., OZKAN, N., CHEN, X. D., MAO, Z.-H. e YANG, H.-Z. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, v.57, n.1, p.17-24. 2007.

## **CAPÍTULO 5 - APLICAÇÃO DE TECNOLOGIAS ELÉTRICAS NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROTEÍNAS DA TORTA DE GERGELIM**

Neste capítulo é apresentado um estudo envolvendo a aplicação de duas tecnologias alternativas na extração de compostos fenólicos e proteínas da torta de gergelim: campo elétrico pulsado e descargas elétricas de alta tensão. Essa etapa do trabalho foi realizada durante um estágio sanduíche no departamento de Transformações Integradas da Matéria Renovável (*Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable*) na Universidade de Tecnologia de Compiègne (*Université de Technologie de Compiègne*) na França. O trabalho foi coorientado pela Professora Assistente Nadia Boussetta e supervisionado pelo Professor Eugène Vorobiev, nome de referência no estudo das tecnologias de campo elétrico pulsado e descargas elétricas de alta tensão.

Primeiramente, são apresentados os equipamentos e as metodologias utilizadas nos processos de extração e nas análises dos compostos extraídos. A seguir, são demonstrados e discutidos os resultados obtidos; esses resultados estão apresentados na forma de artigo, na língua inglesa, como nos capítulos anteriores. O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes tecnologias na extração de proteínas e compostos fenólicos da torta de gergelim, quando comparadas à extração convencional visando a redução do uso de solventes, além da temperatura e do tempo de extração.

## 5.1 Materiais e Métodos

### 5.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada nesta etapa do trabalho não foi a mesma usada nos capítulos anteriores. Nos Capítulos 2 e 3 os experimentos foram realizados usando a torta de gergelim, após o seu desengorduramento com hexano, que pode ser chamada de farinha desengordurada de gergelim. Entretanto, nessa etapa do trabalho optou-se por trabalhar com a torta diretamente como foi recebida da indústria, sem passar pelo processo de desengorduramento. A matéria-prima utilizada nessa etapa também foi fornecida pela empresa *Vital Âtman*. Uma fotografia dessa torta é apresentada na Figura 5.1, e é o produto obtido diretamente após uso de uma prensa rosca, que consiste em cilindros com diâmetro em torno de 1 cm. Foi escolhido utilizar a torta dessa forma uma vez que, em experimentos iniciais (dados não apresentados no presente trabalho), foi observado que a etapa de desengorduramento causa um dano celular muito grande à torta – decorrente, possivelmente, do uso de hexano e de altas temperaturas, (até 130 °C). O dano causado às células por esse processo é bastante extenso, tornando impossível observar diferenças entre as tortas que sofreram tratamento elétrico e as tortas *in natura*. Assim, os efeitos de eletroporação, ou outros efeitos causados pelos tratamentos elétricos, não seriam os efeitos predominantes de danos às células.



Figura 5.1 – Torta de gergelim.

Para uniformizar a matéria-prima recebida, os cilindros de torta de gergelim foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm de comprimento.



### 5.1.2 Equipamento para aplicação dos tratamentos elétricos

O equipamento utilizado para aplicação dos tratamentos elétricos é apresentado na Figura 5.2. Ele consiste em uma fonte de energia de alta tensão (Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Rússia) e uma câmara de 1 L para tratamento em batelada.



Figura 5.2 – Fotografia do equipamento usado na aplicação dos tratamentos elétricos.

Para aplicação do campo elétrico pulsado (CEP), a câmara usada foi equipada com eletrodos de aço inoxidável. Os eletrodos consistem em duas placas em formato de discos, paralelos, cada uma com uma área  $95 \text{ cm}^2$  (diâmetro de 11 cm), sendo um eletrodo fixo (aterrado) no fundo da célula e outro móvel na parte superior (Figura 5.3(a)). A configuração do circuito faz com que ele gere pulsos do tipo decaimento exponencial (Figura 5.3(c)). A duração dos pulsos foi de  $t_i = 10 \text{ } \mu\text{s}$ , a frequência de 0,5 Hz ( $t_p = 2 \text{ s}$ ) e a distância entre os eletrodos ( $d$ ) foi fixada em 3 cm. Essa distância foi determinada com o objetivo de aplicar o maior campo elétrico possível e de forma que não houvesse ar entre os eletrodos, com o intuito de evitar o acontecimento de descargas elétricas. Como cada pulso aplica 40 kV, o campo elétrico aplicado nesse caso foi de 13,3 kV/cm. Além da distância entre os eletrodos, o equipamento usado permite que se varie o número de pulsos aplicados e o intervalo desejado entre cada trem de pulsos.

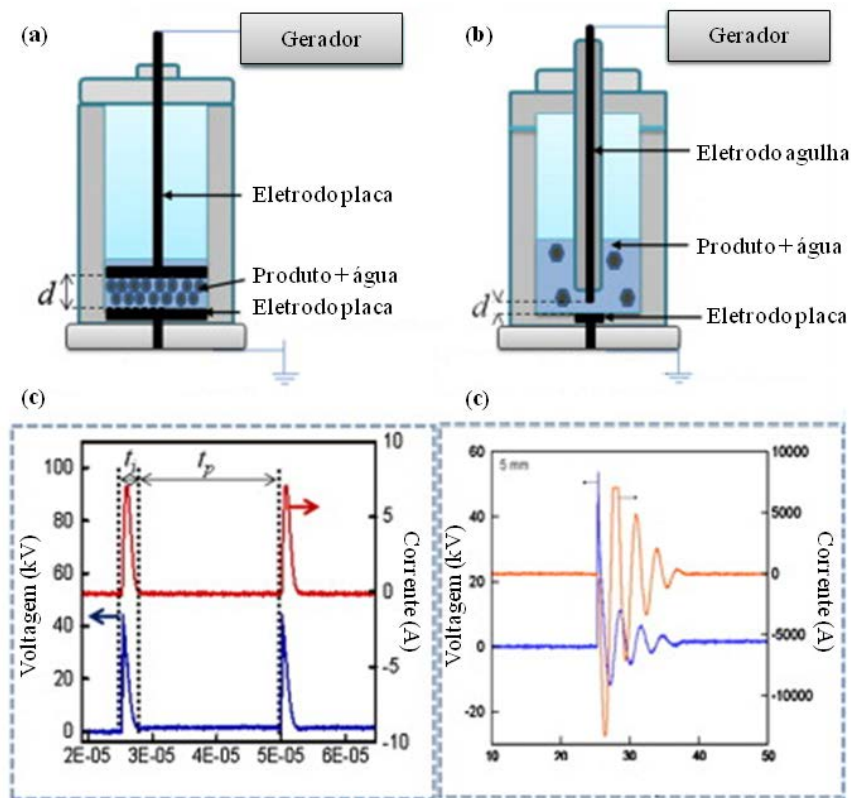


Figura 5.3 – Diagrama do aparato experimental utilizado: câmaras de aplicação de CEP (a) e DEAT (b) e protocolos de pulsos de CEP (c) e DEAT (d). Fonte: adaptado de Boussetta *et al.* (2012b).

O aparato para aplicação das descargas elétricas (DEAT) foi o mesmo usado para o tratamento por CEP, mudando apenas os eletrodos da câmara de tratamento. Nesse processo foi também usado um eletrodo em formato de disco, aterrado, fixo no fundo da célula, de 3,5 cm de diâmetro e o outro eletrodo foi uma agulha de aço inoxidável de 1 cm de diâmetro (Figura 5.3 (b)). Um pulso com tensão positiva foi aplicado ao eletrodo do tipo agulha, sendo que cada descarga inferiu uma tensão de 40 kV e o formato de onda gerado pelo equipamento é de um oscilação amortecida (Figura 5.3(d)). A distância entre eletrodos não pode ser variada, sendo mantida em 5 mm. O tempo de cada descarga elétrica também foi de 10  $\mu$ s e a frequência também foi de 0.5 Hz. Da mesma forma que para o tratamento de CEP, nessa configuração pode-se variar o número de pulsos e o intervalo entre trens de pulsos.

### 5.1.3 Pré-tratamentos e etapa de extração sólido-líquido

A fim de se avaliar qual a energia ideal para aplicação dos pré-tratamento elétricos, foram testadas diferentes energias de processamento. Foram inseridos 35 g de torta na câmara de tratamento adequada (CEP ou DEAT) e adicionados 350 g de água destilada. A seguir a câmara foi fechada e foram aplicados trens de 100 pulsos. As diferentes energias aplicadas são demonstradas na Tabela 5.1. A energia específica aplicada ( $W$ ) foi calculada usando a equação 5.1.

$$W(kJ/kg) = \frac{E_{pulso} \times \text{número de pulsos}}{\text{massa}} \quad (5.1)$$

Nessa equação  $E_{pulso}$  é a energia fornecida por um pulso, que no caso do equipamento utilizado é de 160 J, o número de pulsos é a soma total de pulsos de todos os trens e a massa é a massa total inserida na célula (produto e água). Na Tabela 5.1 são apresentados também o tempo real de tratamento elétrico, 10  $\mu$ s multiplicados pelo número de pulsos, e o tempo total de contato do produto com a água, que considera a duração dos pulsos e o tempo entre eles. Foi realizada uma pausa de aproximadamente 5 min entre os trens de pulsos para coleta de dados de condutividade elétrica, usando um condutímetro (Inolab, modelo Level 1, Alemanha) e de amostras

Tabela 5.1 – Condições de operação para os diferentes tratamentos realizados na avaliação da melhor energia de trabalho.

<i>Trens de pulsos</i>	<i>Total de pulsos</i>	<i>W (kJ/kg)</i>	<i>Tempo de tratamento (ms)</i>	<i>Tempo total de contato (min)</i>
1	100	42	1	4
2	200	83	2	8
3	300	125	3	12
4	400	166	4	16
5	500	208	5	20
7	700	291	7	28

Durante os tratamentos elétricos, além da difusão favorecida pelos seus efeitos, ocorre também a difusão convencional. Com o intuito de avaliar o quanto de proteínas e compostos fenólicos é difundido e qual a condutividade elétrica quando não está sendo aplicado nenhum

tratamento, foi elaborada uma amostra controle. Essa amostra consiste na torta (35 g) imersa em água (350 g), sem agitação, pelo mesmo tempo dos tratamentos elétricos. A condutividade elétrica foi medida e amostras foram coletadas nos tempos de contato apresentados na Tabela 5.1. Além disto, foi elaborada também uma amostra da torta totalmente desintegrada; para tanto, 35 g de torta moída usando um moedor de café (*SEB*, França) foram coladas em contato com 350 g de água e agitadas fortemente por 2 h. Essas condições demonstram o máximo de condutividade elétrica que amostra pode atingir e o máximo de fenólicos e proteínas que podem ser extraídos convencionalmente nessas condições de razão sólido-solvente, usando água como meio extrator e sem ajuste da temperatura.

O grau de desintegração ( $Z_C$ ) foi calculado usando a equação 2.2, onde  $\sigma$  foi a condutividade medida após cada trem de pulsos,  $\sigma_i$  foi a condutividade da amostra controle após cada período de tempo da Tabela 5.1 e  $\sigma_d$  foi considerada a condutividade da torta totalmente desintegrada (moída).

#### *Experimentos de difusão*

Após a determinação da energia ideal para aplicação dos tratamentos elétricos, prosseguiu-se com os experimentos de difusão e, nesse caso, a melhor energia foi usada como um pré-tratamento fixo. Para comparação das metodologias, foram realizados três tipos de extração: assistida por CEP, assistida por DEAT e convencional (ou controle). Nessas extrações foi usada a torta cortada em pedaços de 1 cm de comprimento. Essas extrações foram avaliadas usando diferentes solventes e em diferentes temperaturas. Ainda, foi realizada, para comparação, uma extração em água assistida por moagem. A amostra moída foi obtida através da utilização de um moedor de café em escala de bancada (*SEB*, França) e passou por uma peneira para selecionar partículas menores que 1,25 mm.

O primeiro estudo realizado foi a avaliação de diferentes solventes: água e misturas de água e etanol contendo 10, 30 e 50 % etanol. Por razões de segurança, os pré-tratamentos elétricos não podem ser realizados com o etanol e, assim, primeiramente, 35 g de torta foram inseridas na câmara e adicionadas de 300 g de água para aplicação do pré-tratamento, CEP ou DEAT. Após a aplicação, amostras foram passadas para um Erlenmeyer de 1 L e adicionadas de 400 g de uma mistura de água e etanol a fim de que o volume total final tivesse a concentração de etanol desejada. Para a extração convencional e a assistida por moagem as

amostras foram colocadas diretamente no Erlenmeyer e adicionadas de 700 g de solvente. A etapa difusiva foi realizada usando uma incubadora agitada (*Infors Sarl, Aerotron, França*) com controle de temperatura. A agitação foi mantida em 150 rpm, a temperatura foi mantida em 20 °C e, para avaliação da cinética de difusão, foram coletadas amostras em intervalos de tempo pré-determinados. Nesse estudo o teor de fenólicos totais foi avaliado para todos os solventes usados e o teor de proteínas foi avaliado quando foi utilizada a água como solvente. A amostra moída foi avaliada após a extração em água por 60 min.

O segundo estudo realizado foi a análise de diferentes temperaturas de extração. Nesse caso apenas água destilada foi usada como solvente e foram avaliadas as temperaturas de 40 e 60 °C. A temperatura de 20 °C, avaliada nos experimentos anteriores, também foi usada na comparação. Os pré-tratamentos foram realizados da mesma forma que nos experimentos com diferentes solventes; entretanto, a água (300 g) foi aquecida a 40 ou 60 °C antes de ser inserida na câmara de tratamento. Para tal, a água foi deixada por 20 min na mesma incubadora usada na etapa difusiva, fazendo com que todo o processo fosse realizado na mesma temperatura. O restante da água (400 g) foi mantido na incubadora até que atingisse a temperatura de tratamento previamente ao início do processo. O solvente para a extração convencional também foi mantido na incubadora até atingir a temperatura adequada e, só então, foram inseridas as amostras para iniciar o processo difusivo. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo previamente determinados.

#### **5.1.4 Análise dos extratos**

Todas as amostras coletadas foram centrifugadas (*Eppendorf, MiniSpin plus, Alemanha*) previamente às análises. As amostras provenientes do pré-tratamento com DEAT foram filtradas em membranas com tamanho de poro nominal de 0,45 µm. A filtração foi necessária devido à observação de turbidez nos extratos, possivelmente pela presença de gordura que foi extraída durante o tratamento. Para a análise utilizando cromatografia, os extratos foram previamente filtrados usando membranas com poro nominal de 0,22 µm.

Foram realizadas nas amostras análises de fenólicos totais e proteínas. Para análise fenólicos foi utilizada a metodologia de Folin-Ciocalteu; entretanto, o protocolo de análise seguido foi o de Singleton *et al.* (1999), que difere do usado nas análises dos capítulos 3 e 4.

Para essa análise, 200  $\mu\text{L}$  de extrato diluído e 1000  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu (*Sigma-Aldrich*, França), diluído 10 vezes em água destilada, foram misturados e deixados reagir por 5 min. Após a reação, 800  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em 100 g de água destilada) foram adicionados à mistura. Para a reação, a solução foi mantida 10 min em um banho (GmbH, Alemanha) a 60 °C e, posteriormente, 10 min em um congelador comercial convencional. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis (Milton Roy Company, Spectronic 20 Genesys, Estados Unidos) em 750 nm. Curvas de calibração foram elaboradas com ácido gálico (*Sigma-Aldrich*, França) para cada solvente usado - água destilada e soluções contendo 10, 30 e 50 % etanol. As curvas de calibração utilizando o padrão foram elaboradas na faixa entre 10 e 100 ppm e sempre resultaram em coeficientes de determinação de 0,99 ou maiores. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico e as análises foram realizadas em duplicata para cálculo do desvio padrão.

Os extratos provenientes dos experimentos de cinética de difusão usando diferentes solventes foram analisados em relação ao teor de lignanas e seus glucosídeos. As análises foram realizadas utilizando HPLC, seguindo as condições cromatográficas apresentadas no item 3.1.5 e a metodologia de quantificação descrita no item 4.1.3. O sistema utilizado pertence a marca Agilent (modelo 1260 Infinity, Estado Unidos) e está equipado com uma bomba quaternária, um detector DAD (*Diode-array detector*) UV-Visível e um forno para controle de temperatura da coluna. A separação foi realizada em uma coluna C18 de fase reversa (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, Estados Unidos).

A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (1976). Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de extrato diluído foi adicionado de 1800  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford (*Sigma-Aldrich*, França) diluído 3 vezes. A mistura foi deixada reagir no escuro, à temperatura ambiente por 5 min. A absorbância foi medida em 595 nm usando um espectrofotômetro (Milton Roy Company, Spectronic 20 Genesys, Estados Unidos). Para as curvas de calibração de cada solvente foi usado como padrão a albumina do soro bovino ou BSA, do inglês Bovine Serum Albumin (*Sigma-Aldrich*, França). As concentrações utilizadas foram de 12,5 a 75 ppm. Os resultados foram expressos como equivalentes de BSA e as análises foram realizadas em duplicata para cálculo do desvio padrão.

### 5.1.5 Cálculo da difusividade mássica efetiva

A difusividade mássica efetiva ( $D$ ) dos compostos fenólicos, da principal lignana e das proteínas em diferentes condições de processo (temperaturas e solventes) e para as diferentes tecnologias (controle, CEP e DEAT) foi determinada via estimação de parâmetros. Para este cálculo foi utilizada a segunda lei de Fick da difusão. Considerou-se que a torta de gergelim, apesar de ser inicialmente um cilindro, se partiu ao longo do processo, passando a ter uma geometria de esfera. Além disso, considerou-se que a difusão ocorre apenas na direção radial e que a difusividade mássica é constante, fornecendo a seguinte equação diferencial governante:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c_1}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_1}{\partial r} \right) \quad (5.2)$$

Em um processo transiente, no qual a solução é bastante agitada e o volume é limitado, a concentração do soluto na solução varia à medida que o soluto deixa o sólido. Se a solução for agitada suficientemente, é possível considerar que a concentração na solução depende apenas do tempo e é determinada pela condição de que tudo o que deixa o sólido migra para a solução. A análise apresentada a seguir está discutida por Crank (1975).

Para resolução da equação (5.2), considera-se uma esfera de raio  $r = a$ , colocada em uma solução de volume  $V$  na qual o soluto se difunde da esfera para a solução. Para a solução, foi utilizada a seguinte condição inicial:

$$C_1 = C_0, \quad -a < r < a, \quad t = 0 \quad (5.3)$$

onde  $C_1$  é a concentração de soluto na esfera,  $C_0$  é a concentração inicial de soluto na esfera e  $t$  é o tempo. O valor de  $C_0$  não é conhecido mas, entretanto, sabe-se que, inicialmente, todo o soluto está na esfera. Dessa forma é possível escrever que:

$$C_1 = C_0 - C \quad (5.4)$$

onde  $C$  é a concentração de soluto na solução (valores conhecidos a cada tempo). A condição de contorno no raio da esfera é a igualdade entre a taxa de soluto que sai da esfera e a taxa de soluto que entra na solução, expressa pela equação 5.5, onde  $b$  é o raio do volume ocupado pela solução.

$$b \frac{\partial c_1}{\partial t} = \mp D \frac{\partial c_1}{\partial r}, \quad r = \mp a, \quad t > 0 \quad (5.5)$$

Sendo a concentração no soluto junto à superfície da esfera a mesma da solução, a resolução desta equação diferencial com suas condições de contorno e sua condição inicial é obtida através da transformada de Laplace (Crank, 1975):

$$\frac{M}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)}{9+9\alpha+\alpha^2q_n^2} \exp(-Fo q_n^2) \quad (5.6)$$

onde  $M$  é a quantidade total de soluto que deixou a esfera no tempo  $t$  (obtido experimentalmente),  $M_\infty$  representa essa mesma quantidade no equilíbrio e os valores de  $q_n$  são as raízes positivas diferentes de zero da seguinte equação transcendental:

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3+\alpha q_n^2} \quad (5.7)$$

O parâmetro  $\alpha$  representa a razão entre os volumes da solução e das esferas de torta. Para a determinação dessa razão foram usados os valores conhecidos da massa de água e de torta adicionadas à mistura e da massa específica da água à 20 °C (998 kg/m<sup>3</sup>), sendo necessário determinar apenas a massa específica da torta. Para obtenção da massa específica aparente da torta colocou-se a amostra em uma proveta tarada, até atingir o volume de 50 mL, pesando-se em seguida. O valor obtido para a massa específica foi de 564 kg/m<sup>3</sup> e a razão de volumes ( $\alpha$ ) foi igual a 11.

O valor de  $M_\infty$  foi estimado através do modelo empírico de Peleg (1988):

$$M = M_0 + \frac{t}{(k_1+k_2t)} \quad (5.8)$$

onde  $k_1$  e  $k_2$  são parâmetros do modelo e  $M_0$  é a concentração e inicial que, nesse experimento, é igual a zero. O parâmetro  $k_1$  está relacionado à taxa inicial de transferência de massa e o parâmetro  $k_2$  à concentração no equilíbrio através da relação:

$$M_\infty = M_0 + \frac{1}{k_2} \quad (5.9)$$

$Fo$  que aparece na equação 5.6 representa o número de Fourier para a difusão de massa, definido por:

$$Fo = \frac{D}{a^2} t \quad (5.10)$$



onde  $D$  é a difusividade mássica efetiva ( $m^2/s$ ) e  $a$  é o raio da amostra (m). Plotando-se o número de Fourier *versus* o tempo obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é a razão entre a difusividade mássica e o quadrado do raio da esfera. Uma vez que o raio das esferas não é conhecido, os valores de difusividade foram expressos em função deste parâmetro -  $D/r^2$  ( $s^{-1}$ ). Vale lembrar que as difusividades mássicas efetivas determinadas através desta metodologia são comparativas para as diferentes condições de processo (temperaturas e solventes) e para as diferentes tecnologias aplicadas (controle, CEP e DEAT) e, portanto, fornecer os seus valores em função do raio da partícula não causa prejuízo à análise.

### **5.1.3 Análise estatística**

As análises e os experimentos foram realizados, pelo menos, em duplicata. Para comparação dos resultados foi usada uma análise de variância (ANOVA) com um intervalo de confiança de 99 % e o teste de Fisher LSD (*least significant difference*). Através desses testes foi possível comparar diferentes tratamentos e determinar a significância estatística dos resultados. O programa Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA) foi usado nas análises estatísticas.

## 5.2 Artigo 3

### **EFFECT OF PULSED ELECTRIC FIELDS AND HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGES ON THE EXTRACTION OF POLYPHENOLS AND PROTEINS FROM SESAME CAKE**

Artigo a ser submetido para a revista *Food Chemistry*.

Authors: Júlia Ribeiro Sarkis<sup>1</sup>, Nadia Boussetta<sup>2</sup>, Christelle Blouet<sup>2</sup>, Isabel Cristina Tessaro<sup>1</sup>, Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>1</sup> and Eugène Vorobiev<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Chemical Engineering Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup>Unité Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, Université de Technologie de Compiègne (UTC).

#### **Abstract**

The present study evaluates the effect of pulsed electric fields (PEF) and high voltage electrical discharges (HVED) on extraction of sesame cake compounds. Investigations were initially performed applying different energy inputs and, afterwards, using PEF and HVED as pre-treatments to diffusion. Diffusion kinetics were evaluated in diverse ethanol concentrations (0, 10, 30, 50 %) and temperatures (20, 40, 60 °C). The extracts were analyzed for polyphenols, lignans and proteins. According to the results, the disintegration index and the polyphenol and protein contents increased with the energy inputs and, 83 kJ/kg was considered as the best energy. During diffusion, both pre-treatments improved extraction yields of polyphenols and lignans through different solvents. For diffusion in different temperatures, PEF and HVED had a significant positive effect on the extraction of proteins and polyphenols when compared to the control sample.

### 5.2.1 Introduction

Sesame (*Sesamum indicum L.*) is an oilseed, composed of, approximately, 50 % lipid and 20 % protein. This seed is considered as a valuable source of nutrients and is an important crop around the world due to its high oil content, being the ninth most cultivated oilseed (Namiki, 1995; Beltrão *et al.*, 2001). Sesame seed cake is a solid product obtained after the oil removal from sesame seed, usually by cold pressing. The cake obtained from sesame is composed approximately of 35.6 % protein, 7.6 % crude fiber and 11.8 % ash and has a 83.2 % dry matter content (Ramachandran *et al.*, 2007). The production of sesame cake is estimated to be very high, considering that 70% of these seeds are cultivated for oil production (Namiki, 1995). In the oil industry, sesame seed cake and other cakes are considered to be by-products, being commonly used as cattle feed in several producing countries. However, with new technologies this residues can be recovered and value added to be a source of nutraceuticals, proteins and fibers (Galanakis, 2012, 2013).

Sesame seed is rich in lignans, which are antioxidants and one of the most important functional compounds of this seed (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994). Sesame cake has been discovered to be rich in lignan glucosides, which are hydrophilic antioxidants and thus, are not extracted with the oil. Among the glucosides, generally, sesaminol triglucoside is the major component, followed by sesaminol diglucoside (Moazzami *et al.*, 2006a, 2006b). Studies regarding the physiological activities of sesame cake have showed that this product can reduce susceptibility to oxidative stress (Kang *et al.*, 1999), act on the prevention of obesity and hyperglycemia (Bigoniya *et al.*, 2012) and reduce cholesterol levels (Visavadiya and Narasimhacharya, 2008) among other effects. Other important aspect of this cake is the high protein content of very important nutritional value. These proteins can be kept in the cake to be used as a protein concentrate or they can be extracted and purified, for the obtention of a protein isolate (Rivas *et al.*, 1981; Taha *et al.*, 1987). The aminoacid profile of sesame proteins shows that it is rich in methionine, tryptophan and cysteine, which are frequently limiting aminoacids in vegetables. Due to this profile, sesame protein has been studied in combination with other vegetable proteins such as soy, corn, beans and peanuts, to increase their nutritional value (Beltrão *et al.*, 2001; Hwang, 2005; Ramachandran *et al.*, 2007).

Conventional extraction methods of compounds from vegetable matrixes involve mechanical disintegration and/or the use of strong organic solvents. The efficiency of these methods depends on the degree of permeabilization of the cell membrane. Recently, several techniques have been studied with the goal of reducing cost, energy consumption and solvent use. Among them are the use of ultrasound (Dolatowski and Stasiak, 2011; Yolmeh *et al.*, 2014), microwaves (Castro and Priego-Capote, 2011; Nemes and Orsat, 2012), high pressure (Zhu *et al.*, 2012), pulsed electric fields (PEF) (Vorobiev and Lebovka, 2006; Loginova *et al.*, 2011a; Boussetta *et al.*, 2012b) and high voltage electrical discharges (HVED) (Boussetta *et al.*, 2013b; Boussetta and Vorobiev, 2014). There is an increasing interest from the industry in the application of PEF and HVED. Extraction assisted by PEF can enable a cold diffusion, based on the transformation or rupture of cell membranes when submitted to an external electric field, increasing the electrical conductivity and the permeability of intracellular material (Zimmermann *et al.*, 1974; Vorobiev and Lebovka, 2011). HVED causes a more extensive damage to the product, affecting cell walls as well as membranes. This technology is based on the phenomenon of electrical breakdown in water, which induces physical (e.g. shock waves) and chemical (e.g. formation of O<sub>3</sub>) processes. These phenomena affect the cell, enhancing the release of intracellular components (Gros *et al.*, 2003; Boussetta and Vorobiev, 2014).

Most of the studies concerning PEF and HVED focus on the application of these technologies on fruits and vegetables for the extraction of polyphenols and sugar. Only a small number of works have been performed using oilseeds (Gros *et al.*, 2003; Grémy-Gros *et al.*, 2008; Boussetta *et al.*, 2013b; Boussetta *et al.*, 2014) and, to the best of our knowledge, no work has been performed using these technologies on sesame seed or cake. The goal of this study was to evaluate the effects of different variables in order to enhance extraction of polyphenols, lignans and proteins from sesame cake through the application of PEF and HVED. The effects of the input treatment energy and diffusion parameters (solvent and temperature) were investigated. Moreover, the mass diffusivity of the solutes was determined for comparison between treatments.

### 5.2.2 Materials and Methods

#### Materials

Sesame (*S. indicum L.*) seed cake was kindly provided by the company Vital Âtman (São Paulo, Brazil). The seeds, used for oil production, were cultivated in Brazil and cropped in 2010. The cake was obtained after cold pressing of the seeds using a screw press and it has a cylinder shape with a diameter of approximately 1 cm. Before treatments the cylinders were cut in pieces of 1 cm length. The Folin-Ciocalteu and Bradford reagents and the standards (gallic acid (CAS 149-91-7), bovine serum albumin (BSA, CAS 9048-46-8), sesamin (CAS 607-80-7) and sesamol (CAS 533-31-3)) were purchased from Sigma Aldrich. HPLC grade methanol from Vetec (Brazil) and Mili-Q water (Milipore, France) were used for the chromatographic analysis.

#### PEF and HVED treatments

The apparatus used for the application of the electrical treatments consists of a pulsed high voltage power supply (Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia) and a treatment chamber of 1 L capacity. For PEF application the chamber was equipped with two parallel disc electrodes (11 cm of diameter), placed with a distance of 3 cm, and for HVED the chamber was set with one disc electrode at the bottom (3.5 cm of diameter) and one needle electrode at the top. The needle and the disk electrode were 5 mm distant. Each pulse or discharge performed by the equipment provides 40 kV input energy, therefore the electric field for PEF was 13.3 kV/cm. Pulse or discharge duration was 10  $\mu$ s and frequency was 0.5 Hz (2 s between pulses or discharges), which is imposed by the generator. This set-up is described in more detail by Boussetta *et al.* (2012b).

Different energy inputs were evaluated to choose the most suitable pre-treatment for diffusion. The cake (35 g) and distilled water (350 g) were added to the treatment chamber and up to 700 pulses were applied. The corresponding treatment time varied from 1 to 7 ms. The energy input ( $W$ ) can be calculated using equation (1). In this equation  $E_{pulse}$  is the energy input of one pulse, which, in the equipment used, was of 160 J,  $n$  is the total number of pulses applied and  $mass$  represents the total mass inside the cell, water and product. In this work, the

treatment energy varied from 42 to 291 kJ/kg. Samples (1 mL) were taken between series of 100 pulses or electrical discharges for total polyphenols and proteins analysis and the electrical conductivity was measured using a conductivity meter (Inolab, Level 1 model, Germany).

$$W(kJ/kg) = \frac{E_{pulse} \times n}{mass} \quad (1)$$

To determine the treatment efficiency, the conductivity disintegration index ( $Z_C$ ) was calculated using equation (2). In this equation  $\sigma$  is the electrical conductivity measured after each train of pulses,  $\sigma_i$  is the conductivity of the intact tissue at the same contact time and  $\sigma_d$  is the conductivity of the totally disintegrated tissue. For the conductivity of the intact cake, a control sample was prepared by keeping the sample without agitation for the total contact time and using the same solvent to solid ratio, 10 w/w. Electrical conductivity of the disintegrated cake was obtained by grinding the cake using a laboratory scale coffee grinder (*SEB*, France) and agitating the sample for 2 h in distilled water (10 w/w).

$$Z_C = (\sigma - \sigma_i) / (\sigma_d - \sigma_i) \quad (2)$$

Using equation (2) it was possible to observe how disintegration varies with different energy inputs. Through these results the best pre-treatment energy was chosen for PEF and HVED. Then, the selected energy input was applied before proceeding to the diffusion experiments. For the pre-treatment, the treatment chamber was filled with 35 g of sample and 300 g of distilled water at different temperatures (20, 40 and 60 °C). The grinding treatment was also evaluated for comparison with the electrical treatments, after 60 min of extraction in water at 20 °C (35 w/w).

### *Solid-liquid extraction*

Diffusion kinetics were performed using different solvents and temperatures. After the PEF or HVED treatments, a supplementary amount (400 g) of water, or a combination of water and ethanol, was added to the mixture. The combination was chosen in order to have a final ethanol content of 10, 30 or 50 %. The final liquid-to-solid ratio (w/w) was 20, this ratio was suitable to maintain a homogenous mixture for the extraction. The diffusion experiments were carried out in an Erlenmeyer vessel. The vessel were placed in an incubator shaker

(*Infors Sarl*, Aerotron, France) and agitated for 1 h at 150 rpm. The shaker was set to the extraction temperature (20, 40 or 60 °C) and solvent was kept inside for 20 min before the diffusion experiments to reach the desired temperature. Samples were collected at different moments for total polyphenols, lignans and proteins analysis. For control experiments, the same protocol was used but no pre-treatment was applied.

#### *Analysis of the extracts*

All samples were centrifuged (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Germany) after collected and stored at -18 °C until analysis. Samples collected after HVED treatments were filtered through a 0.45 µm membrane before protein and polyphenols analysis. This step was necessary due to the turbidity observed in this extracts, probably due to the presence of residual oil extracted from the cake during treatment.

#### Polyphenols

Total polyphenols in the extracts were analyzed colorimetrically using the Folin-Ciocalteu assay as described by Singleton *et al.* (1999). Initially, 200 µL of diluted extract and 1000 µL of the Folin-Ciocalteu reagent (diluted 10 folds in distilled water) were mixed and let it react for 5 min. After, 800 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (7.5 g of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 100 g of water) was added. The mixture was kept for 10 min at 60 °C using a water bath (GmbH, Germany) and then cooled for 10 min in a commercial freezer. Measurements were performed using an UV-Vis spectrophotometer (Milton Roy Company, Spectronic 20 Genesys, United States) at 750 nm. Standard calibration curves were made for each extracting solvent using gallic acid as a standard, thus results are expressed as gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of dry matter (DM).

#### Proteins

The concentration of proteins in the extracts was determined using the Bradford (1976) methodology. The diluted extract (0.2 mL) was mixed with 1800 µL of the Bradford reagent, which was previously diluted 3 folds in distilled water. The mixture was left to react in the dark at room temperature for 5 min. The absorbance was measured at 595 nm with a UV-Vis spectrophotometer (Milton Roy Company, Spectronic 20 Genesys, United States).

Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard for the calibration curves and results were expressed as mg BSA/100 g DM.

### Sesame lignans

Lignan glucosides were analyzed using HPLC. Prior to injection extracts were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter. The chromatographic conditions were used according to Rangkadilok *et al.* (2010). For this analysis, an Agilent chromatography system (model 1260 Infinity, USA) equipment with a quaternary pump, a DAD UV-Vis detector and a column oven was used. Separation was conducted on a reversed-phase C18 column (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, USA) using water (mobile phase A) and methanol (mobile phase B). The eluent flow rate was maintained at 1.0 mL/min, the injection volume was 20  $\mu\text{L}$ , and the detection wavelength and column temperature were set to 280 nm and 40  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. The elution program with a linear gradient was as follows: 0 min, 5 % B; 0-5 min, 18 % B; 5-10 min, 35 % B; 10-15 min, 62 % B; 15-18 min, 80 %; 18-22 min, 80 %; 22-23 min, 5 % B; 23-26 min, 5% B. A calibration curve was made using sesamin as a standard. The standard was dissolved in ethanol to prepare 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  stock solutions. Sesamin stock solution was dissolved in appropriate volume of ethanol to obtain concentrations of: 3, 5, 50, 100 and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The response linearity of the analysis was tested over the range of concentrations used; the determination coefficient of the calibration curve was 0.996.

Since there are no commercial standard available, the DAD detector in the system was used for the identification of lignan glucosides present in the cake. With this system it was possible to obtain an UV spectrum of the peaks; the spectrum was compared with the available literature to identify the lignan glucosides in the samples. The peaks tentatively identified as lignan glucosides were quantified as sesamin equivalents (mg SE/100 g DM) using the calibration curve for this standard.

### *Estimation of the effective mass diffusivity*

The extraction of polyphenols, lignans and proteins, can be described by (equation (3)):



$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (3)$$

In this equation,  $C$  is the solute concentration,  $r$  is the radius of the particle (m),  $t$  is the time (s) and  $D$  is the effective mass diffusivity ( $\text{m}^2/\text{s}$ ). The sesame cake particles were considered to be small spheres of unknown ratio.

To solve equation (3) it was supposed that it was supposed that stirring was sufficiently intensive and so the resistance to the external mass transfer was neglected. Also, it was considered that initially the solvent was free from solute. The solution Fick's second law in a well stirred solution of limited volume was given by Crank (1975):

$$\frac{M}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)}{9+9\alpha+\alpha^2 q_n^2} \exp(-Fo q_n^2) \quad (4)$$

where  $M$  is the total amount of solute that left the sphere in a time  $t$ ,  $M_\infty$  is that same amount after the system reached the equilibrium,  $q_n$  are the positive roots different from zero of the equation:

$$\tan q_n = 3q_n / (3 + \alpha q_n^2) \quad (5)$$

and  $\alpha$  is the ratio between the volumes of the solution and the cake. In this experiment,  $\alpha$  was equal to 11; this value was determined using the known masses of water and cake and determining the bulk density of the cake.  $M_\infty$  was determined for each process condition using the model of Peleg (1988). Finally,  $Fo$  is the Fourier number for diffusion and can be defined as  $Fo = Dt/r^2$ .

Since the diameter of the spheres is not known, the values of the effective mass diffusivity are expressed as a function of the radius,  $D/r^2$  ( $\text{s}^{-1}$ ).

### *Statistical analysis*

Experiments and analysis were performed, at least, in duplicate. For comparison of the obtained results an analysis of the variance (ANOVA, 99%) was performed in addition to a Fisher LSD (least significant difference) test. This allows the comparison of different treatments and the determination of statistical significance. Software Statistica® 7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA) was used for the statistical analyses. In all figures, the error bars correspond

to the standard deviations and the lines are plotted only to better visualize the behavior of the results.

### 5.2.3 Results and discussion

#### *Evaluation of different pre-treatment energy inputs*

For the first part of this work, the effect of different treatment energies on the disintegration index and on the polyphenols and proteins concentration was evaluated. HVED and PEF were applied at different energy inputs between 0 and 291 kJ/kg (0 – 700 pulses). The results obtained are demonstrated in Figure 5.4, in this figure the time of treatment varied between 1 and 7 ms. It is possible to observe in Figure 5.4(a) that there was an increase of  $Z_C$  with the input energy for both treatments, PEF and HVED. This enhance, however, went up to a certain energy input only. After 125 kJ/kg, the PEF treated samples reached a maximum of 67 % cell damage. For samples treated by HVED, the degradation index maximum (90 %) was reached after applying 83 kJ/kg. This suggests that after these values most of the cell membranes were permeabilised and most of the cell walls were disrupted (in the case of discharge). Visually analyzing the samples, it was possible to observe that, after finishing the HVED treatments, the cake cylinders were turn into a powder, whereas after PEF treatment, some cylinders were still intact.

Figure 5.4 (b) and (c) show the variation of polyphenols and protein extracted during treatments and for the control sample; in Figure 5.4(c), the total protein extracted during the control experiment was below the detection limit. The graphics show a correlation between  $Z_C$  and extraction yield, this have been formerly observed for flaxseed cake (Boussetta *et al.*, 2013b). In general HVED was more efficient that PEF and both treatments showed higher yield when compared to control. For polyphenols, after 1 ms of treatment (42 kJ/kg), the concentration was higher 5 folds with PEF and 24 folds with HVED when compared to control.

The data from this work is in agreement with literature, other works evaluating the results of applying different energies or treatments time showed similar behaviors. This variation of the electrical disintegration index with PEF energy input was also observed by

Loginova *et al.* (2011a) and Boussetta *et al.* (2012a) for beets and potatoes, respectively. The effect of these treatments on the increase of solutes concentration in the medium were observed by Loginova *et al.* (2010) in PEF treatment of chicory and by Moubarik *et al.* (2011) in HVED treatment of fennel. Boussetta *et al.* (2011b) and Liu *et al.* (2011) showed that the number of discharges increased the extraction efficiency of polyphenols up to a treatment time of 8 ms, which corroborates what was observed in this work. Comparing both treatments, it is clear that, for any energy applied to the sample, disintegration is higher with discharges. This can be explained due to the different phenomena involved in each methodology, while PEF treatment causes damage to the cell membranes, HVED also damages the cell walls (Fincan and Dejmek, 2002). The arc which is formed inside the treatment chamber with HVED, increases significantly the extraction yield, as showed by Boussetta *et al.* (2013a). Moreover, the arching effects in the HVED treatments have as consequence the grinding of the cake, since it produces shock waves that cause a highly turbulent mixing environment, improving extraction (Boussetta *et al.*, 2011b).

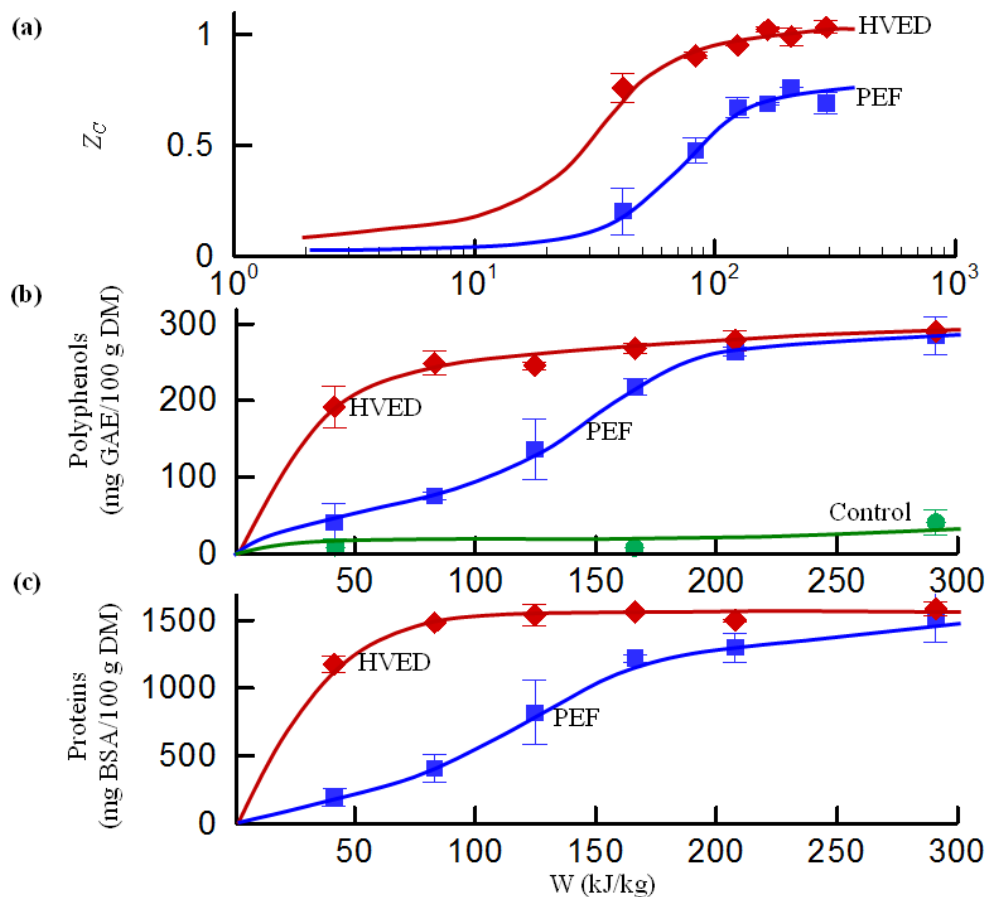


Figure 5.4 – Energy input *versus* (a) electrical disintegration index ( $Z_c$ ), (b) total polyphenols in the extracts and (c) protein concentration in the extract for PEF (13 kV/cm) and HVED (40 kV).

For the following experiments one optimal energy input was chosen. Therefore, 83 kJ/kg was chosen as the input energy. In Figure 5.4 it can be observed that, after the application of this energy input, the disintegration index and the polyphenols and proteins concentration reached a maximum for HVED. Since the goal of the experiments was to compare these two processes we fixated the energy at this value and proceeded with diffusion.

### *Diffusion kinetics*

The diffusion kinetics of polyphenols, proteins and lignans were evaluated with different extracting conditions and pre-treatments. A pre fixated ratio using 20 g of solvent per g of solute was used in all experiments. The extracted amount of polyphenols, in the different conditions, ranged between 54.3 and 440.3 mg GAE/100 g and the lignan content varied from 63.9 to 242.9 mg SE/100 g DM (dry matter). These values are in the same range found in our previous studies (Sarkis *et al.*, 2014) and in literature (Suja *et al.*, 2005; Moazzami *et al.*, 2006b). The extracts protein content was between 374 and 2001 mg BSA/100 g DM. These values can be considered low, since the protein content in sesame is estimated to be around 20%. This can be explained by the absence of the use of a high pH or the absence of salt addition to the media which are two fundamental parameters for sesame protein extraction (Kanu *et al.*, 2007a; Kanu *et al.*, 2007b; Achouri *et al.*, 2012). In this work, the aim was an initial comparison between pre-treatments, therefore, extractions were performed in water only.

The evaluation of diffusion kinetics was performed in two steps. First, the diffusion of polyphenols and lignans in different solvents was analyzed and subsequently, an investigation of the temperature effects on the polyphenols and proteins aqueous diffusion was performed. In the solvent analysis step, PEF and HVED pre-treatments (with a fixed energy input of 83 kJ/kg) were performed in water and ethanol was added only at the beginning of the diffusion step. Figure 5.5 shows the extraction kinetics of the solutes in the different solvents studied.

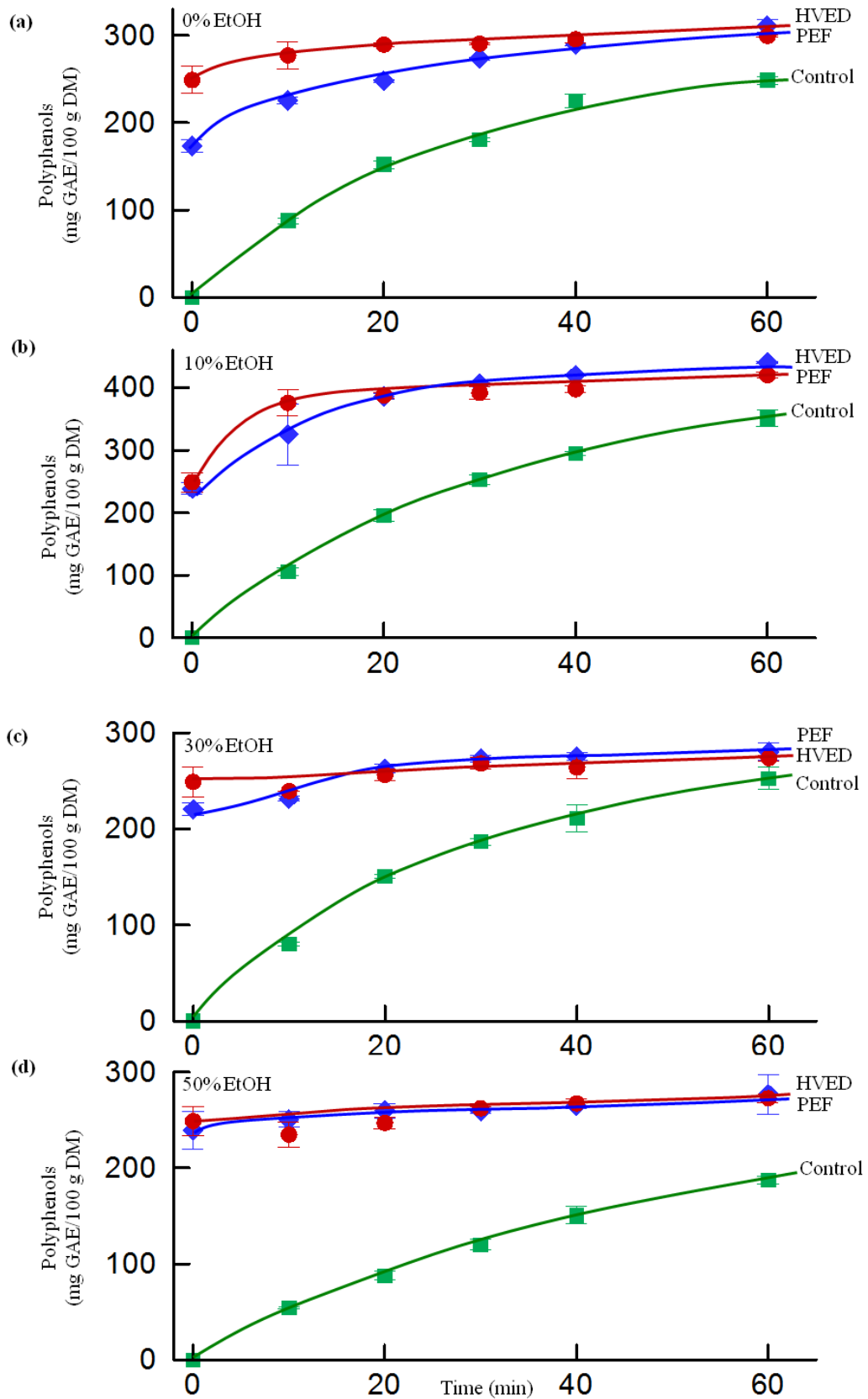


Figure 5.5 – Polyphenols extraction kinetics in different solvents: water (a), 10 % ethanol (b), 30 % ethanol (c) and 50 % ethanol (d) for the control, PEF and HVED samples (83 kJ/kg). Extraction conditions: 20 °C, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm.

For vegetable proteins extraction, water is the most common solvent, thus the extraction using different percentages of ethanol was performed for polyphenols and lignans. For sesame protein extraction, water has been widely showed to be the best solvent, due to the polarity of these compounds (Kanu *et al.*, 2007a; Kanu *et al.*, 2007b; Achouri *et al.*, 2012). Conversely, ethanol has been widely used as a solvent for polyphenols extraction. Among the percentages of ethanol evaluated in this study, 10 % ethanol was the best solvent for polyphenols extraction for both, control and pre-treated samples (Figure 5.5). The mixing of ethanol in the extracting medium has a significant effect on the extraction of polyphenols from sesame seed cake up to a certain amount, as it has been showed in previous work (Sarkis *et al.*, 2014).

In Figure 5.5 it is possible to observe that most of the compounds are progressively released from the solid to the solvent in the first 20 min; after, the diffusion of the solutes from the cake increases very slowly. This extraction kinetics were also observed by Boussetta *et al.* (2014). After a certain diffusion time, we can see that samples treated by PEF and HVED reach very similar concentration values, whereas control presents smaller concentrations even after 60 min. A similar behavior was observed by Moubarik *et al.* (2011) that compared extraction kinetic using ultrasound, PEF and HVED. When comparing the treatments applied it is possible to observe, in Figure 5.5, that the electrical pre-treatments can shorten the extraction time. After 10 min of extraction using water the total amount of polyphenols extracted was 3.2 times higher with HVED and 2.6 times higher with PEF when compared to control. Also, the application of the studied technologies can reduce the use of solvents for polyphenols extraction. It is possible to observe that it was necessary to add 10 % of ethanol in the control experiment to reach the same amount of polyphenols obtained after 40 min of diffusion when HVED was used ( $\approx 295$  mg GAE/100g). HVED had a more pronounced effect when compared to PEF for aqueous extraction. When ethanol was used, the extraction efficiency was very similar for both electrical pre-treatments. An evident effect of the use of discharge in the extraction of solutes in water was also observed by El-Belghiti (2005 apud Grémy-Gros *et al.*, 2008).

Recent work using grape seeds (Boussetta *et al.*, 2012b) also compared the effect of PEF and HVED with grinding and control samples. This study showed that all pre-treatments significantly influence the extraction yield of polyphenols. Grinding was the best pre-treatment followed by HVED and PEF. In our study, grinding was also evaluated as a pre-

treatment to aqueous extraction. The grinded sample was evaluated after 60 min of diffusion in water. The analysis showed a concentration of polyphenols of  $242 \pm 2$  mg GAE/100 g DM. This value is 20 % smaller than what was obtained after 60 min when PEF or HVED were used, showing that an effect other than the cake disintegration was caused by these technologies. As previously mentioned, the three pre-treatments used in this work, affect the sesame cake in different ways. The pulsed electric fields, damage the cell membrane, that is ruptured during the treatment (Vorobiev and Lebovka, 2008). When exposed to a discharge, both cell membrane and walls are damaged, since this process leads to tissue fragmentation and consequent increase of the transfer surface area. The grinding process also affects the cell membrane and wall, however, there is only a mechanical effect (Boussetta *et al.*, 2012b; Boussetta *et al.*, 2013a).

The extraction kinetics in different solvents was also evaluated for lignans. When water or 10 % ethanol were used as solvents the main lignan compound was not observed. Due to the presence of interferents, it was not possible to point out a major compound in these experiments. However, adding more ethanol to the solvent media changed the profile and it was possible to observe the major compounds in the samples with 30 and 50 % ethanol. Figure 5.6(a) shows chromatograms of the extracts from control, HVED and PEF treated samples after 60 min of diffusion in 30 % ethanol. In this figure, peak (1) represents the main peak for control and PEF samples and peak (2) for HVED samples. These peaks were tentatively identified as lignan glucoside using their UV spectrum. Figure 5.6(b) and (c) shows the absorbance through different wavelengths for peaks (1) and (2), respectively. Both peaks presented the same maximum absorption bands: 237 and 291 nm, which indicates that they are both lignan glucosides. These values are very similar to the maximum absorption bands found in literature for sesaminol di and triglucoside (Moazzami *et al.*, 2006b). Therefore, peaks (1) and (2) were considered the main lignans in the extracts and were used to quantify the diffusion efficiency for control and PEF, and HVED, correspondingly.

Since the HVED treatments produce active species, it is important to be concerned about the quality of the proteins and polyphenols obtained in the extracts. In Figure 5.6(a) it is possible to observe that the main lignan peak for the HVED treated sample has a different retention time when compared to the other samples. This difference could be related to the reaction between the lignans in the extracts and some of the active species generated in secondary reactions of the discharges, such as hydroxyl radicals, atomic oxygen and ozone

(Locke *et al.*, 2005). These species can interact with the extracted compounds and change the molecule configuration, thus changing their retention time. However, as the main peak observed for all treatments had the same UV spectrum, it was equally evaluated for all treatments as the amount of the main lignan extracted. This can be also a concern for extracted proteins (Boussetta *et al.*, 2011a), which were also extracted in our study and will be discussed afterward. Nevertheless, studies showed the absence of effect of this pre treatment on proteins profile. The quality of proteins from soy and BSA solutions has been previously evaluated using HPLC by Vishkvaztzev (1998 apud Grémy-Gros *et al.*, 2008) and Gros (2005 apud Grémy-Gros *et al.*, 2008), respectively.

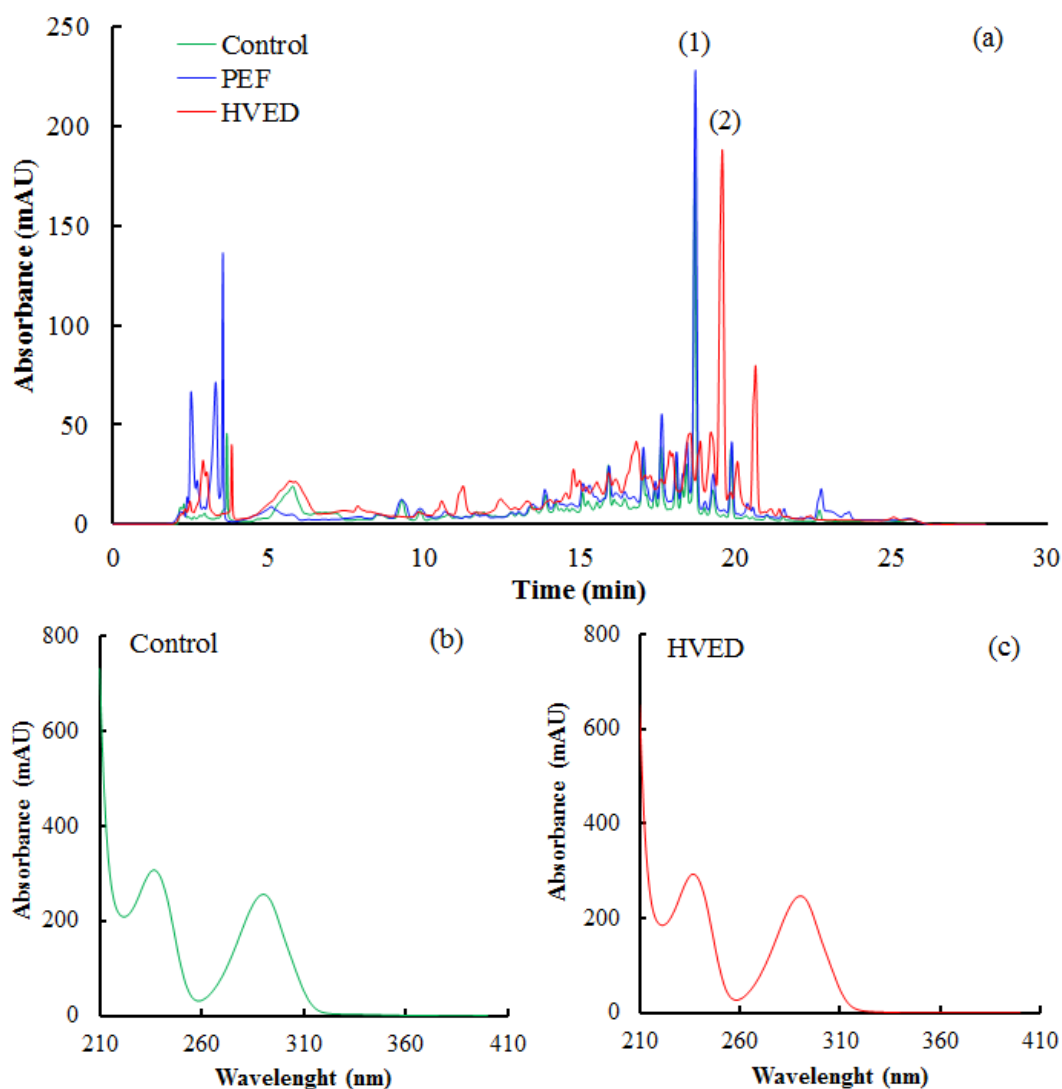


Figure 5.6 – Chromatogram of the extract after 60 min of diffusion in 30% ethanol for control, PEF and HVED samples (a). Peak assignment: (1) main lignan glucoside found in control and PEF and control samples and (2) main lignan glucoside found in HVED samples. UV spectrum of peaks 1 (b) and 2 (c).



Figure 5.7 presents the diffusion kinetics of the main lignan found in the extracts for the control sample and the samples treated by PEF and HVED. The results are presented for two different solvents: 30 % (Figure 5.7(a)) and 50 % ethanol (Figure 5.7(b)). Higher concentrations of ethanol were necessary for extraction of lignans than total polyphenols, this behavior was expected since it has been observed in previous work (Sarkis *et al.*, 2014). Apart from the optimum solvent, results were very similar to what has been previously observed for polyphenols. Both treatments increased the extraction of lignans and the effect of HVED was more pronounced. Also, for the pre-treated samples concentration reached the maximum at a time of approximately 20 min, which was not observed for control. After only 10 min in a 30 % ethanol solution, the total amount extracted of the main lignan was 3.2 and 2.6 folds higher for HVED and PEF treated samples, respectively, when compared to the untreated sample. After 20 min of diffusion in 50 % ethanol, PEF treated samples showed a concentration 2.7 times higher and HVED treated 3.5 times higher than control. A similar rate of increase has been observed for the extraction of lignans from flaxseed cake using HVED (Boussetta *et al.*, 2013b).

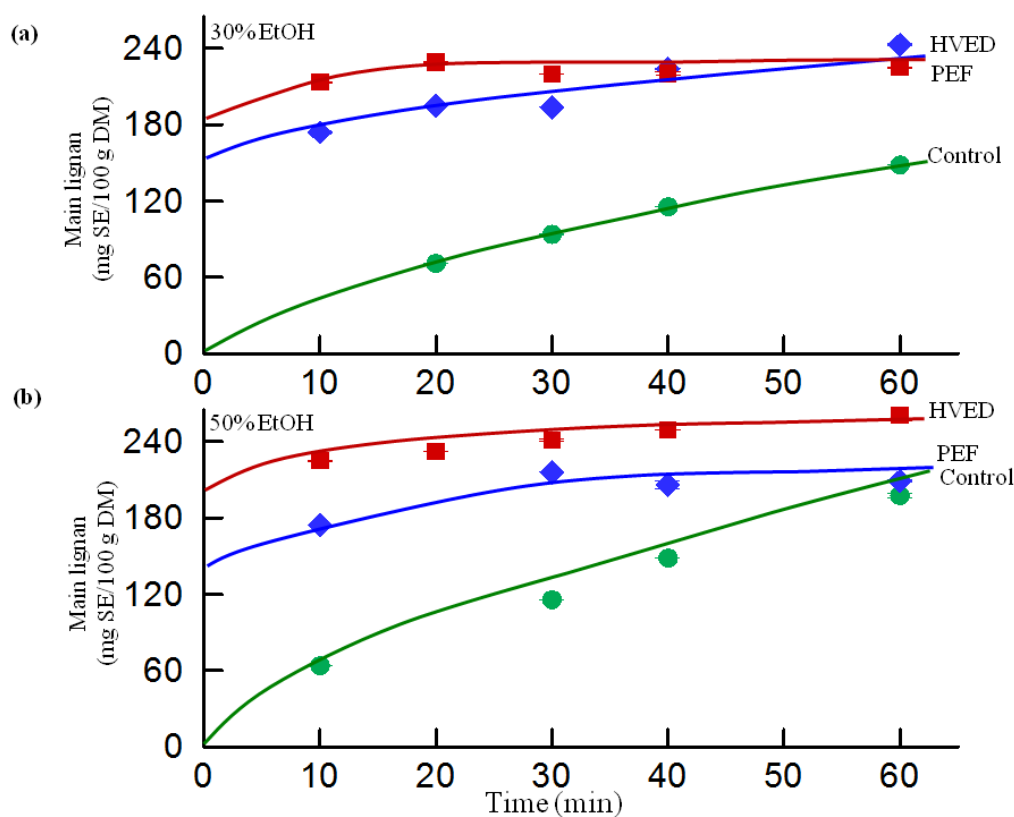


Figure 5.7 – Main lignans extraction kinetics in different solvents: 30 % ethanol (a) and 50 % ethanol (b) for the control, PEF and HVED samples. Extraction conditions: 20 °C, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm.

Figure 5.8 and Figure 5.9 show the diffusion kinetics of polyphenols and proteins for different temperatures, correspondingly. Both temperature and electrical treatments improved the extraction of polyphenols and proteins. The PEF and HVED treatments accelerated the kinetics of diffusion, making the impact of temperature smaller. For HVED, the diffusion curves were nearly the same at 20 or 60 °C. For PEF, on the other hand, extraction showed an improvement with temperature. This could be explained by the synergetic effect on tissue damage of PEF and thermal treatment. At temperatures in the range of 20 to 55 °C, structural transitions can happen inside membranes. These changes soften the membrane tissue, making pores arise more easily and facilitating electroporation (Zimmermann, 1986; Lebovka *et al.*, 2005; Vorobiev and Lebovka, 2008). Also, in Figures 5.8 and 5.9, it is possible to observe the same behavior from the other kinetics graphics: the increase in concentration of solutes with time was more pronounced in the control sample than in the PEF and HVED treated samples.

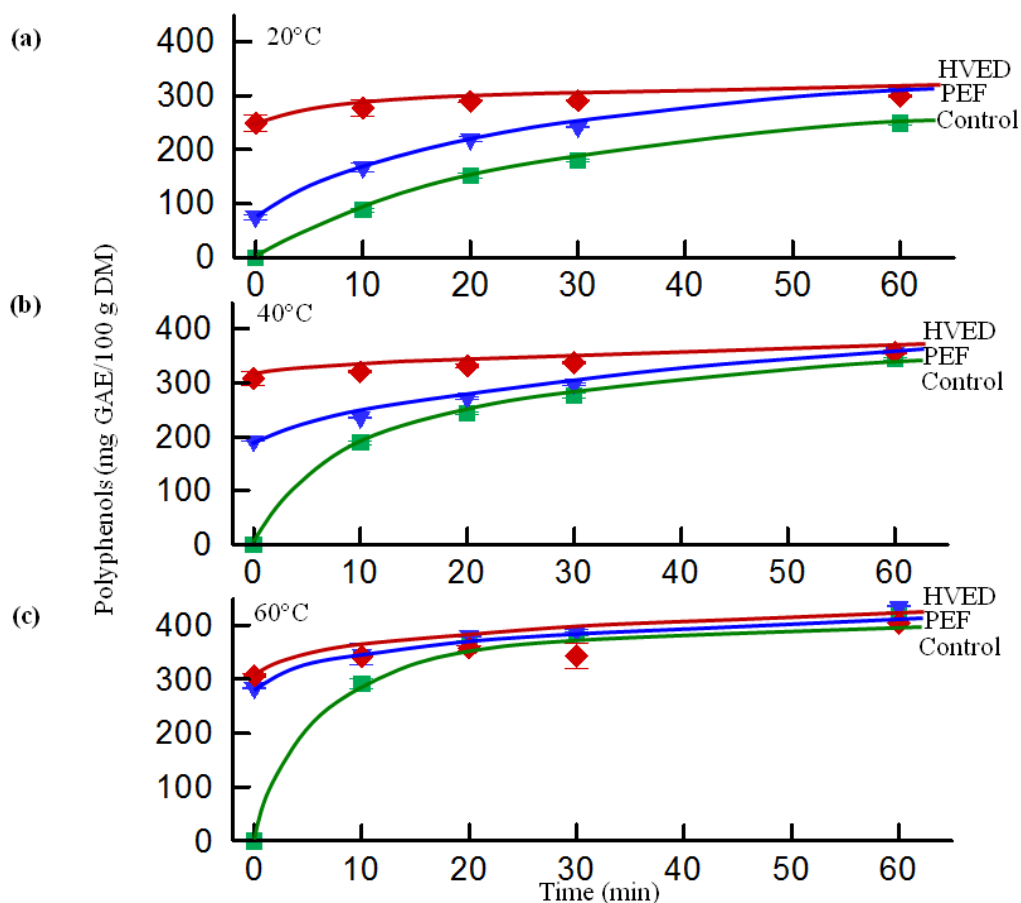


Figure 5.8 - Polyphenols aqueous extraction kinetics in different temperatures: 20 °C (a), 40 °C (b) and 60 °C (c). Extraction conditions: water, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm.

The more significant raise in the amount of solutes extracted when higher temperatures are used in the control sample is in agreement with literature. This behavior has been reported in the conventional extraction process for both polyphenols (Al-Farsi and Lee, 2008; Prasad *et al.*, 2011b) and proteins (Kanu *et al.*, 2007b). An increase in temperature is known to favor extraction by enhancing solubility of the solutes and the mass diffusivity (Takeuchi *et al.*, 2009). Also, heating can weaken the phenol-protein interactions in seed, allowing these compounds to diffuse with less difficulty to the solvent (Al-Farsi and Lee, 2008). The results observed in the abovementioned figures suggest that, if electrical treatments are applied, it is possible to reduce the diffusion temperature. This observation of a “cold” extraction was expected, since previous studies from literature found the same effect (Boussetta *et al.*, 2009a; Loginova *et al.*, 2010; Loginova *et al.*, 2011a).

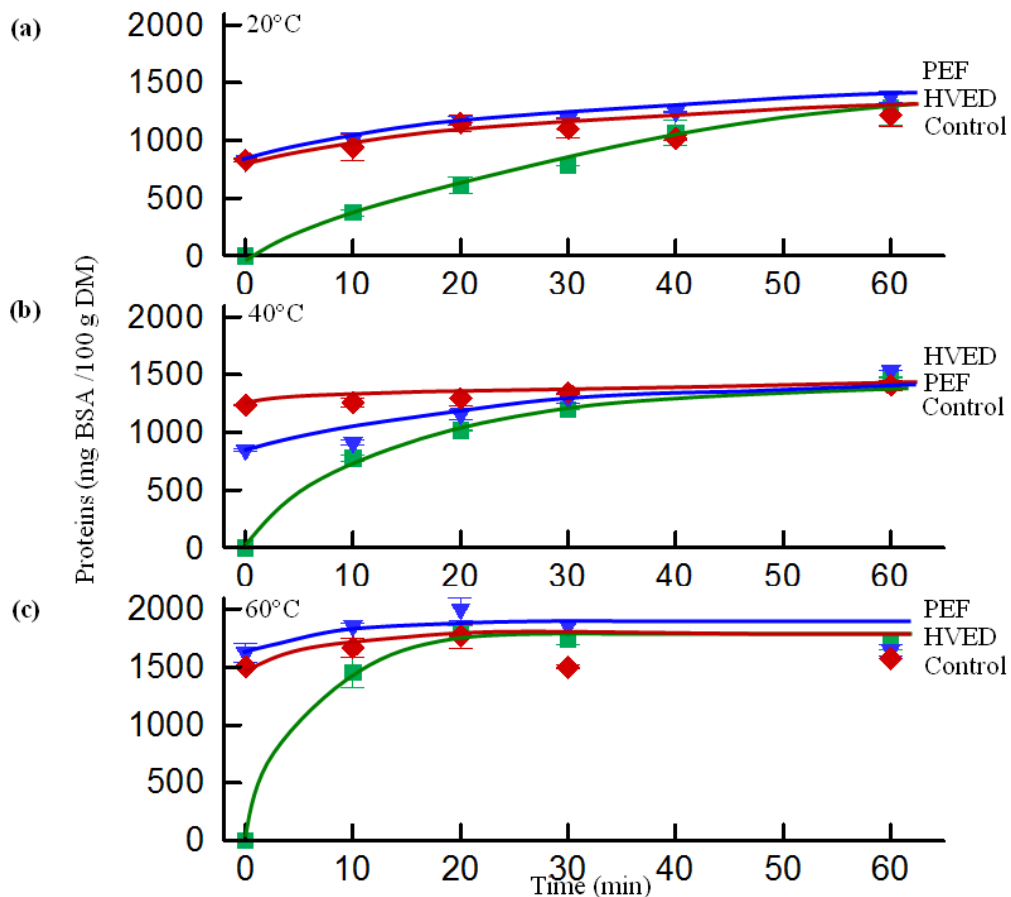


Figure 5.9 - Proteins aqueous extraction kinetics in different temperatures: 20 °C (a), 40 °C (b) and 60 °C (c). Extraction conditions: water, 20 g of solvent per g of sample and 150 rpm.

Furthermore, it can be observed in Figure 5.8 that, in the range of studied temperatures, no degradation of polyphenols was observed. The upper limit temperature

(60 °C) was chosen to avoid this phenomenon, as it has been seen in literature that polyphenols might suffer degradation in higher temperatures (Cacace and Mazza, 2003b). For proteins, nonetheless, after 20 min of extraction at 60 °C a decrease in concentration was observed (Figure 5.9). This decrease might be due to the denaturation and coagulation of the proteins. Previous studies for the evaluation of the best temperature for sesame protein extraction showed an increase in the extraction yield up to 40 °C followed by a decrease at 60 °C (Kanu *et al.*, 2007b).

#### *Effective mass diffusivity*

The results for the effective mass diffusivity as a function of the radius for different technologies and processing conditions are presented in Table 5.2. Comparing the extraction of polyphenols and lignans in different solvents it is possible to observe that, in all cases, both PEF and HVED treated samples presented higher values than the control sample, showing a significant improvement of the use of these technologies. Also, when water and 10 % ethanol was used for the extraction of polyphenols and 30 % was used in lignan diffusion, HVED had better results than PEF. The comparison between treatments is in agreement to what was shown in Figures 5.5 and 5.7. Moubarik *et al.* (2011) calculated the kinetic coefficients of solutes diffusion in water after different PEF, ultrasound and HVED treatments and concluded that the most rapid kinetics was obtained with discharges and the slowest with ultrasound. The comparison between solvents was not significant for the electrically treated cakes and, for the control sample, only 50 % was significantly worse than other solvents. It is possible, however, that the methodology of calculation was not appropriate to compare small differences, which were observed between solvents. Nevertheless, the determination of the effective diffusivity as a function of the radius was applied satisfactorily in the comparison of treatments, showing that they can result significantly in a faster extraction process.

Table 5.2 also shows the effective mass diffusivity as a function of the radius in different temperatures. For protein extraction at 60 °C this parameter was not calculated since the curves presented a different shape due to degradation and we were not able to use Peleg's model to estimate the equilibrium concentration. The values for polyphenols at 20 °C are the same as presented for 0 % ethanol; they were repeated for comparison purposes. Comparing the three treatments it is clear that at 20 °C the effect of the electrical treatments is more

pronounced and that, with an increase in the temperature of extraction, this effect diminishes. At 60 °C, for example, there were no significant differences between control, PEF and HVED in the extraction of polyphenols from the cake. Moreover, for both polyphenols and proteins, at 40 °C, only HVED showed a higher diffusivity, whereas PEF was the same.

Table 5.2 – Effective mass diffusivity as a function of the radius for different solutes and process conditions. For each result, values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p < 0.01$ .

Technology	$D/r^2 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$					
	Polyphenols				Main lignan	
Solvents	0 % EtOH	10 % EtOH	30 % EtOH	50 % EtOH	30 % EtOH	50 % EtOH
Control	6,3 ± 0,2 aC*	5,5 ± 0,4 aC	6,7 ± 0,6 aB	4,0 ± 0,1 bB	3,40 ± 0,01 bC	4,8 ± 0,1 aB
PEF	14,0 ± 0,3 B	13,4 ± 0,4 B	18,1 ± 0,2 A	16 ± 4 A	10,59 ± 0,06 B	19 ± 3 A
HVED	21 ± 1 A	20,3 ± 0,9 A	25 ± 2 A	18,4 ± 0,6 A	21,5 ± 0,6 A	16 ± 1 A

Temperatures	Polyphenols			Proteins	
	20 °C	40 °C	60 °C	20 °C	40 °C
Control	6,3 ± 0,2 cC	11,0 ± 0,4 bB	16,4 ± 0,2 aA	4,2 ± 0,4 bC	10,4 ± 0,3 aB
PEF	14,0 ± 0,3 B	12,4 ± 0,2 B	14,9 ± 0,6 A	13,0 ± 0,5 B	10,6 ± 0,2 B
HVE	21 ± 1 A	20,3 ± 0,5 A	19 ± 1 A	20 ± 2 A	20,3 ± 0,2 A

\*Capital letters refer to the comparison between technologies and lowercase to the comparison of different solvents or temperatures. In the lines where lowercase letter do not appear, there were no significant differences.

A similar behavior to what was observed in this study was also seen for flaxseed cake polyphenols by Boussetta *et al.* (2013b) using HVED. When analyzing different temperatures for the same treatment it is possible to observe that, only for control the increase in temperature was significant, while in the electrical pre-treated samples there was no increase. Since the cells from the control sample were intact the previously mentioned effects caused by temperature were more significant. In contrast, the electrically treated cake presented cells already with some disintegration index as it has been shown in Figure 5.4. The absence of the temperature effect in HVED treatments could be explained by the absence of a membrane barrier component, since  $Z_C \approx 1$ . In this case the extraction process is controlled by an unrestricted diffusion, as discussed in the work of Loginova *et al.* (2010) and Lebovka *et al.*

(2007a). In general, the results corroborate with what was previously discussed and shown in Figures 5.8 and 5.9.

#### 5.2.4 Conclusions

The results obtained in this work demonstrated that extraction assisted by PEF or HVED are effective techniques to increase yield of polyphenols, lignans and proteins extraction from sesame cake and improve kinetics of diffusion. Among the conditions analyzed in this study, the best treatment was an energy input of 83 kJ/kg, the best solvents were 10 % ethanol for polyphenols extraction and 50 % ethanol for lignans. Moreover, 60 °C was the ideal extraction temperature for polyphenol and 40 °C for proteins and, in general, most of the solutes were extracted in the first 20 min of diffusion. Estimation of effective mass diffusivity confirmed the significant improvement in extraction when the studied technologies are applied as pre-treatments. The behavior observed in this work showed that the use of PEF or HVED technologies can reduce the use of ethanol as a solvent for phenolic compounds extraction and the need of higher temperatures to improve diffusion.

#### 5.3 Referências

- ACHOURI, A., NAIL, V. e BOYE, J. I. Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, v.46, n.1, p.360-369. 2012.
- AL-FARSI, M. A. e LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, v.108, n.3, p.977-985. 2008.
- BELTRÃO, N. E. M., J.G., S. e PEREIRA, J. R. *O agronegócio do gergelim no brasil*. Brasília: Embrapa. 2001. 348p. p.
- BIGONIYA, P., NISHAD, R. e SINGH, C. S. Preventive effect of sesame seed cake on hyperglycemia and obesity against high fructose-diet induced type 2 diabetes in rats. *Food Chemistry*, v.133, n.4, p.1355-1361. 2012.
- BOUSSETTA, N., GRIMI, N., LBOVKA, N. I. e VOROBIEV, E. “Cold” electroporation in potato tissue induced by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*. 2012a.
- BOUSSETTA, N., LANOISELLÉ, J.-L., BEDEL-CLOUTOUR, C. e VOROBIEV, E. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, v.95, n.1, p.192-198. 2009.

- BOUSSETTA, N., LESAIN, O. e VOROBIEV, E. A study of mechanisms involved during the extraction of polyphenols from grape seeds by pulsed electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.19, p.124-132. 2013a.
- BOUSSETTA, N., REESS, T., VOROBIEV, E. e LANOISELLÉ, J.-L. Pulsed electrical discharges. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011a. Pulsed electrical discharges, p.145-172. (Contemporary food engineering)
- BOUSSETTA, N., SOICHI, E., LANOISELLÉ, J. L. e VOROBIEV, E. Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. *Industrial Crops and Products*, v.52, p.347-353. 2014.
- BOUSSETTA, N., TURK, M., DE TAEYE, C., LARONDELLE, Y., LANOISELLÉ, J. L. e VOROBIEV, E. Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, v.49, n.0, p.690-696. 2013b.
- BOUSSETTA, N. e VOROBIEV, E. Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*. 2014.
- BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., DELOISON, V., POCHEZ, F., FALCIMAIGNE-CORDIN, A. e LANOISELLÉ, J. L. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, v.128, n.2, p.364-370. 2011b.
- BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., LE, L. H., CORDIN-FALCIMAIGNE, A. e LANOISELLÉ, J. L. Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, v.46, n.1, p.127-134. 2012b.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.
- CACACE, J. E. e MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*, v.68, n.1, p.240-248. 2003.
- CASTRO, M. D. L. D. e PRIEGO-CAPOTE, F. Microwave-assisted extraction. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Microwave-assisted extraction, p.85-122. (Contemporary food engineering)
- CRANK, J. *The mathematics of diffusion*. Oxford Oxford University Press. 1975. 414 p.
- DOLATOWSKI, Z. J. e STASIAK, D. M. Ultrasonically assisted diffusion processes. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Ultrasonically assisted diffusion processes, p.123-144. (Contemporary food engineering)
- FINCAN, M. e DEJMEK, P. In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. *Journal of Food Engineering*, v.55, n.3, p.223-230. 2002.
- GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, v.26, n.2, p.68-87. 2012.
- GALANAKIS, C. M. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioprocess Processing*, v.91, n.4, p.575-579. 2013.
- GRÉMY-GROS, C., LANOISELLÉ, J.-L. e VOROBIEV, E. Application of high-voltage electrical discharges for the aqueous extraction from oilseeds and other plants. In: E. Vorobiev e N. I. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer 2008. Application of high-voltage electrical discharges for the aqueous extraction from oilseeds and other plants, p.217-235. (Food engineering series)

- GROS, C., LANOISELLE, J. L. e VOROBIEV, E. Towards an alternative extraction process for linseed oil. *Chemical Engineering Research & Design*, v.81, n.A9, Oct, p.1059-1065. 2003.
- HWANG, L. S. Sesame oil. In: F. Shahidi (Ed.). *Bailey's industrial oil and fat products*. Hoboken: John Wiley & sons, 2005. Sesame oil, p.537-576
- KAMAL-ELDIN, A. e APPELQVIST, L. Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from four *sesamum* species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.71, n.2, p.149-156. 1994.
- KANG, M.-H., KAWAI, Y., NAITO, M. e OSAWA, T. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *The Journal of Nutrition*, v.129, n.10, October 1, 1999, p.1885-1890. 1999.
- KANU, P. J., KERUI, Z., MING, Z. H., HAIFENG, Q., KANU, J. B. e KE-XUE, Z. Sesame protein 11: Functional properties of sesame (*sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian Journal of Biochemistry*, v.2, n.5, p.289-301. 2007a.
- KANU, P. J., ZHOU, H. M., KANU, J. B., ZHU, K.-X., ZHU, K.-R. e QIAN, H. The use of response surface methodology in predicting sesame (*sesamum indicum* L.) protein extractability with water and the analysis of the protein extracted for its amino acid profile. *Biotechnology Advances*, v.6, n.4, p.447-455. 2007b.
- LEBOVKA, N. I., PRAPORSCIC, I., GHNIMI, S. e VOROBIEV, E. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *Journal of Food Engineering*, v.69, n.2, p.177-184. 2005.
- LEBOVKA, N. I., SHYNKARYK, M. V., EL-BELGHITI, K., BENJELLOUN, H. e VOROBIEV, E. Plasmolysis of sugarbeet: Pulsed electric fields and thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, v.80, n.2, p.639-644. 2007.
- LIU, D., VOROBIEV, E., SAVOIRE, R. e LANOISELLÉ, J.-L. Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v.81, n.2, p.134-140. 2011.
- LOCKE, B. R., SATO, M., SUNKKA, P., HOFFMANN, M. J. e CHANG, J. S. Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Indust. Eng. Chem. Res.*, v.45, n.3, p.882-905. 2005.
- LOGINOVA, K. V., LEBOVKA, N. I. e VOROBIEV, E. Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, v.106, n.2, p.127-133. 2011.
- LOGINOVA, K. V., SHYNKARYK, M. V., LEBOVKA, N. I. e VOROBIEV, E. Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, v.96, n.3, p.374-379. 2010.
- MOAZZAMI, A. A., ANDERSSON, R. E. e KAMAL-ELDIN, A. Characterization and analysis of sesamol diglucoside in sesame seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.70, n.6, p.1478-1481. 2006a.
- MOAZZAMI, A. A., ANDERSSON, R. E. e KAMAL-ELDIN, A. HPLC analysis of sesaminol glucosides in sesame seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.3, 2012/11/12, p.633-638. 2006b.
- MOUBARIK, A., EL-BELGHITI, K. e VOROBIEV, E. Kinetic model of solute aqueous extraction from fennel (*foeniculum vulgare*) treated by pulsed electric field, electrical discharges and ultrasonic irradiations. *Food and Bioproducts Processing*, v.89, n.4, p.356-361. 2011.
- NAMIKI, M. The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Reviews International*, v.11, n.2, 1995/05/01, p.281-329. 1995.



- NEMES, S. e ORSAT, V. Evaluation of a microwave-assisted extraction method for lignan quantification in flaxseed cultivars and selected oil seeds. *Food Analytical Methods*, v.5, n.3, 2012/06/01, p.551-563. 2012.
- PELEG, M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, v.53, n.4, p.1216-1217. 1988.
- PRASAD, K. N., HASSAN, F. A., YANG, B., KONG, K. W., RAMANAN, R. N., AZLAN, A. e ISMAIL, A. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised mangifera pajang kosterm. Peels. *Food Chemistry*, v.128, n.4, p.1121-1127. 2011.
- RAMACHANDRAN, S., SINGH, S. K., LARROCHE, C., SOCCOL, C. R. e PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications - a review. *Bioresource Technology*, v.98, n.10, p.2000-2009. 2007.
- RANGKADILOK, N., PHOLPHANA, N., MAHIDOL, C., WONGYAI, W., SAENGSOOKSREE, K., NOOKABKAEW, S. e SATAYAVIVAD, J. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*sesamum indicum* L.) seeds and oil products in thailand. *Food Chemistry*, v.122, n.3, p.724-730. 2010.
- RIVAS, N. R., DENCH, J. E. e CAYGILL, J. C. Nitrogen extractability of sesame (*sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.32, n.6, p.565-571. 1981.
- SARKIS, J. R., MICHEL, I., TESSARO, I. C. e MARCZAK, L. D. F. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. *Separation and Purification Technology*, v.122, n.0, p.506-514. 2014.
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R. e LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: L. Packer (Ed.). *Oxidants and antioxidants - part a*. San Diego: Academic Press Inc., v.299, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, p.152-178
- SUJA, K. P., JAYALEKSHMY, A. e ARUMUGHAN, C. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, v.91, n.2, p.213-219. 2005.
- TAHA, F. S., FAHMY, M. e SADEK, M. A. Low-phytate protein concentrate and isolate from sesame seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.35, n.3, 1987/05/01, p.289-292. 1987.
- TAKEUCHI, T. M., PEREIRA, C. G., BRAGA, M. E. M., MARÓSTICA, M. R., LEAL, P. F. e MEIRELES, M. A. A. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: M. a. A. Meireles (Ed.). *Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications* CRC Press, 2009. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants
- VISAVADIYA, N. P. e NARASIMHACHARYA, A. V. R. L. Sesame as a hypocholesteraeamic and antioxidant dietary component. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.6, p.1889-1895. 2008.
- VOROBIEV, E. e LEOVKA, N. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 2008. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications, p.39-81. (Food engineering series)
- VOROBIEV, E. e LEOVKA, N. I. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: J. Raso e V. Heinz (Ed.). *Pulsed electric fields technology for the food industry. Fundamentals and applications*. New York: Springer, 2006. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields, p.153-194

- VOROBIEV, E. e LEOVKA, N. I. Pulse electric field-assisted extraction. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Pulse electric field-assisted extraction, p.25-84. (Contemporary food engineering)
- YOLMEH, M., NAJAFI, M. B. H., FARHOOSH, R. e HOSSEINI, F. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (rsm). *Food Chemistry*. 2014.
- ZHU, Q., LIU, F., XU, M., LIN, X. e WANG, X. Ultrahigh pressure extraction of lignan compounds from *diosma versipellis* and purification by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.905, n.0, p.145-149. 2012.
- ZIMMERMANN, U. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. In: (Ed.). *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology, volume 105*: Springer Berlin Heidelberg, v.105, 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion, p.175-256. (Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology)
- ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. e RIEMANN, F. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*, v.14, n.11, p.881-899. 1974.

## **CAPÍTULO 6 - APLICAÇÃO DE TECNOLOGIAS ELÉTRICAS NA EXTRAÇÃO DE ÓLEO DAS SEMENTES DE GERGELIM**

Este capítulo apresenta o estudo da aplicação das tecnologias de CEP e DEAT, as mesmas avaliadas no capítulo anterior, na extração de óleo das sementes de gergelim. Essa etapa do trabalho visa avaliar o desempenho da aplicação desses métodos em uma etapa anterior a obtenção da torta de gergelim, a fim de minimizar a geração desse resíduo. Assim, visa-se aperfeiçoar o processo de produção de óleo de gergelim como um todo, e não apenas reaproveitar o subproduto gerado. Essa etapa do trabalho foi também realizada durante o estágio sanduíche na Universidade de Tecnologia de Compiègne (*Université de Technologie de Compiègne*) na França e, da mesma forma, o trabalho foi coorientado pela Professora Assistente Nadia Boussetta e supervisionado pelo Professor Eugène Vorobiev.

O capítulo está estruturado em uma seção inicial, onde é apresentada a metodologia para tratamento das sementes e obtenção do óleo, seguida de um artigo, em língua inglesa, no qual os resultados obtidos são apresentados e discutidos. O objetivo do estudo apresentado a seguir foi aplicar diferentes pré-tratamentos à semente de gergelim - moagem, CEP e DEAT - e avaliar a influência desses processos no rendimento da extração de óleo e nos parâmetros de prensagem do gergelim.

## 6.1 Materiais e Métodos

### 6.1.1 Matéria-prima e caracterização

As sementes de gergelim (*Sesamun indicum*) utilizadas nesse experimento foram adquiridas em um mercado local e são provenientes da Índia. A caracterização da semente foi realizada através das análises de umidade, lipídios e proteínas; para todos os ensaios foram utilizadas metodologias oficiais da AOAC (1990). A análise de umidade foi realizada conforme descrito no item 3.1.1. A análise de lipídios foi realizada através da extração exaustiva usando um equipamento Soxhlet e éter de petróleo como solvente, e para determinação do teor de proteína nas sementes, foi usado o método de Kjeldahl, que determina a matéria nitrogenada total de uma amostra.

### 6.1.2 Pré-tratamentos

Diferentes pré-tratamentos foram realizados nas sementes, com o intuito de verificar e comparar sua influência na eficiência do processo de extração de óleo. Foram avaliadas as sementes sem tratamento, as sementes imersas em água e secas e as sementes que, após a imersão em água, foram tratadas usando CEP ou DEAT e, em seguida passaram pelo processo de secagem. Ainda, foi realizada uma comparação com o processo de moagem como pré-tratamento. A imersão e secagem foram consideradas como pré-tratamentos porque são etapas necessárias aos tratamentos elétricos. Portanto, para que a comparação avaliasse apenas os efeitos causados pelos pulsos ou descargas, esses processos foram realizados nas demais amostras.

Para a imersão, que foi realizada antes do tratamento, o gergelim (500 g) foi colocado em um béquer com capacidade de 1 L e coberto com água até o limite de volume do recipiente. O recipiente contendo o produto foi deixado dessa forma durante a noite. A umidade das sementes passou de  $3,6 \pm 0,5$  % para  $39,05 \pm 0,05$  %. A etapa de secagem foi realizada após o tratamento. A umidade das amostras influencia a prensagem e, conseqüentemente, o rendimento da extração, por isso, a umidade das sementes foi uniformizada através da secagem em estufa (Memmert, Alemanha) a 50 °C. Foram feitas

pesagens consecutivas das amostras e essas foram mantidas na estufa até que um teor de umidade entre 5 e 8 % fosse atingido. Os teores de umidade das sementes para realização dos tratamentos elétricos e da prensagem foram escolhidas com base na literatura (Guderjan *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2008).

Os tratamentos elétricos foram realizados no equipamento descrito no item 5.1.2. Para tal, 100 g de sementes foram colocadas na célula e adicionadas de 300 g de água destilada, essa quantidade de água foi suficiente para cobrir as sementes e possibilitar a imersão dos eletrodos. Nos tratamentos de campo pulsado a distância entre eletrodos foi fixada em 2 cm, sendo o campo elétrico aplicado de 20 V/cm. Em ambos os casos, aplicação de CEP e DEAT, variou-se o número de pulsos e, dessa forma, a quantidade de energia aplicada. Foram realizados experimentos usando 100, 200, 400 e 600 pulsos; usando a equação 5.1, para esses valores de pulso a energia aplicada foi de 40, 80, 160 e 240 kJ/kg, respectivamente. Os mesmos valores de energia foram usados para ambos os tratamentos elétricos. Após a aplicação de cada tratamento foi medida a condutividade elétrica do meio e esses valores foram utilizados para a determinação do grau de desintegração ( $Z_C$ ), calculado usando a equação 2.2. A amostra moída foi produzida após a imersão e secagem, usando um moedor de café (*SEB*, França) em escala de bancada.

### **6.1.3 Análises da água dos tratamentos elétricos**

Na água proveniente dos tratamentos elétricos foi analisado o teor de compostos fenólicos e proteínas extraídas; nessas análises foram usadas as metodologias descritas na seção 5.1.4. A água foi coletada da célula de tratamento, centrifugada (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Alemanha) e armazenada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Foram ainda avaliados os teores de turbidez, usando um turbidímetro (Hach, modelo Ratio XR, Estados Unidos), e a porcentagem de óleo na água. Essa última análise foi realizada através da secagem da água em estufa (De Léo, modelo A3, Brasil) a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e posterior análise do teor de lipídios nos sólidos, usando um equipamento Soxhlet (AOAC, 1990). Assim, foi possível calcular a quantidade de óleo perdida na água durante o pré-tratamento elétrico. Essa quantidade foi determinada apenas para a água proveniente do tratamento por DEAT, pois apenas nesse caso foi observada alta turbidez na água devido à presença de óleo. A água derivada da aplicação de CEP se encontrava límpida.

#### 6.1.4 Prensagem

Após a secagem, as sementes foram prensadas usando um texturômetro (Stable Microsystems, modelo TA-XT Plus, Inglaterra). O equipamento utilizado nesse trabalho é apresentado na Figura 6.1, ele é composto por um pistão e um cilindro, ambos de aço inoxidável. As sementes (3,17 g) foram pesadas em balança analítica (Metler Toledo, modelo PM600, Suíça) e inseridas no cilindro para prensagem. Na parte inferior do cilindro foi colocada uma tela para evitar a saída de sementes e homogeneizar a saída de óleo. O processo de prensagem foi realizado por 1h. A massa de sementes a ser utilizada e o tempo de prensagem ideal já haviam sido previamente otimizados para a linhaça em outros trabalhos do grupo de pesquisa.



Figura 6.1 – Fotografia do equipamento utilizado para prensagem das sementes de gergelim.

No aparato apresentado na Figura 6.1 foi possível analisar o teor de óleo extraído e a deformação sofrida pelas sementes. O teor de óleo foi avaliado pela diferença de massa das sementes antes e depois da prensagem, usando sempre a mesma balança, posicionada ao lado do texturômetro. Para determinação da deformação ( $\epsilon$ ) ao longo do tempo de prensagem foi usada a equação 6.1. Nessa equação  $h$  se refere à altura do pistão em um tempo  $t$  e  $h_0$  à altura do pistão no início da prensagem, ou seja, a altura das sementes de gergelim. Essa altura foi medida, sendo  $h_0$  igual a 11 cm. Os valores de deformação são apresentados graficamente, demonstrando a sua variação com a raiz quadrada do tempo.

$$\varepsilon = 1 - h/h_0 \quad (6.1)$$

O equipamento utilizado permite a variação da força aplicada, que pode ser de até 4905 N. A pressão de compressão ( $P$ ) foi calculada dividindo-se a força ( $F$ ) pela área na qual ela é exercida através da equação:

$$P = \frac{F}{10 (\pi d^2 / 4)} \quad (6.2)$$

onde,  $d$  é o diâmetro do cilindro no qual o pistão foi inserido ( $d = 2,5$  cm),  $F$  é a força em Newtons e  $P$  é a pressão dada em bar. Para determinar a melhor pressão de trabalho, as sementes não tratadas foram prensadas utilizando 20, 40, 60, 80 e 100 bar (máxima pressão do aparato) e foram avaliados o rendimento da extração e a deformação sofrida. A Figura 6.2 apresenta a variação desses dois parâmetros nas diferentes pressões usadas.

É possível observar que a maior pressão apresentou os melhores resultados, rendimento de 61,6 % e deformação máxima de 62,4 %. Este comportamento já era esperado; de acordo com Savoire *et al.* (2013), para a prensagem de sementes em prensa hidráulica, quanto mais pressão é aplicada maior a eficiência do processo.

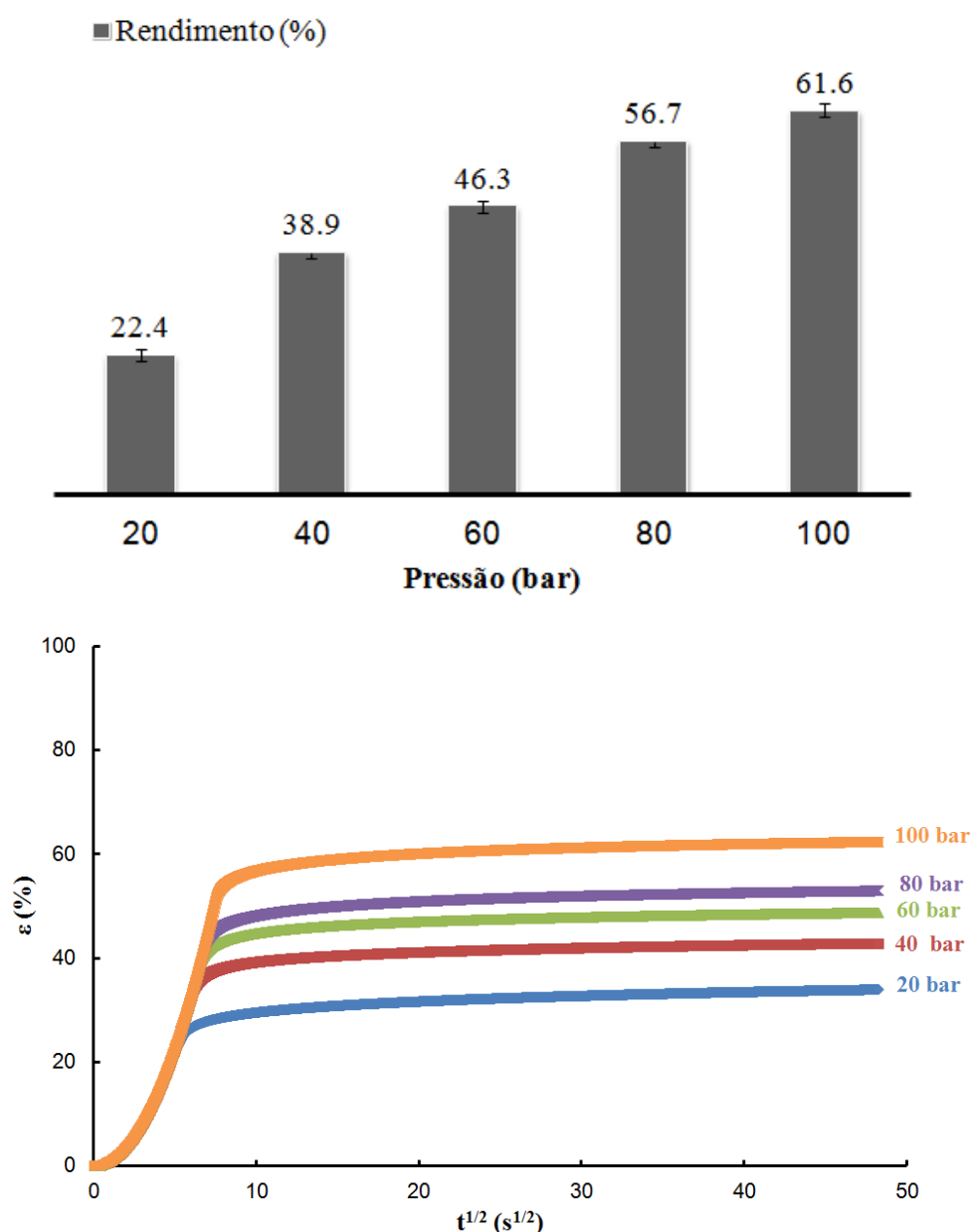


Figura 6.2 – Rendimento da extração do óleo da semente de gergelim por prensagem a frio (a) e deformação *versus* tempo (b) nas diferentes pressões aplicadas.

### 6.1.5 Análises do óleo e da torta

A qualidade do óleo obtido após a prensagem foi analisada através do seu teor de lignanas, utilizando HPLC. Para tal, o óleo foi misturado a uma solução contendo 80 % metanol (Vetec, Brasil) em uma proporção de 10  $\mu$ L de solução por mg de óleo. A mistura foi realizada em um recipiente plástico com capacidade de 2 mL e foi agitada em uma mesa



agitadora (Biomixer, modelo TS2000A VDRL, Brasil) por 30 min. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas (*Cientec*, modelo CT 5000R, Brasil) por 5 min e filtradas em membranas com poro nominal de 0,22  $\mu\text{m}$ . As amostras filtradas foram, então, utilizadas para análise por cromatografia. A análise foi realizada seguindo as mesmas condições cromatográficas previamente descritas para a torta de gergelim (seção 3.1.5) e usando o equipamento de HPLC descrito no item 5.1.4. Essa análise foi realizada apenas de forma qualitativa e teve como objetivo detectar as lignanas presentes nos óleos provenientes de sementes tratadas ou não pela aplicação de pulsos elétricos. Dessa forma, pode-se verificar se houve alguma reação prejudicial durante a aplicação das tecnologias de CEP e DEAT.

A torta das sementes não tratadas obtida após a prensagem foi analisada para determinação do seu teor total de proteínas e fenólicos. Como a torta é um produto de interesse, é importante que, além de aumentar a eficiência da extração de óleo, o processo aplicado ainda gere um resíduo de alto valor nutricional. Para essa análise a torta obtida foi moída e extraída usando: solução aquosa com pH 12 como solução extratora (pH ajustado com NaOH 0,1 M), uma razão solvente sólido de 35 e temperatura ambiente ( $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A extração foi realizada por 1 h e, posteriormente as amostras foram centrifugadas (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Alemanha) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento das análises. O teor de fenólicos e proteínas foi determinado de acordo com as metodologias descritas na seção 5.1.4. Uma solução aquosa com pH 12 foi escolhida como solvente pois, de acordo com experimentos anteriores (não apresentados nesse trabalho) esse foi o solvente que maximizou a extração de proteínas da torta.

## 6.2 Artigo 4

### APPLICATION OF PULSED ELECTRIC FIELDS AND HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGES FOR THE EXTRACTION OF OIL FROM SESAME SEEDS

Artigo a ser submetido para a revista *Food and Bioprocess Technology*.

Authors: Júlia Ribeiro Sarkis<sup>1</sup>, Nadia Boussetta<sup>2</sup>, Isabel Cristina Tessaro<sup>1</sup>, Ligia Damasceno Ferreira Marczak<sup>1</sup> and Eugène Vorobiev<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Chemical Engineering Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup>Unité Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, Université de Technologie de Compiègne (UTC).

#### Abstract

Sesame is a widely cultivated oilseed and its oil presents high nutritional quality and economic value. The objective of this work was to evaluate two different electrical technologies: pulsed electric fields (PEF) and high voltage electrical discharges (HVED), as pre-treatments to oil extraction. These treatments were performed with the objective of damaging the seed cells prior to pressing for oil expression and were compared to a control sample and to grinding. Electrical treatments were carried out with different input energies varying between 40 and 240 kJ/kg. Evaluation of each treatment efficiency was performed through the analysis of the disintegration index of the seeds, oil yield, deformation curves and oil quality among others. The disintegration index increased with the energy input and it was higher for seeds treated by HVED. PEF treatment increased the oil yield by 4.9 % and HVED, if accounted oil losses in water, resulted in the extraction of 22.4 % more oil when samples are compared to control. The deformation curves were very similar for all samples, except for the grinded seed, which reached higher deformation values during pressing. Results of the HPLC analysis show that the oil lignan profile was the same for all analyzed treatments.

Moreover, there were low protein and polyphenols losses during treatment and, therefore, a cake rich in these compounds is obtained as a by-product of the proposed process.

### 6.2.1 Introduction

Sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivation presents great economic, agricultural and social potentials. These characteristics can be attributed to its tolerance to dry weather, easy handling and the obtention of seeds with high oil content with elevated stability (Araújo *et al.*, 2006). The percentage of oil in this seed can range between 28 and 59 % and the protein content is approximately of 20 % (Shyu and Hwang, 2002). Sesame is an important crop around the world, being the ninth most cultivated oilseed. In 2011, the world production of sesame seeds was of 4.092 tons and, from this production, 70 % is estimated to be designated for oil production (Namiki, 1995; FAO, 2011). Sesame oil presents high nutritional quality and economic value. The lipid profile of this oil is composed mainly of triglycerides, followed by diglycerides, free fatty acids, polar lipids and monoglycerides. Moreover, sesame oil presents high contents of phytosterols, tocopherols and lignans. The main lignans found in this product are sesamin and sesamol (Reshma *et al.*, 2010). These minor components should be taken into consideration, since they offer high oxidative stability to the oil and have several beneficial physiologic aspects (Shahidi and Naczki, 2004; Shahidi *et al.*, 2006; Hemalatha and Ghafoorunissa, 2007). The ingestion of 10 mg of sesame oil daily has been shown to increase  $\gamma$ -tocopherol in the serum (Lemcke-Norojärvi *et al.*, 2001) and decrease plasma cholesterol (Hirata *et al.*, 1996).

Pressing and solvent extraction are the most common processes used for oil expression from seeds. Screw presses are usually used for industrial scale pressing; however the hydraulic presses can also be employed (Savoire *et al.*, 2013). The hydraulic press is usually used at laboratory scale to investigate oil yield results, due to its simplicity (Gros *et al.*, 2003). In general, the maximum yield is of 80 %, when a press is used to obtain oil from seeds, is of 80 %. When solvents are used, they provide higher oil yields, however, the oil obtained using this methodology is of significant lower quality. For this reason, pressing is most commonly used for oils with high nutritional values as sesame (Willems *et al.*, 2008). To improve pressing efficiency, thermal, mechanical, chemical and enzymatic pre-treatments can be performed. In this way, the press can be feed with raw or treated seeds (Savoire *et al.*, 2013).

These treatments need to be chosen carefully since they can affect the oxidative stability of the oils and of the lignans in the product (Fukuda *et al.*, 1986; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1995; Hwang, 2005).

Besides these pre-treatments, the application of pulsed electric fields (PEF) and high voltage electrical discharges (HVED) emerge as possibilities to provide a gentle, low-temperature and highly effective process to pre-treat the seeds. PEF results in the rupture of cell membranes when submitted to an external electric field, increasing the electrical conductivity and the permeability of intracellular material (Zimmermann *et al.*, 1974; Vorobiev and Lebovka, 2011). HVED affects both the cell walls as well as membranes and can cause more extensive damage to the product. This technology is based on the phenomenon of electrical breakdown in water, which induces physical (e.g. shock waves) and chemical (e.g. formation of O<sub>3</sub>) processes that affect the cell, enhancing the release of intracellular components (Gros *et al.*, 2003; Boussetta and Vorobiev, 2014). Based on these effects, application of high-intensity electric fields could replace and upgrade conventional techniques in the recovery of plant oils (Jaeger *et al.*, 2008).

PEF has been previously evaluated as a pre-treatment for oil extraction from maize, olives, soybeans and rapeseed (Guderjan *et al.*, 2005; Guderjan *et al.*, 2007). The authors showed that the pre-treatment with PEF improved the oil extraction yield significantly. Moreover, this electrical pre-treatment had a significant effect on the oil quality, increasing the content of bioactive compounds in the obtained oils. But there is still a lack of knowledge of the effects of different energy inputs in oil extraction. The previous studies using PEF were only focusing a small number of pre-treatments, whereas in this work a larger range of energies for PEF were evaluated and HVED was investigated as a possible technology to treat the seeds.

The objective of this work was to use PEF and HVED pre-treatments in sesame seeds to obtain higher oil extraction yields and preserve functional compounds. For this purpose, different input energies were applied to the seed prior to pressing. Results were compared to untreated, control and grinded samples to evaluate the effects of the electrical technologies.

## 6.2.2 Materials and methods

### *Materials and seed characterization*

The sesame seeds (*Sesamun indicum*) used in this work were bought in a local market and belonged to Indian cultivars. For the HPLC analysis, HPLC grade methanol from Vetec (Brazil) and Mili-Q water (Milipore, France) were used as solvents and sesamin (CAS 607-80-7) and sesamol (CAS 533-31-3) from Sigma Aldrich (Unites Satdes) were used as standards. In the spectrophotometric analysis, the Folin-Ciocalteau and Bradford reagents and the standards for gallic acid (CAS 149-91-7), bovine serum albumin (BSA, CAS 9048-46-8), were purchased from Sigma Aldrich (France).

The seeds were characterized in its total oil content using a Soxhlet apparatus and petroleum ether as solvent. Oil extraction was carried out by placing the grinded seeds (2.5 g) in thimbles covered with glass wool, which were put in the Soxhlet equipment. Then, 200 mL of solvent were added extraction was performed for 360 min with boiling petroleum ether. The protein content was determined by the Kjeldahl method. This methodology involves, initially, the digestion of the sample using sodium and ammonium sulfate and sulfuric acid, followed by distillation with boric acid. The moisture content in the seeds was also determined, according to the gravimetric method. All methodologies used were from the AOAC proceedings (AOAC, 1990).

### *Pre-treatments*

For comparison, different treatments were applied in the seeds before pressing. The studied pre-treatments were: immersion in water followed by drying (ID); immersion in water, drying and grinding (IDG); and immersion, PEF or HVED treatment and subsequent drying. The ID sample was considered as a control since the immersion and drying steps were necessary to the process. The results were also compared to the untreated sesame (U) (without immersion and drying). For the immersion, sesame was covered in water and left to hydrate overnight. The seed moisture content was initially  $3.6 \pm 0.5$  % and, after this process, it increased to  $39.05 \pm 0.05$  %. Drying was performed after the treatments. The moisture content of the samples affects the pressing efficiency, for this reason this parameter was standardized

through heating in an oven (Memmert, Germany) at 50 °C. Samples were dried until humidity reached a value between 5 and 8 %. This parameter was chosen according to literature data (Guderjan *et al.*, 2007; Willems *et al.*, 2008). Figure 6.3 shows a schematic diagram of the process performed with the sesame seeds. Electrically treated seeds are presented in Figure 6.3(a), while the other treatments are described in Figure 6.3(b).

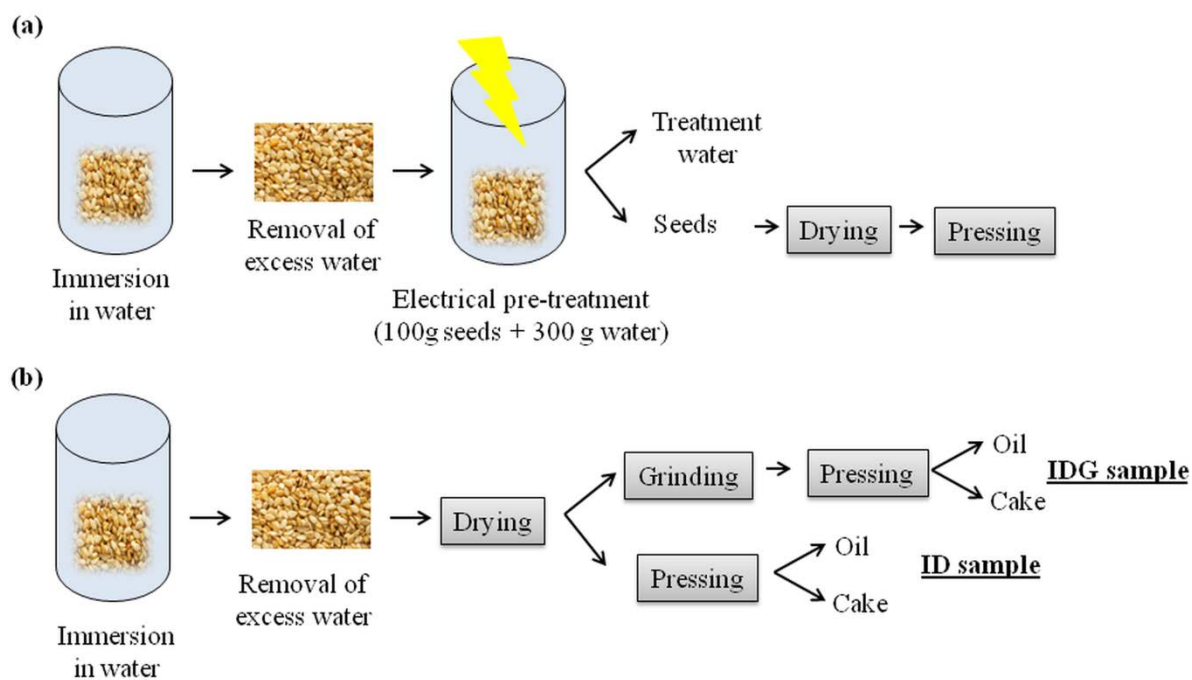


Figure 6.3 – Schematic diagram of the seed processing steps for: (a) electrically treated seeds and (b) ID and IDG samples.

The apparatus used for the application of the electrical treatments consists of a pulsed high voltage power supply (Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia) and a treatment chamber with 1 L capacity. For PEF application the chamber was equipped with two parallel disc electrodes (11 cm of diameter), with an inter-electrode gap of 2 cm. For HVED, the chamber was set with one disc electrode in the bottom (3.5 cm of diameter) and one needle electrode in the top. The needle and the disk electrode were 5 mm distant. In the set-up used in these experiments, the pulse or discharge duration was of 10  $\mu$ s and the frequency was 0.5 Hz. Each pulse or discharge applied provides a voltage of 40 kV. In our case, PEF treatments were performed using an electric field strength of 20 kV/cm and exponential decay pulses. A more detailed description of this equipment is in Boussetta *et al.* (2012b).

For the pre-treatments, 100 g of seed and 300 g of distilled water were added to the chamber. Different treatment energies were applied to the seeds (40, 80, 160 and 240 kJ/kg): input energies were varied by changing the number of pulses in each treatment and were the same for PEF and HVED. Following the treatments, electrical conductivity was measured using a conductivity meter (Inolab, Level 1 model, Germany). The conductivity values were used to calculate the cell disintegration index ( $Z_C$ ), as described in equation 1.

$$Z_C = (\sigma - \sigma_i) / (\sigma_d - \sigma_i) \quad (1)$$

In this equation,  $\sigma$  is the electrical conductivity after the treatment,  $\sigma_i$  is the initial electrical conductivity of the seeds only immersed in water (which was very close to zero),  $\sigma_d$  refers to the maximally disintegrated (grinded) seeds immersed in water. Grinding of the seeds was performed in a laboratory scale coffee grinder (*SEB*, France).

#### *Analysis of the treatment water*

The water placed in the chamber and used for the electrical treatments was analyzed for all different energies applied to evaluate if there were significant losses in this medium. The water was analyzed for turbidity, using a turbidimeter (Hach, model Ratio XR, United States), oil content, total phenolics and proteins. The oil content was determined in two steps. First, the water was dried in an oven (De Léo, model A3, Brazil) at 50 °C and the total solids content was determined. Then, oil was extracted from this solid using a Soxhlet apparatus (AOAC, 1990). With this data it was possible to calculate how much oil was lost in the water.

Prior to polyphenols and proteins analysis, the treatment water was centrifuged (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Germany), filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membranes and stored at -18 °C until analysis. Singleton *et al.* (1999) assay was used for polyphenols determination; 200  $\mu\text{L}$  of diluted sample was mixed with 1000  $\mu\text{L}$  of 10 % Folin-Ciocalteu reagent (diluted in distilled water, w/w) and left at room temperature for 5 min. Next, 800  $\mu\text{L}$  of sodium carbonate solution (7.5 g of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and 100 g of water) was added. The mixture was kept at 60 °C for 10 min in a water bath (GmbH, Germany) and then cooled for 10 min in a commercial freezer. Absorbance was read at 750 nm using an UV-Vis spectrophotometer (Milton Roy Company, Spectronic 20 Genesys, United States). Gallic acid was used as a standard, and results were expressed as milligrams gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of

dry matter (DM). Proteins were determined according to the methodology of Bradford (1976). The sample (200  $\mu$ L) was diluted in 1800  $\mu$ L of the Bradford reagent (diluted 3 times in water). After 5 min of reaction, absorbance was read at 595 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Milton Roy Company, Spectronic 20 Genesys, United States). The standard calibration curve was made using Bovine Serum Albumin (BSA) and results were expressed as mg BSA/100 g DM.

### *Pressing*

After drying, seeds were pressed using a texture analyzer (Stable Microsystems, model TA-XT Plus, England). The equipment is composed by a stainless steel piston and a cylinder. The seeds (3.17 g) were weighted (Metler Toledo, model PM600, Switzerland) and inserted in the cylinder for pressing. Pressing was performed for 1 h at a pressure of 100 bar. The oil yield was evaluated by comparing the weight of the seeds before and after pressing using an analytic scale. In addition to the oil yield, the deformation ( $\varepsilon$ ) suffered by the seeds during pressing was calculated using the following equation:

$$\varepsilon = 1 - h/h_0 \quad (2)$$

where,  $h$  is the position of the piston at a certain time and  $h_0$  is the initial height of the piston when pressing starts. The deformation values are presents graphically as function of the time.

### *Sesame oil quality*

The quality of the obtained oil was investigated by the analysis of the lignan profile of the samples, using HPLC. Extractions and chromatographic analysis were performed based on the work of Rangkadilok *et al.* (2010). Oil was mixed with a 80 % methanol solution (10  $\mu$ L/mg) and agitated for 30 min in an agitating table (Biomixer, model TS2000A VDRL, Brazil). Then, samples were centrifuged (Cientec, model CT 5000R, Brazil) and filtered in membranes with 0.22  $\mu$ m pores. For this analysis, an Agilent chromatography system (model 1260 Infinity, USA) equipment with a quaternary pump, a DAD UV-Vis detector and a column oven was used. Separation was conducted on a reversed-phase C18 column (Agilent, ZORBAX Analytical Eclipse Plus, USA) using water (mobile phase A) and methanol (mobile



phase B). The eluent flow rate was maintained at 1.0 mL/min, the injection volume was 20 µL, and the detection wavelength and column temperature were set to 280 nm and 40 °C, respectively. The elution program with a linear gradient was as follows: 0 min, 5 % B; 0-5 min, 18 % B; 5-10 min, 35 % B; 10-15 min, 62 % B; 15-18 min, 80 %; 18-22 min, 80 %; 22-23 min, 5 % B; 23-26 min, 5% B. The two available commercial standards, sesamin and sesamol, were used to identify the peaks in the chromatogram. They were diluted in ethanol 95 % and injected in the HPLC equipment using the same chromatographic conditions. These analyses were performed qualitatively, to detect the presence of lignans in the oils obtained with the different pre-treatments. In this way, changes in the lignan profile with the electrical treatments could be detected.

#### *Cake analysis*

The cake is a by-product of interest and it is important to maintain its nutritional value, thus, the pre-treatment should avoid the loss of components in water. To check this, the cake obtained after pressing of the untreated seeds was analyzed for the determination of polyphenols and proteins as previously described and compared to the results obtained for the treatment water. The sample was grinded and extracted using water at pH 12 (pH adjusted with sodium hydroxide (NaOH) 0.1 M), 35 g of solvent per g of sample and at room temperature. Extraction was carried out for one hour. Prior to analysis the sample was centrifuged (*Eppendorf*, MiniSpin plus, Germany) and stored at -18 °C.

#### *Statistical analysis*

All the experiments performed in this study were done at least in duplicate. An analysis of variance (ANOVA) was used to compare treatments. The p-values, at a probability of 0.05, indicated if the responses were significantly different. Additionally, for comparison of more than two samples, a Fisher LSD (least significant difference) test was used. Software Statistica® 7 (*Statsoft Inc.*, Tulsa, USA) was used for the statistical analyses. In all figures, the error bars correspond to the standard deviations and the lines are plotted only to better visualize the behavior of the results.

### 6.2.3 Results and discussion

The sample characterization showed that, the seeds used in this work have an oil content of  $51.58 \pm 0.01$  % and  $20 \pm 1$  % total protein (results expressed in fresh matter basis). The moisture content of the material was  $3.6 \pm 0.5$  %. The oil and protein amounts were similar to those reported by Shyu and Hwang (2002) and Elleuch *et al.* (2007). These results demonstrate that the seed used in this work can be considered as a good source of edible oil and proteins.

During the electrical treatments of the seeds the electrical conductivity was measured to calculate the disintegration index when different energies were applied. The results for this analysis are presented in Figure 6.4(a). For both PEF and HVED treatments, the disintegration index increased with the energy input. For all energies, HVED showed a higher disintegration index when compared to PEF, the maximum value (0.759 or 75.9 %) was observed for HVED with an energy input of 240 kJ/kg. Similar disintegration index values were also found by Liu *et al.* (2011) using the same electrical equipment to treat grape seeds with HVED. Also, comparable results were found by Guderjan *et al.* (2007) for PEF treatment of rapeseeds. The disintegration of the sesame seeds could be visually observed during HVED treatments, however, during PEF treatment there were no visual modifications in the product. In addition to conductivity, the temperature was also measured after each electrical treatment. The increase in temperature after application of 240 kJ/kg was of  $29.2 \pm 0.4$  °C and  $18 \pm 2$  °C for PEF and HVED, respectively. An increase in temperature was also observed in the pre-treatment of rapeseeds using PEF for subsequent oil extraction (Guderjan *et al.*, 2007). These increases in temperature can be considered small if compared to the roasting pre-treatment, which is carried out at 100 °C and is often used to increase oil yield (Singh *et al.*, 2002; Pradhan *et al.*, 2011).

Figure 6.4(b) and (c) shows the amount of polyphenols and proteins extracted in the water during electrical treatments with increasing energy inputs. There was an increase in the concentration of both compounds with the applied energy and in all cases the HVED treatment extracted higher amounts of proteins and polyphenols. The diffusion of polyphenols in water during electrical treatments was also observed by Boussetta *et al.* (2012b), which found a higher increase in polyphenols extraction when grape seeds are submitted to HVED than PEF. It is important to point out that, even though some proteins and polyphenols were

extracted in the water, the larger extent of these compounds is still in the cake (as will be shown subsequently).

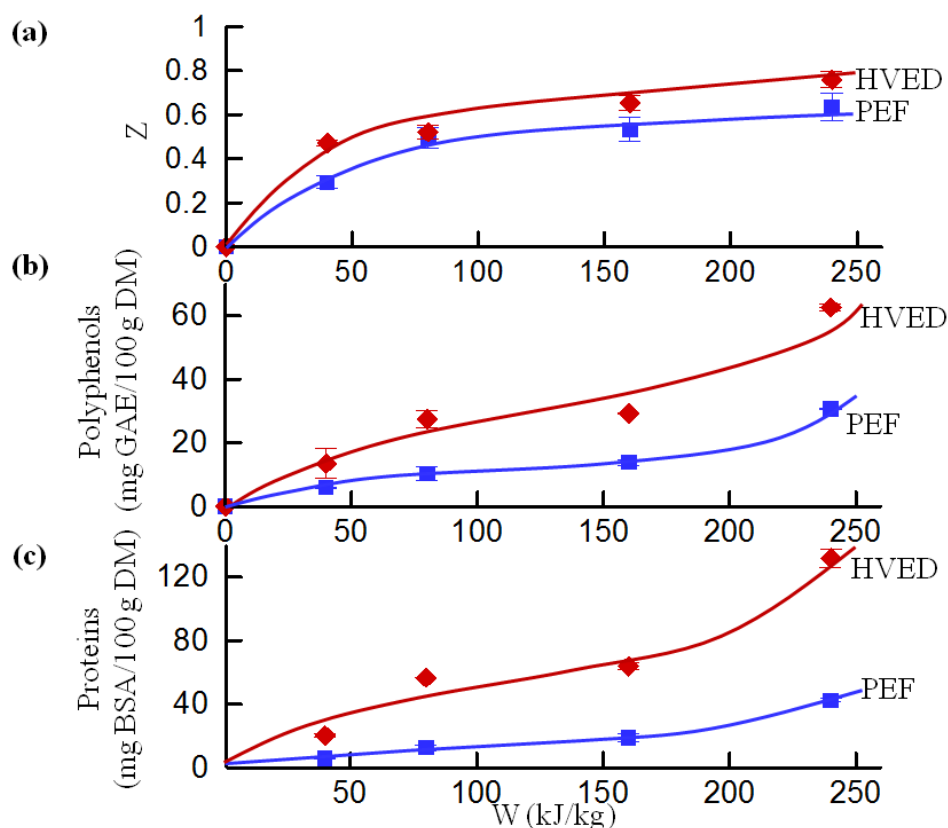


Figure 6.4 – Disintegration index of the sesame seeds (a) and contents in the treatment water of polyphenols (b) and proteins (c) *versus* the energy input for PEF and HVED experiments.

As well as polyphenols and proteins, the turbidity and the percentage of oil lost in the treatment water was also analyzed for all energy inputs. These results are presented in Figure 6.5. In Figure 6.5(a) the results show that the turbidity in the water when samples were treated by HVED is 100 times higher than when PEF was used as a pre-treatment. Visually, it could be observed that the water contained a larger amount of solids (from the seeds disintegration) and of oil. For this reason the water from the HVED treatment was analyzed for oil content (Figure 6.5(b)). No oil was observed in the water used in PEF experiments, thus this water was not analyzed. The data presented in Figure 6.5(b) are only illustrative. The results for HVED demonstrate that, from the total oil content of the seeds, up to  $25.7 \pm 0.3$  % of the oil was lost in the water. These losses significantly influence the oil yield obtained, as will be demonstrated next.

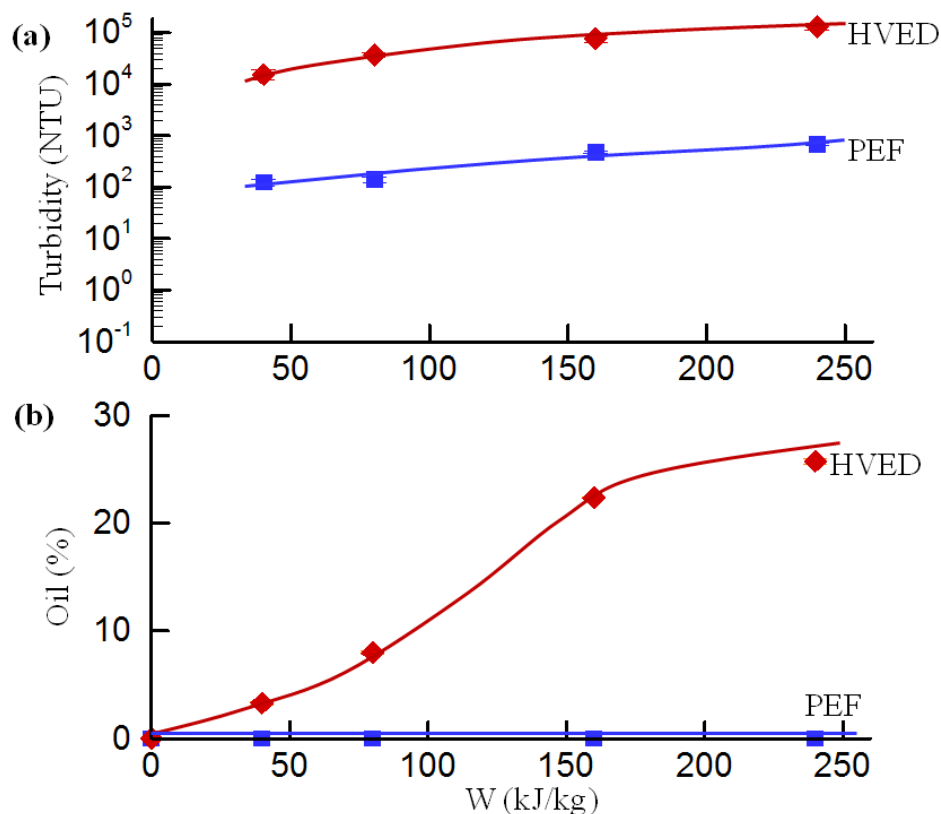


Figure 6.5 – Turbidity of the treatment water (a) and percentage of oil lost in the water (b) *versus* energy input for PEF and HVED experiments.

To better illustrate what has been previously discussed, Figure 6.6 presents photographs of the seeds after each electrical treatment using HVED and drying processes, as well as the corresponding treatment water from the same experiment. Figure 6.6(a) demonstrated the disintegration of the seeds. In the first photograph untreated whole seeds are presented (U). The following pictures show that, gradually, with an increase in the energy applied, seeds begin to be partially crushed and form some agglomerates. The results indicate that this fragmentation of the product can be controlled with the number of discharges. The PEF treated samples do not appear in Figure 6.6 because they did not differ from the control sample for all energies applied; seeds had the same size and aspect throughout the treatments. Previous work performed by Boussetta *et al.* (2012b) with grape seeds demonstrated the same crushing effect of HVED as examined for sesame. In Figure 6.6(b) it is possible to observe the increase in the amount of solids and oil in the water with the increase in energy input, which corroborates with what was previously demonstrated in the water analysis (Figure 6.5).

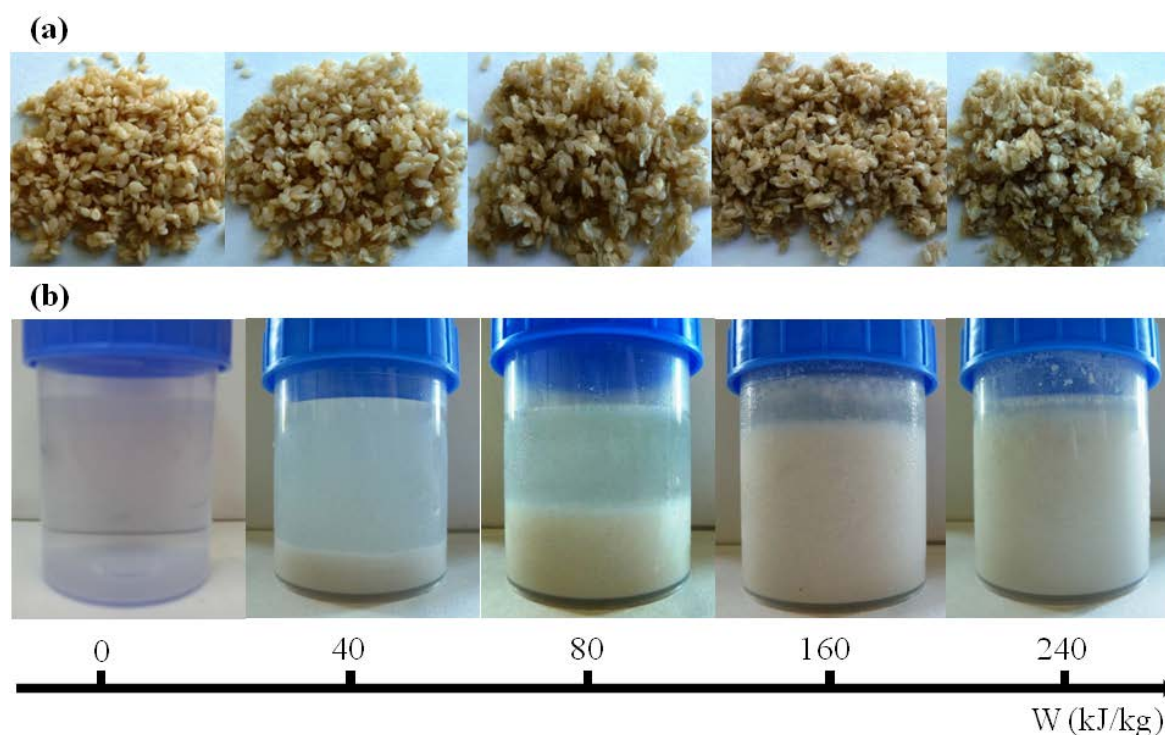


Figure 6.6 – Photographs of the dried cake after application of different HVED energies (a) and treatment water from the same processes (b).

After drying of the electrically treated seeds, pressing experiments were carried out. From these experiments it was possible to calculate the extraction yield and the deformation curves for samples treated by PEF and HVED, grinding (IDG), immersed in water and dried (ID) and untreated (U). Figure 6.7(a) presents the oil yield obtained in the press after all treatments, without considering what was previously lost in water. The results demonstrated that grinding was the best treatment followed by all PEF treatments between 40 and 240 kJ/kg and HVED application in the range of 40 and 80 kJ/kg. These electrical treatments, however, yielded better results than the sample when only immersed and dried, showing a significant effect of the pulses and discharges in the cell membrane and/or wall. The HVED treatment at 160 kJ/kg provides the same oil yield as the ID sample and if 240 kJ/kg are applied the yield is equivalent to what is obtained for the U sample.

Nevertheless, it is very important to take into account how much oil was lost in the water, since these losses were considerably large. Figure 6.7(b) shows the results considering the aforementioned losses. In this figure, the amount of oil lost was added to the press yield obtained for HVED treatments, all the other values are the same as presented in Figure 6.7(a). Carrying out an analysis of variance for the new oil yield values, results show that HVED at

energy input levels between 160 and 240 kJ/kg were the best pre-treatments, significantly better than grinding, which was the second best treatment. Furthermore, all HVED treatment presented superior oil yields than PEF treated seeds. It is important to point out that immersing and drying the sample caused some damage to the seeds that significantly increased the oil extraction. For this reason, this sample should be considered as the control experiment. The best HVED treatment can be one performed at 160 kJ/kg which was able to extract 89.1 % of the total oil. This represents an increase of 22.4 % and 6.6 % when compared to the ID and the IDG samples, respectively. For PEF, the best treatment energy was 40 kJ/kg. In this case the oil yield was 71.6 %, and this value is 4.9 % higher than the yield obtained for the ID seeds and 10.9 % smaller compared to the yield observed for grinded seed.

The PEF effect on the seeds was significant, resulting on better oil yields than that achieved with the immersed and dried seeds. This effect may result from the electroporation suffered by the seeds during this pre-treatment. PEF acts on the cell membrane by forming pores, but does not change the product structure (Vorobiev and Lebovka, 2008). On the other hand, the application of electrical discharges results on the fragmentation of the particles, which significantly increased the oil extraction. As pointed out by Boussetta and Vorobiev (2014), the fragmentation of the seeds during the application of discharges is caused by the propagation of shock waves and explosion of the main cavitation bubble, which generates several small cavitation bubbles. These phenomena damage the seeds and disintegrate cell walls as well as membranes. This occurs only during HVED and not with PEF treatment a consequence of the arc formed during discharges. The higher extraction efficiency of HVED can be linked to the fragmentation due to the arc formation (Boussetta *et al.*, 2013a). It is significant to mention that, even though PEF provided lower oil yields, there are advantages to the application of this technology. Since PEF preserves the product structure, there is no oil loss in the water and, as it has been showed in literature (Boussetta *et al.*, 2012b), PEF could facilitate subsequent separation steps between the solids and the treatment water.

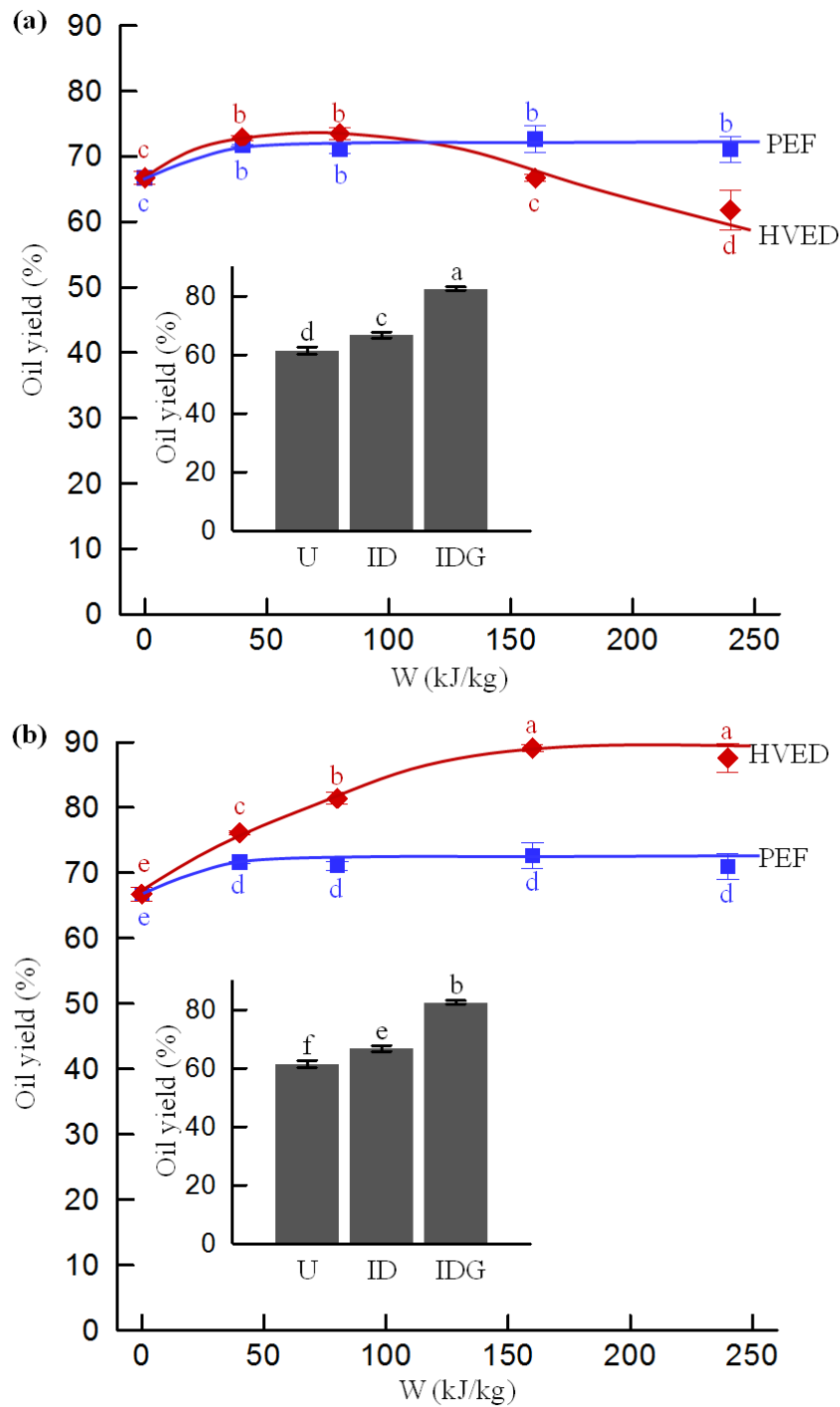


Figure 6.7 – Oil yield for all treatments performed: not considering the oil lost in water (a) and considering the oil lost in water (b). For each treatment, values not sharing a common superscript letter differ significantly at  $p < 0.05$ ; a represents the higher oil yield and f the lowest.

A small number of works were found in literature concerning the extraction of oil from seeds assisted by PEF and, to our present knowledge, no work has been found concerning the effect HVED in this process. The works of Guderjan *et al.* (2005) and

Guderjan *et al.* (2007) evaluated the effect of PEF in plant oils. Guderjan *et al.* (2005) found an increase of 2.9 % in the maize oil extraction when compared to the untreated sample, this increase was obtained using 91.4 kJ/kg and 1 min of treatment. In the oil extraction from olives, the authors found a maximum increase of 7.4 %, using 1.3 kV/cm and 100 pulses. This increase was smaller than the result obtained from froze/thawed samples. However the freezing/thawing process might consume more energy. These results are smaller than what was found in the present study. Studies performed on rapeseed show an increase of 9 % when PEF was applied at 84 kJ/kg in comparison with the untreated sample (Guderjan *et al.*, 2007). This value is higher than what was obtained in this work, but, prior to processing, the rapeseed was soaked and dried and the reference sample was not. For the values found in this study, the increase in oil yield for the application of PEF (40 kJ/kg) when compared to the untreated sample was of 10.2 %.

#### *Deformation curves*

Deformation curves were also obtained with the texture analyzer used in this work, the curves for five different treatments are presented in Figure 6.8. These treatments are U, ID, IDG and the electrical treatments at the maximum energy input applied, 240 kJ/kg. For better visualization of the results, only some curves are presented, the electrically treated samples with the highest disintegration index were chosen for comparison. The figure shows that all deformation curves were very similar, except for the grinded sample (IDG). For this pre-treatment deformation was considerably higher. The behavior of the obtained deformation curves is typical. These curves describe the behavior of the oil extraction, the initial increase in deformation is correlated to the increase in pressure up to 100 bar and extends from the first oil drop up to the maximum oil outflow. Subsequently, a consolidation stage is reached and both pressure and deformation are constant (Gros *et al.*, 2003).

The mechanisms of solid-liquid expression depend on different parameters, such as the rate of deformation, mechanical pressure and structural tissue characteristics (cell size and shape, thickness of the cell wall, etc.) (Grimi *et al.*, 2010b; Mhemdi *et al.*, 2012). It is expected that, if the cell tissue is effectively pre-treated and the majority of cell membranes are destroyed before expression, the tissue will be more permeable for the oil flow. However, the extraparticle pathways, or channels, play an important role in the solid-liquid expression



behavior, independently of the tissue permeability. These interparticle channels are very compressible and can be completely or partly closed during expression, especially in the case of plate-like or very fine particles (Petryk and Vorobiev, 2013). This could possibly explain what is observed in Figure 6.8 for the grinded seeds. The significant effect of grinding in both yield and deformation has been previously perceived for linseed (Gros *et al.*, 2003).

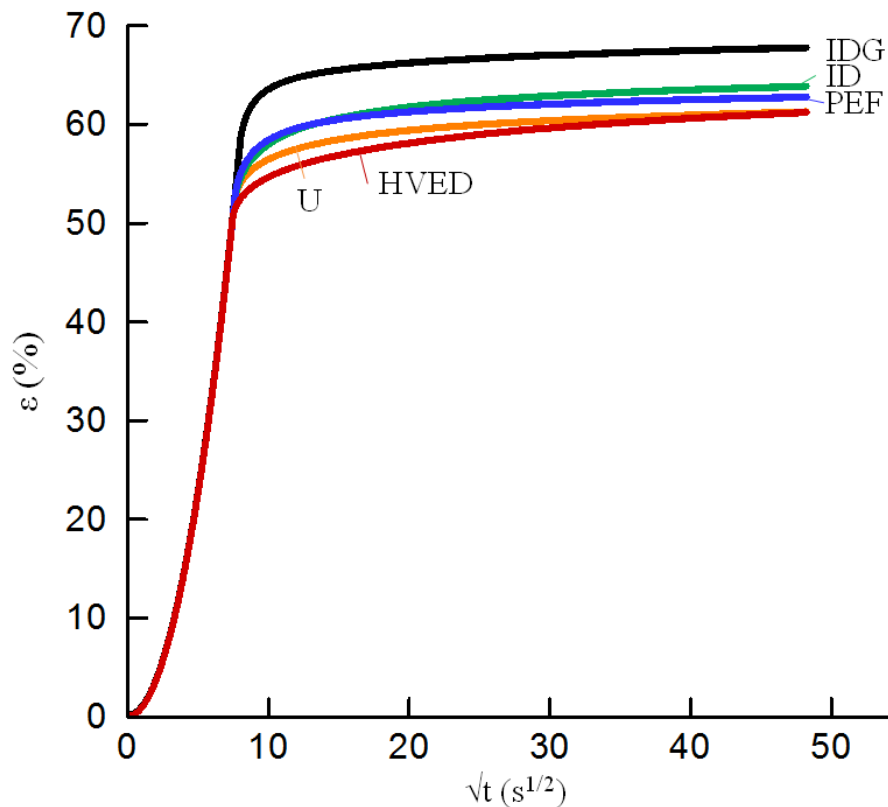


Figure 6.8 – Deformation curves for selected samples: untreated (U), immersed and dried (ID), immersed, dried and grinded (IDG) and PEF and HVED (240 kJ/kg) pre-treated seeds. Deformation ( $\varepsilon$ ) versus the square root of the time.

### *Sesame oil and cake analysis*

It is known that different pre-treatments and extraction process affect the composition and concentration of minor components of the oil. For this reason, three of the treatments carried in this study were analyzed for their lignan profile: untreated, PEF and HVED with an energy input of 40 kJ/kg. The profiles, obtained using HPLC analysis, are shown in Figure 6.9. Two peaks were identified in the oil chromatograms (Figure 6.9). Using the commercial standards, it was possible to identify the presence of sesamin in the oil (Peak (1)), however

sesamol was not detected in the samples. According to literature and the methodology used in the HPLC analysis (Rangkadilok *et al.*, 2010), it is possible to tentatively identify peak (2) as sesamol. The presence of sesamin as the main lignan in sesame oil has been previously found by Rangkadilok *et al.* (2010) and Reshma *et al.* (2010).

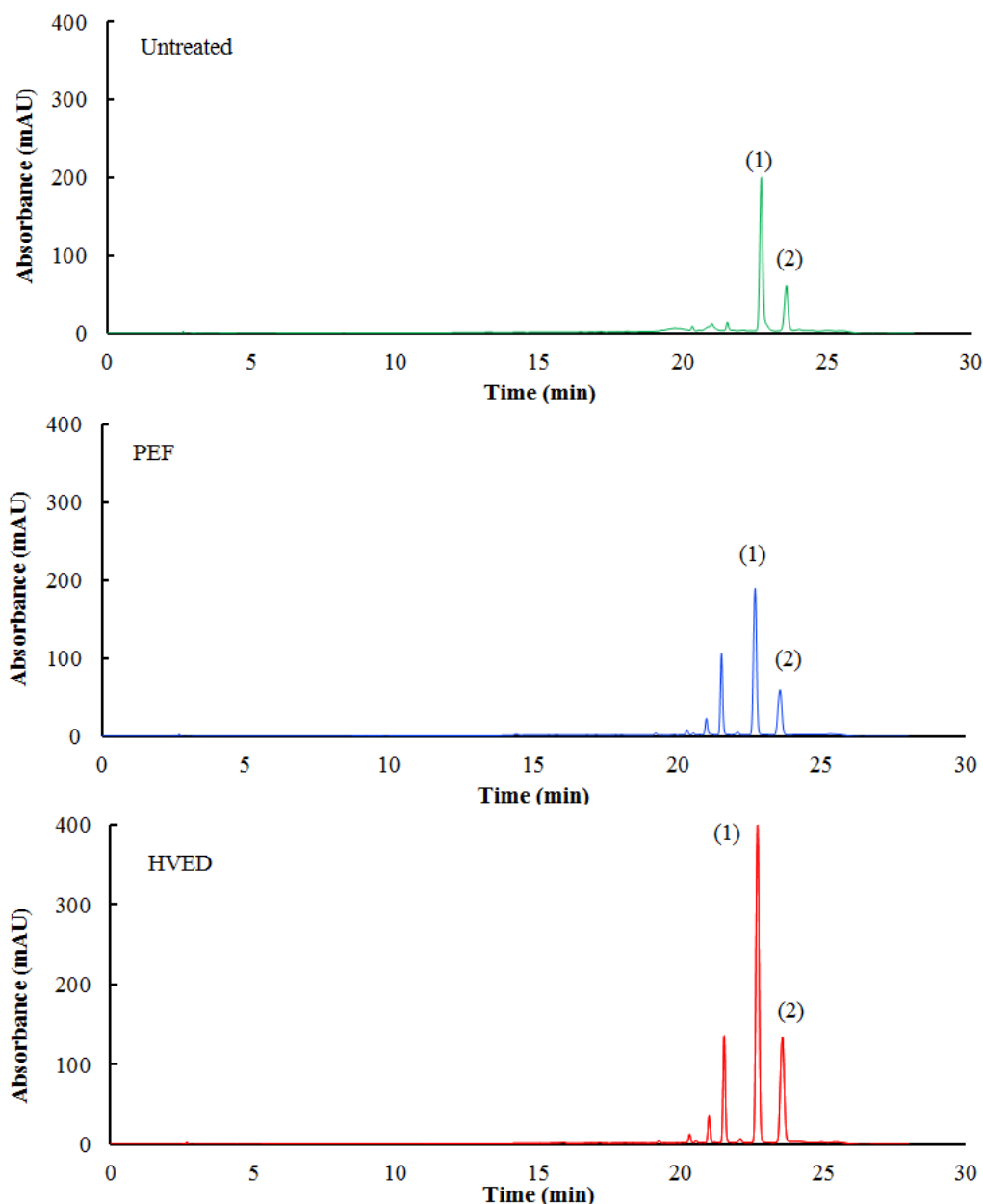


Figure 6.9 – HPLC chromatogram of the sesame oil obtained after pressing from untreated and PEF and HVED pre-treated (40 kJ/kg) seeds. Peak assignment: (1) sesamin and (2) sesamol.

Results clearly show that the lignan profile was not altered by the electrical pre-treatments, showing that the applied pre-treatments are suitable for sesame oil processing. This assessment was important since reactive species (e.g. ozone) generated in the HVED

treatment could react with functional ingredients from the oil, forming different compounds (Boussetta and Vorobiev, 2014). The pre-treatments studied in this work can even improve the retention of sesame oil lignans as their application can eliminate the need for thermal treatment; these compounds have been shown to be very sensitive to heating (Yoshida and Takagi, 1997; Wen-Huey, 2007). Furthermore, literature suggests that seeds pre-treated using PEF can provide oil richer in phytosterols, antioxidants, tocopherols and other functional components (Guderjan *et al.*, 2005; Guderjan *et al.*, 2007).

Finally, the total protein and polyphenols content in the cake from the untreated seeds were analyzed. The grinding and extraction of these compounds revealed the presence of 11800 ( $\pm 70$ ) mg BSA/100 g DM of proteins and 650 ( $\pm 20$ ) mg GAE/100 g DM of polyphenols. The maximum amounts of proteins and polyphenols extracted in the treatment water were, respectively 62.6 and 131.9 mg/100 g of sesame, extracted in the HVED treatment using 240 kJ/kg. These results demonstrate that the maximum lost of proteins was of 1.1 % and for polyphenols, 9.6 %. The data suggests that the cake can still be considered rich in these components, even after extensive electrical pre-treatments. It is thus possible to consider a subsequent valorization of the cake by the extraction of its valuable compounds.

#### **6.2.4 Conclusions**

The present work demonstrated that both pre-treatments, pulsed electric fields and high voltage electrical discharges, efficiently damaged sesame cells; this damage increased with the applied energy input. There was also an increase in the oil extraction with energy up to certain values, for PEF and HVED. The modifications caused in the seeds by the treatments significantly raised the oil yield when compared to a control sample. However, for HVED treated seeds, the oil loss in the water used for the electrical treatment was noteworthy and, therefore, the recovery of this oil in water should be investigated. The lignan profile of the sesame oil obtained from all analyzed treatments showed the presence of sesamin and sesamol and demonstrated that the electrical treatment did not alter this profile. The increases in oil expression reduced the amount of cake produced, but still it is important to point out, that the obtained cake was rich in proteins and polyphenols. The technologies proposed in this study can be suitable and efficient alternatives to be used as pre-treatments

prior to oil extraction and the results of this work are valuable for the scale-up process of these technologies.

### 6.3 Referências

- AOAC, A. O. O. A. C. *Official method of analysis of aoac*. Allentown, Washington D. C. 1990
- ARAÚJO, A. E. D., SOARES, J. J., BELTRÃO, N. E. D. M. e FIRMINO, P. D. T. *Cultivo do gergelim*. EMBRAPA. Campina Grande, Paraíba. 2006
- BOUSSETTA, N., LESANT, O. e VOROBIEV, E. A study of mechanisms involved during the extraction of polyphenols from grape seeds by pulsed electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.19, p.124-132. 2013.
- BOUSSETTA, N. e VOROBIEV, E. Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*. 2014.
- BOUSSETTA, N., VOROBIEV, E., LE, L. H., CORDIN-FALCIMAIGNE, A. e LANOISELLÉ, J. L. Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, v.46, n.1, p.127-134. 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.
- ELLEUCH, M., BESBES, S., ROISEUX, O., BLECKER, C. e ATTIA, H. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry*, v.103, n.2, p.641-650. 2007.
- FAO. Faostat. <http://www.fao.org>: Food and Agricultural Organization of the United States 2011.
- FUKUDA, Y., NAGATA, M., OSAWA, T. e NAMIKI, M. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil, and the effect of using the oil for frying. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.50, n.4, p.857-862. 1986.
- GRIMI, N., VOROBIEV, E., LBOVKA, N. e VAXELAIRE, J. Solid-liquid expression from denaturated plant tissue: Filtration-consolidation behaviour. *Journal of Food Engineering*, v.96, n.1, p.29-36. 2010.
- GROS, C., LANOISELLE, J. L. e VOROBIEV, E. Towards an alternative extraction process for linseed oil. *Chemical Engineering Research & Design*, v.81, n.A9, Oct, p.1059-1065. 2003.
- GUDERJAN, M., ELEZ-MARTÍNEZ, P. e KNORR, D. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.8, n.1, p.55-62. 2007.
- GUDERJAN, M., TÖPFL, S., ANGERSBACH, A. e KNORR, D. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering*, v.67, n.3, p.281-287. 2005.
- HEMALATHA, S. e GHAFLOORUNISSA. Sesame lignans enhance the thermal stability of edible vegetable oils. *Food Chemistry*, v.105, n.3, p.1076-1085. 2007.

- HIRATA, F., FUJITA, K., ISHIKURA, Y., HOSODA, K., ISHIKAWA, T. e NAKAMURA, H. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis*, v.122, n.1, p.135-136. 1996.
- HWANG, L. S. Sesame oil. In: F. Shahidi (Ed.). *Bailey's industrial oil and fat products*. Hoboken: John Wiley & sons, 2005. Sesame oil, p.537-576
- JAEGER, H., BALASA, A. e KNORR, D. Food industry applications for pulsed electric fields. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 2008. Food industry applications for pulsed electric fields, p.181-216. (Food engineering series)
- KAMAL-ELDIN, A. e APPELQVIST, L.-A. The effects of extraction methods on sesame oil stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.72, n.8, p.967-969. 1995.
- LEMCKE-NOROJÄRVI, M., KAMAL-ELDIN, A., APPELQVIST, L. Å., DIMBERG, L. H., ÖHRVALL, M. e VESSBY, B. Corn and sesame oils increase serum  $\gamma$ -tocopherol concentrations in healthy swedish women. *Journal of Nutrition*, v.131, n.4, p.1195-1201. 2001.
- LIU, D., VOROBIEV, E., SAVOIRE, R. e LANOISELLÉ, J.-L. Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v.81, n.2, p.134-140. 2011.
- MHEMDI, H., BALS, O., GRIMI, N. e VOROBIEV, E. Filtration diffusivity and expression behaviour of thermally and electrically pretreated sugar beet tissue and press-cake. *Separation and Purification Technology*, v.95, n.0, p.118-125. 2012.
- NAMIKI, M. The chemistry and physiological functions of sesame. *Food Reviews International*, v.11, n.2, 1995/05/01, p.281-329. 1995.
- PETRYK, M. e VOROBIEV, E. Numerical and analytical modeling of solid-liquid expression from soft plant materials. *AIChE Journal*, v.59, n.12, p.4762-4771. 2013.
- PRADHAN, R. C., MISHRA, S., NAIK, S. N., BHATNAGAR, N. e VIJAY, V. K. Oil expression from jatropha seeds using a screw press expeller. *Biosystems Engineering*, v.109, n.2, p.158-166. 2011.
- RANGKADILOK, N., PHOLPHANA, N., MAHIDOL, C., WONGYAI, W., SAENGSOOKSREE, K., NOOKABKAEW, S. e SATAYAVIVAD, J. Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*sesamum indicum* L.) seeds and oil products in thailand. *Food Chemistry*, v.122, n.3, p.724-730. 2010.
- RESHMA, M. V., BALACHANDRAN, C., ARUMUGHAN, C., SUNDERASAN, A., SUKUMARAN, D., THOMAS, S. e SARITHA, S. S. Extraction, separation and characterisation of sesame oil lignan for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, v.120, n.4, p.1041-1046. 2010.
- SAVOIRE, R., LANOISELLE, J. L. e VOROBIEV, E. Mechanical continuous oil expression from oilseeds: A review. *Food and Bioprocess Technology*, v.6, n.1, Jan, p.1-16. 2013.
- SHAHIDI, F., LIYANA-PATHIRANA, C. M. e WALL, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, v.99, n.3, p.478-483. 2006.
- SHAHIDI, F. e NACZK, M. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2004
- SHYU, Y.-S. e HWANG, L. S. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted burma black sesame meal. *Food Research International*, v.35, n.4, p.357-365. 2002.
- SINGH, K. K., WIESENBERN, D. P., TOSTENSON, K. e KANGAS, N. Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.79, n.2, 2002/02/01, p.165-170. 2002.

- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R. e LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: L. Packer (Ed.). *Oxidants and antioxidants - part a*. San Diego: Academic Press Inc., v.299, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, p.152-178
- VOROBIEV, E. e LEOVKA, N. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer, 2008. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications, p.39-81. (Food engineering series)
- VOROBIEV, E. e LEOVKA, N. I. Pulse electric field-assisted extraction. In: (Ed.). *Enhancing extraction processes in the food industry*: CRC Press, 2011. Pulse electric field-assisted extraction, p.25-84. (Contemporary food engineering)
- WEN-HUEY, W. The contents of lignans in commercial sesame oils of taiwan and their changes during heating. *Food Chemistry*, v.104, n.1, p.341-344. 2007.
- WILLEMS, P., KUIPERS, N. J. M. e DE HAAN, A. B. Hydraulic pressing of oilseeds: Experimental determination and modeling of yield and pressing rates. *Journal of Food Engineering*, v.89, n.1, p.8-16. 2008.
- YOSHIDA, H. e TAKAGI, S. Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*sesamum indicum*) oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.75, n.1, p.19-26. 1997.
- ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. e RIEMANN, F. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal*, v.14, n.11, p.881-899. 1974.

## CAPÍTULO 7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira parte desse trabalho teve como objetivo comparar oito diferentes tortas de sementes e nozes provenientes da produção de óleo comestível através da avaliação do seu teor de compostos fenólicos e da sua atividade antioxidante. As tortas avaliadas foram as de linhaça, gergelim, semente de abóbora, semente de girassol, amêndoa, avelã, macadâmia e noz pecã. Foram obtidos teores de compostos fenólicos entre 51 e 690 mg EAG/100 g e de flavan-3-óis entre 1,4 e 180 mg EE/100 g. A torta de noz pecã apresentou as maiores quantidades para estes compostos fenólicos, seguida pelas tortas de semente de girassol e de avelã, que também se mostraram ricas em compostos fenólicos. Não foi possível a quantificação dos fenólicos totais nas tortas de semente de abóbora e de amêndoa e os teores de flavan-3-óis das tortas de semente de abóbora e de gergelim ficaram abaixo do limite de quantificação. Taninos condensados foram encontrados nas tortas de noz pecã e avelã, sendo que a primeira apresentou quantidade maior destes compostos. As tortas de semente de girassol, avelã e noz pecã apresentaram quantidades detectáveis de flavonoides, sendo que a última, novamente, apresentou o maior teor destes compostos. Através da metodologia de HPLC, foram detectados diferentes compostos fenólicos nas tortas de girassol, noz pecã e gergelim. O ácido clorogênico foi identificado na torta de semente de girassol, catequina, epicatequina e ácido elágico foram detectados na torta de noz pecã e sesamol e sesamina foram encontrados na torta de gergelim.

Os extratos de noz pecã, avelã e semente de girassol tiveram os maiores efeitos na captura dos radicais DPPH e ABTS, além de terem os maiores valores de poder redutor. A avaliação dos coeficientes de determinação demonstrou uma forte correlação entre o teor de

fenólicos totais e de flavan-3-óis com a atividade antioxidante dos extratos quando analisados pela metodologia de captura do radical ABTS e do poder redutor. Os resultados obtidos nesse capítulo do trabalho permitiram uma comparação entre diferentes subprodutos da produção de óleo a fim de se compreender quais as possíveis aplicações dos mesmos.

Para continuação do trabalho foi escolhida a torta de gergelim. Apesar de não ter sido a que apresentou um alto teor de compostos fenólicos ou a maior atividade antioxidante. Essa torta é rica em glicosídeos de lignanas, compostos que têm despertado um grande interesse da indústria devido às suas propriedades nutracêuticas. Além disso, o volume de óleo de gergelim produzido mundialmente é bastante alto, o que faz com que o aproveitamento desse subproduto seja ainda mais relevante.

A segunda etapa do trabalho, apresentada no Capítulo 4, teve como objetivo avaliar as melhores condições para extração de compostos fenólicos do gergelim. Os experimentos revelaram que o principal componente da torta de gergelim é o sesaminol triglicosídeo. A quantidade de fenólicos totais extraída ficou entre 129,7 e 355,3 mg EAG/100 g. Para a sesamina, foram extraídas quantidades entre 3,2 e 25,7 mg/100 g. O teor de sesaminol triglicosídeo obtido ficou entre 208,1 e 537,5 mg ES por 100 g de torta e, por fim, a atividade antioxidante dos extratos variou entre 8460 e 24311  $\mu$ M ET.

O planejamento experimental utilizado foi satisfatório para a otimização das condições de extração dos compostos fenólicos totais, sesamina e sesaminol triglicosídeo da torta de gergelim. Os modelos polinomiais de segunda ordem obtidos a partir desse planejamento explicaram uma porcentagem razoável das variações nas respostas. A concentração de etanol e a razão sólido-solvente foram os fatores mais importantes influenciando o rendimento da extração, enquanto a temperatura teve uma influência menor. Este estudo inicial demonstrou que a torta de gergelim pode ser considerada uma fonte de glicosídeos de lignanas. As análises realizadas nessa etapa do trabalho auxiliaram no entendimento do comportamento desses compostos em diferentes condições de processo.

O Capítulo 5 apresentou a avaliação do uso de tecnologias alternativas na extração de proteínas, glucosídeos de lignanas e compostos fenólicos da torta não desengordurada de gergelim. Essas tecnologias foram aplicadas como um pré-tratamento antes do processo de extração com solvente. Inicialmente, observou-se que a aplicação de 83 kJ/kg teve um efeito bastante significativo nos compostos a serem estudados. Dessa forma, não foi necessária a



aplicação de valores mais altos de energia. O teor de compostos fenólicos extraídos nas diferentes condições de processo variou entre 54,3 e 440,3 mg EAG/100 g. Para a principal lignana encontrada no gergelim, as quantidades extraídas ficaram entre 63,9 e 242,9 mg ES/100 g. Os extratos contendo proteína apresentaram concentrações entre 374 e 2001 mg BSA/100 g.

Quando comparadas as diferentes tecnologias aplicadas nesse trabalho para extração de compostos da torta de gergelim (Capítulo 5), pode-se dizer de forma geral que as duas tecnologias foram mais eficazes quando comparadas a amostra controle (sem pré-tratamento). Entre as metodologias utilizadas, as DEAT tiveram um efeito mais pronunciado se comparado ao CEP. Para as concentrações de etanol estudadas, a solução aquosa com 10 % etanol (m/m) foi a que apresentou os melhores resultados para extração de compostos fenólicos e a de 50 % etanol (m/m) para a extração de glucosídeos de lignanas. Ainda, na faixa de temperaturas estudada, 60 °C se mostrou mais eficiente para a extração de polifenóis e 40 °C para proteínas. O cálculo da difusividade mássica demonstrou que o efeito dos pré-tratamentos elétricos é significativo para todos os compostos analisados. Entretanto, esse efeito diminui com o aumento da temperatura.

Nos experimentos dessa etapa do trabalho, conforme já mencionado, foi usada a torta com gordura residual, pois não foi feito o processo de desengorduramento com hexano como nos experimentos anteriores. Essa diferença dificulta a comparação direta entre os dados apresentados nos Capítulos 4 e 5, que avaliaram os parâmetros do processo de extração do gergelim. Entretanto, é possível destacar algumas relações entre os dois estudos.

De forma geral, os valores para fenólicos totais e glucosídeos de lignanas é menor no segundo estudo (Capítulo 5). Entretanto, deve se levar em consideração que quando são expressas as quantidades por 100 g de produto, o produto usado no primeiro estudo (Capítulo 4) é bem mais concentrado, pois já foi retirada a gordura residual. A presença de gordura na torta afetou também os cromatogramas de análise de glucosídeos de lignanas, onde o pico principal (considerado como o principal glucosídeo de lignana), observado claramente na análise do primeiro estudo, está menos destacado no segundo estudo e vários interferentes são observados. Além disso, esse pico só foi detectado quando usadas concentrações maiores de etanol.

As condições ideais para extração, mesmo quando comparadas as amostras sem tratamento, diferem ligeiramente. As melhores concentrações de etanol variam se comparados os dois resultados. Porém, em ambos os casos, compostos fenólicos são extraídos com porcentagens menores de etanol do que as lignanas. Por fim, o efeito da temperatura, que não foi significativo nos experimentos do com a torta desengordura, foi bastante expressivo para a torta usada no segundo estudo (Capítulo 5). Essa diferença se deve, possivelmente, à desnaturação sofrida pelas células no processo de desengorduramento. O grau de dano que já havia sido sofrido nessa etapa, faz com que o efeito da temperatura fosse pouco expressivo. Entretanto, em uma amostra de torta intacta, o uso de diferentes temperaturas foi mais pronunciado.

O Capítulo 6 apresentou um estudo da aplicação das tecnologias de CEP e DEAT como pré-tratamentos na extração de óleo das sementes de gergelim. Essa etapa do trabalho visa avaliar o desempenho da aplicação desses métodos em uma etapa anterior a obtenção da torta de gergelim, a fim de minimizar a geração desse resíduo. A pesquisa demonstrou um efeito significativo dos tratamentos e um aumento na quantidade de óleo extraído com o aumento da energia aplicada às sementes. O uso de DEAT (160 kJ/kg) gerou um aumento na quantidade de óleo extraído de 22,4 % se comparado a amostra controle e de 6,6 % se comparado a amostra moída. Para o CEP (40 kJ/kg), o rendimento da extração foi 5 % maior do que o controle, entretanto esse rendimento foi menor do que o obtido usando a moagem como pré-tratamento.

As conclusões gerais do presente trabalho são apresentadas a seguir.

- (i) As tortas de semente e nozes são boas fontes de compostos bioativos e têm, em sua maioria, atividade antioxidante significativa. A extração de substâncias de interesse desses subprodutos pode agregar valor a ele, melhorando suas possibilidades de aproveitamento.
- (ii) A torta, ou farinha, de gergelim é rica em glucosídeos de lignanas. Esses compostos podem ser extraídos pela técnica clássica de forma eficaz, entretanto é necessária a utilização de solventes orgânicos adequados. Solventes esses, que devem ser removidos na utilização dos extratos para consumo humano.
- (iii) A aplicação de CEP e DEAT aumenta a eficiência da extração de proteínas e compostos fenólicos da torta de gergelim. Essas tecnologias podem reduzir o tempo de processo e o uso de solventes tóxicos e altas temperaturas. Nesse contexto, podem ser

consideradas tecnologias alternativas de grande potencial e que reduzem o consumo energético geral da extração.

- (iv) A geração de torta de gergelim pode ser minimizada através da utilização de processos que melhorem a eficiência da extração de óleo. As tecnologias de CEP e DEAT agem sobre as sementes modificando a sua estrutura e, dessa forma, facilitam a etapa de prensagem e mais óleo é extraído.

### **7.1 Sugestões para trabalhos futuros**

Algumas sugestões para trabalhos futuro e possíveis continuações desse trabalho são apresentadas a seguir.

Estudar mais profundamente as tortas das nozes e sementes, que abordadas no Capítulo 3. Cada uma dessas tortas é uma potencial fonte de compostos de alto valor nutricional. Além dessas, outras nozes e sementes, amplamente cultivadas no Brasil, se destacam pela riqueza em nutrientes e potencial econômico.

Avaliar, ainda, alguns outros parâmetros do processo de extração que não foram contemplados nesse estudo. Entre esses pode ser citado o estudo de diferentes faixas de pH, que tem efeito significativo na hidrólise das lignanas e das proteínas da torta de gergelim. Outra possível expansão do atual estudo é a análise de parâmetros cinéticos e a realização de experimentos para determinação do coeficiente de difusividade dos compostos quando aplicadas as tecnologias de CEP e DEAT. O beneficiamento da torta de gergelim poder ser melhorado ainda mais, com o desenvolvimento de um fluxograma que permita a total separação entre os compostos fenólicos da torta e as proteínas. Sendo que, as proteínas podem ser extraídas para elaboração de um isolado proteico ou mantidas na torta, que pode se tornar um concentrado proteico.

Por fim, a continuação dos estudos envolvendo tecnologias elétricas na extração de óleo é de grande interesse. Os resultados mostram que futuras pesquisas devem envolver a otimização da aplicação de descargas elétricas a fim de minimizar o uso de água ou a perda de óleo nesse meio. Além disso, podem ser realizadas análises da presença de compostos de

interesse nos óleos obtidos. Com esses dados, é possível avaliar a influência dos tratamentos usados, não só na eficiência da extração, mas também na qualidade dos óleos.