



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – UnB/FCE
CURSO DE FARMÁCIA

ANDRÉA SAMARA DA SILVA MORAES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO FLUIDO A PARTIR DE
RESÍDUOS DE OLEAGINOSAS**

BRASÍLIA

2018

ANDRÉA SAMARA DA SILVA MORAES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO FLUIDO A PARTIR DE
RESÍDUOS DE OLEAGINOSAS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Dra. Simone Mendonça

Co-orientadora: Profa. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MMS27a Moraes, Andréa Samara da Silva
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO FLUIDO A PARTIR DE
RESÍDUOS DE OLEAGINOSAS. / Andréa Samara da Silva Moraes;
orientador Simone Mendonça; co-orientador Livia Cristina Lira
de Sá Barreto. -- Brasília, 2018.
55 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. Resíduos agroindustriais . 2. Atividade antioxidante.
3. Casca da semente do algodão. 4. Casca da soja. 5.
Extratos. I. Mendonça, Simone, orient. II. Barreto, Livia
Cristina Lira de Sá, co-orient. III. Título.

ANDREA SAMARA DA SILVA MORAES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO FLUIDO A PARTIR DE
RESÍDUOS DE OLEAGIOSAS**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Simone Mendonça

(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Agroenergia)

Dra. Patrícia Abrão de Oliveira

(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Agroenergia)

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris

(Universidade de Brasília – UnB/ Faculdade de Ceilândia - FCE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria do Rosário de Fátima da Silva Moraes (*in memoriam*) e José Maria Ferreira de Moraes simplesmente por serem os meus pais, pelo amor, carinho, dedicação e por todos os ensinamentos a mim concedidos durante toda a minha vida. Este trabalho é dedicado a vocês.

À Universidade de Brasília, em especial ao departamento de Assistência Estudantil por todos os auxílios a mim concedidos durante esses 5 anos, sem isso eu não teria como chegar até aqui.

A todos os amigos e professores da Faculdade de Ceilândia, em especial as Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi e Profa. Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto por todos os ensinamentos, projetos de iniciação científica, amizade e por sempre estarem ao lado dos seus alunos ajudando-os.

Agradeço as minhas orientadoras, Dra. Simone Mendonça e Profa. Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto pelo apoio e dedicação na realização deste trabalho.

A todos da Embrapa Agroenergia, em especial a Dra. Patrícia Abrão de Oliveira pela oportunidade de fazer parte do grupo Agroextrat e permitir o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos analistas do LQB (Laboratório de Química de Biomassas e Biocombustíveis), Raquel Campanha e José Antônio por todos os treinamentos, ensinamentos e pela paciência durante todo o processo.

E por fim, agradeço a Paula Osorio Carmona pela ajuda com a análise estatística dos resultados. Muito obrigada!!

“As raízes da educação são amargas,
mas o fruto é doce.”

Aristóteles

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extrato fluido a partir de resíduos de casca de soja (CS) e casca de sementes de algodão (CSA) com o intuito de desenvolver novas formas de obtenção de metabólitos secundários de plantas com propriedades antioxidantes de interesse industrial. Foram comparadas a extração por maceração com e sem agitação, protegida ou não da luz, utilizando uma proporção de 1:10 resíduo:solvente. Os macerados foram submetidos à caracterização para determinação do teor de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante, através das metodologias de sequestro de radical livre (DPPH e ABTS) e teste de estabilidade oxidativa através do aparelho Rancimat. Testes estatísticos de comparação de médias e análise de correlação foram realizados com auxílio do software R Core Team (2013) e GraphPadPrism®. Os resultados obtidos para o teor de fenóis totais para a CSA variaram de $95,79 \pm 9,27$ a $188,51 \pm 3,94$ mg EAG/ g de extrato seco, enquanto para a casca da soja a variação foi de $23,74 \pm 4,02$ a $30,51 \pm 1,55$ mg EAG/ g de extrato seco. No entanto, não foram detectados flavonoides totais em ambos os resíduos com o método empregado. Para o método de DPPH os resultados obtidos para a casca da semente do algodão tiveram variação de $183,4 \pm 15,91$ a $335,6 \pm 19,84$ μ M equivalente de Trolox/ g de extrato. Para o ABTS os valores foram de $103,1 \pm 6,37$ a $207,6 \pm 21,23$ μ M TEAC/ g de extrato. As cascas da soja apresentaram atividade antioxidante abaixo do limite detectado pela curva padrão de Trolox. Para o ensaio realizado no aparelho Rancimat, o tempo de inibição da oxidação lipídica não teve diferença significativa do controle para o extrato da casca de soja, enquanto para as cascas da semente do algodão o macerado produzido por maceração dinâmica apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle. Segundo a análise de correlação, a quantidade fenóis totais apresentou forte correlação positiva com DPPH, ABTS e Rancimat para a casca da semente do algodão.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Atividade Antioxidante. Casca da semente do algodão. Casca da soja. Extratos.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of fluid extract from residuals of soybean hulls (CS) and cotton seed hulls (CSA) to develop new forms of production of secondary metabolites plants with antioxidant properties of industrial interest. The maceration extraction was compared with and without agitation, protected or not of light, using a ratio of 1:10: solvent residue. The muddled underwent characterization for determination of total phenols, flavonoids and antioxidant activity, through the kidnapping of free radical methodologies (DPPH and ABTS) and oxidative stability test through the appliance Rancimat. Statistical tests for the comparison of means and correlation analysis were carried out with the aid of software R Core Team (2013) and GraphPadPrism ®. The results obtained for the total phenols content for CSA ranged from 95.79 ± 9.27 to 188.51 ± 3.94 mg EAG/g dry extract, while the shell of soybeans variation was 23.74 ± 4.02 to 30.51 ± 1.55 mg EAG/g dry extract. However, total flavonoids were not detected in either the waste with the method employed. For the DPPH method the results obtained for the cotton seed shell had variation 183.4 ± 15.91 to 335.6 ± 19.84 μ M Trolox equivalent/g of extract. For the ABTS the values were of 103.1 ± 6.37 to 207.6 ± 21.23 μ M TEAC/g of extract. The shells of soy showed antioxidant activity below the limit detected by Trolox standard curve. For the test carried out in the Rancimat apparatus the inhibition of lipid oxidation time had no significant difference from control to the shells, while soybeans to cotton seed hulls the macerated produced by maceration introduced dynamic difference significant ($p < 0.05$) when compared to the control. According to the correlation analysis the amount total phenolics showed strong positive correlation with DPPH, ABTS and Rancimat for cotton seed shell.

Keywords: Agro-waste Antioxidant Activity. Cotton seed shell. Soy shell. Extracts.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resíduos como fontes naturais de antioxidantes	21
Tabela 2. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas para a semente da casca de algodão.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Percentual de participação de cada fonte de matéria-prima utilizada na produção de biodiesel, desde o início da obrigatoriedade da adição de biodiesel no diesel. Fonte/Elaboração: ANP/ABIOVE – Coordenadoria de Economia e Estatística. 19
- Figura 2.** Resíduos agroindustriais, cascas da semente de algodão (A), e cascas da soja (B). 27
- Figura 3.** Ilustração do processo de maceração dinâmica em banho metabólico tipo Dubnoff recíprocante, com (A) e sem exposição à luz ambiente (B). 29
- Figura 4.** Esquematização do processo de obtenção dos extratos secos para os diferentes resíduos vegetais em estudo. 29
- Figura 5.** Extrator Acelerado por Solvente (ASE 350), Thermo Scientific, USA. 31
- Figura 6.** Placa de 96 pontos contendo a curva de calibração de Trolox, cada coluna representa uma concentração diferente (80-480 μM). 34
- Figura 7.** Placa de 96 pontos contendo a curva de calibração de Trolox com 9 pontos (10-300 μM), cada coluna representa uma concentração diferente. 35
- Figura 8.** Aparelho Rancimat 873 (Metrohm, EUA). 36
- Figura 9.** Rendimento da extração (%) a partir dos resíduos agroindustriais, casca da semente do algodão (CSA) e cascas da soja (CS). 37
- Figura 10.** Teor de extrativos (%) do resíduo agroindustrial da casca da semente do algodão obtidos por extração acelerada por solvente (ASE) com as variações dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL). 38
- Figura 11.** Teor de extrativos (%) do resíduo agroindustrial da casca da soja obtidos por extração acelerada por solvente (ASE) com as variações dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL). 39

Figura 12. Concentração de fenólicos totais (mg EAG/ g de extrato seco) nos extratos do resíduo da casca da semente de algodão obtidos pelas macerações dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL).	40
Figura 13. Concentração de fenólicos totais (mg EAG/ g de extrato seco) nos extratos do resíduo das cascas da soja obtidos pelas macerações: dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL).....	41
Figura 14. Rendimento de fenóis totais/g de extrato seco das amostras de cascas da semente de algodão (CSA) e cascas de soja (CS).	42
Figura 15. Cinética da inibição do radical DPPH pelo extrato metanólico da casca da semente do algodão em diferentes concentrações.	44
Figura 16. Cinética da inibição do radical DPPH pelo extrato metanólico da casca da soja em diferentes concentrações.....	45
Figura 17. Atividade antioxidante da casca da semente do algodão obtido por maceração dinâmica sem exposição à luz (DSL), com exposição à luz (DCL), e maceração estática sem exposição à luz (ESL) e com exposição à luz (ECL), pelo método DPPH na concentração de 0,3 mg/mL por 180 minutos.....	46
Figura 18. Atividade antioxidante expressa em equivalente de trolox ($\mu\text{M TEAC/ g}$ de extrato seco) nos extratos do resíduo das cascas da semente de algodão obtidos por maceração com as variações dinâmica sem luz (DSL), dinâmica com luz (DCL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL), pelo método de ABTS.....	47
Figura 19. Inibição da oxidação lipídica (h) para os extratos da casca da semente do algodão..	48
Figura 20. Inibição da oxidação lipídica (h) para os extratos da casca da semente do algodão..	49

LISTA DE SIGLAS

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais

ABTS – 2,2-Azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato

CNPE – Conselho Nacional de Política Energética

CSA – Cascas da semente de algodão

CS – Cascas da soja

DCL – Dinâmica sem luz

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DSL – Dinâmica sem luz

EAG – Equivalente em ácido gálico

ECL – Estática com luz

ESL – Estática sem luz

FRAP – ferric reducing antioxidant power

nm - Nanômetro

ORAC – Oxygen Radical Absorbancy Capacity

TEAC - Capacidade Antioxidante equivalente em TROLOX

TROLOX – 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1. Cenário do biodiesel no brasil e o uso de oleaginosas	17
2.2. Resíduos como fontes de antioxidantes naturais	19
2.3. Compostos bioativos de interesse industrial	22
2.4. Métodos de determinação da atividade antioxidante	22
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. Justificativa	26
5. Material e métodos	27
5.1. COLETA E PREPARO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS:	27
5.2. Preparação dos extratos	28
5.2.1. MACERAÇÃO DINÂMICA E ESTÁTICA, COM E SEM EXPOSIÇÃO À LUZ:	28
5.3. Teor de extrativos	30
5.4. Caracterização dos extratos	33
5.4.1. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	33
5.4.2. Quantificação de flavonoides totais	33
5.5. Determinação da atividade antioxidante	33
5.5.1. DPPH	33
5.5.2. ABTS	35

5.6. Estabilidade oxidativa em aparelho Rancimat -----	35
5.7. Análises Estatísticas -----	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	37
6.1. Rendimento das Extrações -----	37
6.1.2. Teor de Extrativos -----	38
6.2. Quantificação de Fenóis e Flavonoides Totais-----	39
6.3. Avaliação da atividade antioxidante-----	43
6.3.1. DPPH-----	43
6.3.2. ABTS -----	47
6.4. Estabilidade oxidativa em aparelho Rancimat -----	48
6.5. Análise de Correlação -----	50
7. CONCLUSÃO -----	51
8. REFERÊNCIAS -----	52

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, extratos fluidos são preparações líquidas obtidas de drogas vegetais ou animais por extração com um líquido apropriado, nas quais uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca, utilizada na sua preparação. Os extratos fluidos podem ser padronizados, em termos de concentração do solvente, teor de constituintes ou de resíduo seco (BRASIL, 2010).

Extratos vegetais são cada vez mais incorporados a formulações cosméticas, e a adição destes ocorre devido às atividades clínicas atribuídas aos mesmos, como atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e antienvhecimento. Os antioxidantes desempenham um papel importante na inibição e eliminação de radicais livres, e com isso conferem proteção aos seres humanos prevenindo o envelhecimento dos órgãos, o câncer, a disfunção imunológica e outras doenças que estão intimamente relacionadas com o dano oxidativo em células induzidas por radicais livres (ZHANG et al., 2011).

Os antioxidantes sintéticos tais como o hidroxianisole butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT) e a tert-butilhidroquinona (TBHQ) têm sido amplamente utilizados como antioxidantes nos alimentos, mas as preocupações com a segurança do uso levaram a interesses em antioxidantes naturais. Esses antioxidantes sintéticos são compostos fenólicos substituídos. Posteriormente grande parte da pesquisa sobre antioxidantes naturais também se concentrou em compostos fenólicos, em particular os flavonoides e os ácidos hidroxicinâmicos (BALASUNDRAN et al., 2006). Produzidos como metabólitos secundários de plantas, os antioxidantes possuem larga aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e nutricional, destacando-se por servirem como aditivos naturais (MELO et al., 2011).

No entanto, um grande problema ao se extrair metabólitos secundários para fins industriais é a falta de domesticação dos recursos naturais que pode levar à subutilização ou a extinção de inúmeras espécies vegetais (CGEE, 2010). A exploração desregrada de uma espécie da biodiversidade brasileira pode levá-la ao risco de extinção; por outro lado a instabilidade na cadeia produtiva por falta de

matéria-prima representa um risco econômico para a indústria. Uma opção viável para estas questões seria a utilização de matérias-primas como a casca de soja e a casca de algodão que são resíduos gerados pelas atividades agroindustriais já estabelecidas. A casca de soja é o resíduo de maior valor comercial em uma indústria processadora de soja, sendo definida como um coproduto oriundo do processamento da soja e representa de 7 a 8% do peso do grão (KLINGER, 2014) e sua principal utilização atualmente é como ingrediente na alimentação animal.

O Brasil é o terceiro maior exportador de algodão do mundo, tendo produzido cerca de 3,8 milhões de toneladas no ano de 2017 (IBGE, 2018), principalmente no Mato Grosso e Bahia, responsáveis por cerca de 80% da safra nacional. O algodão apresenta vários subprodutos provenientes da separação da fibra e extração do óleo da semente. Destes subprodutos, está a casca de algodão, que compreende a camada externa do caroço de algodão com algum línter aderido, que é separado durante o beneficiamento para a produção de óleo por via química (extração com solventes) (ARAUJO et al., 2003). A semente de algodão apresenta, em média, a seguinte composição: 12,5% de línter, 15,2% de óleo bruto, 46,7% de torta (resíduo da extração do óleo), 20,7% de casca e 4,9% de resíduos, produzidos no processo industrial (BELTRÃO, 2000).

Moure e colaboradores (2001) estudando vários resíduos agrícolas, concluíram que as cascas de cereais e oleaginosas concentram as substâncias antioxidantes presentes no grão. No entanto, não foi encontrado trabalho avaliando o poder antioxidante da casca de soja e de algodão. Diante disto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante de extrato fluido padronizado a partir de resíduos de oleaginosas com o intuito de desenvolver novas formas de obtenção ecologicamente correta de metabólitos secundários de interesse industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cenário do biodiesel no Brasil e o uso de oleaginosas

O biodiesel foi incorporado na matriz energética brasileira na última década, contribuindo para fortalecer ainda mais nossa aptidão para uma matriz energética renovável. A mistura de biodiesel ao diesel fóssil teve início em dezembro de 2004, em caráter autorizativo, quando o governo federal lançou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) visando à sua implantação e produção, social e ecologicamente sustentável, levando em consideração o desenvolvimento regional (BRASIL, 2017). Em linhas gerais, esse programa tinha como objetivos reduzir a dependência do petróleo; expandir os mercados das oleaginosas; impulsionar a demanda por combustíveis alternativos; e reduzir a emissão de gases poluentes, visando atender as regras do Protocolo de Kioto, do qual o Brasil é signatário (MATTEI, 2010).

Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o perceptível amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) sucessivamente até atingir 5% (B5) em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei nº 11.097/2005. De acordo com a Lei nº 13.263/2016 que revisou os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado em território nacional, em março de 2017 o percentual passou a ser de 8%. Ainda de acordo com a lei, as composições deverão ser elevadas para 9% e 10%, respectivamente, a partir de 1º de março de 2018 e 1º de março de 2019. Mas a meta foi antecipada, e, portanto, desde março de 2018 todo diesel combustível comercializado no Brasil contém 10% de biodiesel. Os novos percentuais de adição do biodiesel colocam o Brasil em destaque no mercado internacional do produto (BRASIL, 2017).

A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove), prevê uma produção de 5.3 bilhões de litros de biodiesel em 2018, aumento de 25% em relação a este ano. Como consequência haverá uma elevação de 3,7 milhões de toneladas

no processamento de soja em função da demanda por óleo de soja e paralelamente a isto ocorrerá o aumento da produção de resíduos decorrentes de tais processamentos, o que torna este setor uma fonte promissora de substâncias bioativas naturais. Diante disto cresce a importância de se avaliar novas aplicações para os resíduos desta cadeia, como a casca de soja e de algodão. Uma destas aplicações seria a obtenção de compostos bioativos com atividade antioxidante, tendo em vista a ampla gama de utilizações possíveis onde estes poderão ser empregados.

De acordo com a lei 11.097/2005, o biodiesel é um produto para uso em motores de combustão de ciclo diesel, capaz de substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil, sendo constituído por uma mistura de ésteres de ácidos graxos através da reação de transesterificação de triglicerídeo com álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador, tendo a seguinte proporção de componentes: 87%, óleo vegetal; 12%, álcool e 1%, catalisador. O produto resultante deste processo tem a seguinte composição: 86% de óleo biodiesel; 9% de glicerina; e 5% de álcool reprocessado, além de coprodutos como torta, farelo etc. que podem constituir outras fontes de renda importantes para os produtores. Geralmente, a torta ou farelo gerado na extração do óleo não passam por processo de agregação de valor porque são desconhecidas as suas potencialidades econômicas (MATTEI, 2010; ABDALLA, 2008).

A produção de biodiesel ainda está dependente das produtoras de óleo vegetal, sendo a maior parte do biodiesel produzido no Brasil de origem vegetal, com notável predominância da soja. A porcentagem de biodiesel brasileiro derivado da soja vem variando, mas em média oscila entre 70% e 85% do total da produção nacional. Entre outras oleaginosas que estão presentes na produção brasileira ou que são apostas para um futuro próximo estão o algodão e o dendê. Desses, o algodão é o que já está tendo maior utilização nas usinas, chegando a atingir perto de 4% da produção nacional (BIODIESELBR, 2017). Em 2017, no acumulado até o mês de junho, a participação das três principais matérias-primas foi de 70,02% soja, 12,94% gordura bovina e 0,14% algodão (BRASIL, 2017), mostrando a retração desta última matéria-prima neste último ano. A Figura 1 apresenta a evolução da participação das matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel.

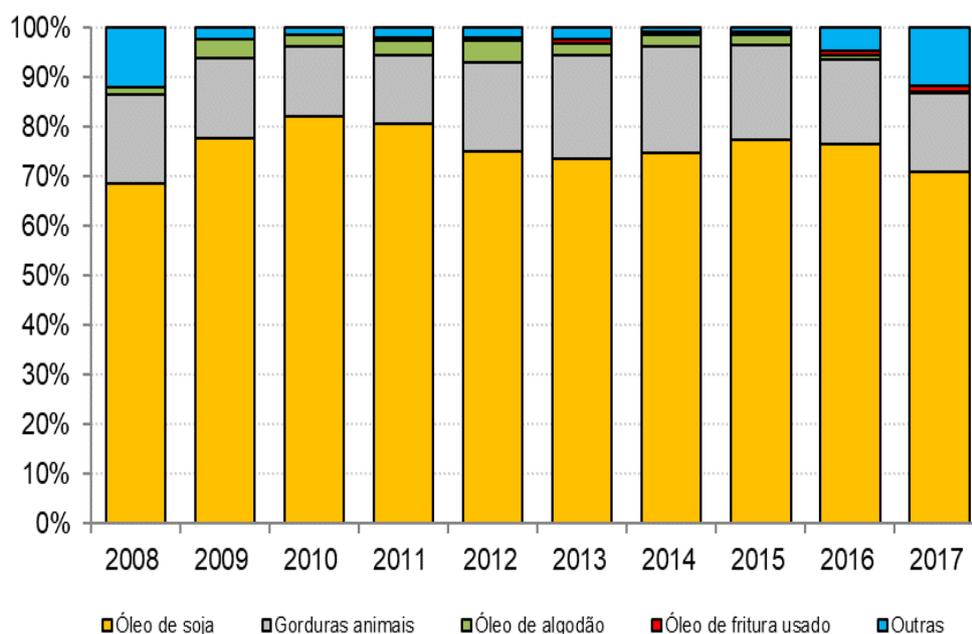


Figura 1. Figura 1. Percentual de participação de cada fonte de matéria-prima utilizada na produção de biodiesel, desde o início da obrigatoriedade da adição de biodiesel no diesel. Fonte/Elaboração: ANP/ABIOVE – Coordenadoria de Economia e Estatística.

2.2. Resíduos como fontes de antioxidantes naturais

De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos, resíduos industriais são os gerados nos processos produtivos e instalações industriais. Padrões sustentáveis são definidos para a produção e consumo de bens e serviços de forma a atender as necessidades das gerações atuais permitindo melhorias na condição de vida, sem comprometer a qualidade ambiental e o atendimento das necessidades das gerações futuras. Uma das responsabilidades desta política é promover o aproveitamento de resíduos sólidos, direcionando-os para a sua cadeia produtiva ou para outras cadeias produtivas (BRASIL, 2010).

São gerados milhões de toneladas de resíduos provenientes de atividades agroindustriais em todo o mundo e o destino dado a esses resíduos, tal como é feito, causa um déficit econômico na cadeia produtiva. Muitos deles são ricos em compostos bioativos, alguns capazes de combater danos oxidativos causados por radicais livres, como é o caso dos antioxidantes, e tem elevado valor comercial (MELO et al., 2011), ainda pouco explorado. A preocupação com a sustentabilidade e a melhoria da qualidade ambiental tem assumido papel de destaque nos mais diversos segmentos da sociedade do século XXI. Dentre as quais destaca-se a preocupação com o destino correto dos resíduos sólidos, onde esses diferenciam-se do termo lixo, tendo em vista que este último não tem nenhum valor, sendo apenas descartado, enquanto o primeiro possui valor econômico agregado, por possibilitar reaproveitamento no próprio processo produtivo (DEMAJORIVIC, 1995).

A obtenção de compostos com valor agregado tem crescido nos últimos anos com a reutilização de resíduos da indústria, dentre estes compostos, destacam-se os compostos fenólicos que geralmente são encontrados em resíduos como cascas, bagaços e tortas e que podem apresentar elevada atividade antioxidante e serem utilizados para diversos fins em vários segmentos da indústria. O desenvolvimento de pesquisas para o tratamento/aproveitamento dos resíduos agroindustriais tem contribuído para a inserção de novos produtos no mercado, tanto no setor alimentício humano e animal, como no ramo dos cosméticos e produção de energia (COSTA, 2013). Moure e colaboradores publicaram uma revisão abordando a extração de compostos antioxidantes (principalmente polifenóis) de resíduos industriais e da agroindústria, nos quais identificaram importantes antioxidantes. Ajila e colaboradores (2007) estudaram compostos bioativos e o potencial antioxidante de extratos provenientes da casca de manga, relatando uma alta atividade antioxidante, segundo diferentes sistemas de medida. Okonogi e colaboradores (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de resíduos de cascas de diferentes frutas: *Punica granatum* (romã), *Nephelium lappaceum* (rambutam) e *Garcinia mangostana* (mangostão), e concluiu que poderiam ser aproveitadas devido ao grande potencial antioxidante.

A Tabela 1, adaptada a partir do artigo publicado por Oliveira e colaboradores (2009), reúne resultados de fontes naturais atrativas de antioxidantes a partir de resíduos da agricultura e da indústria alimentícia.

Tabela 1. Resíduos como fontes naturais de antioxidantes

Fontes	Principais resultados
Resíduos da vinicultura	O extrato etanólico dos resíduos estudados exibiu elevada atividade antioxidante, quando comparado com os extratos em outros solventes, contra o antioxidante sintético BHT, o palmitato de ascorbila e a vitamina E. Não foi observada correlação positiva entre atividade antioxidante e conteúdo total de fenóis.
Resíduos sólidos de azeitona	O extrato (1-20 µg/mL) analisado foi pré-incubado em células endoteliais e preveniu a peroxidação lipídica e a morte celular. Os resultados indicam uma grande capacidade antioxidante dos extratos estudados.
Resíduos de carambola	A alta quantidade de fenóis e a elevada capacidade antioxidante dos resíduos estudados indicam que poderiam ser empregados como aditivos alimentares.
Bagaço de uva	Encontraram-se 17 tipos de compostos polifenólicos diferentes, entre eles, ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina.
Bagaço de maçã	Todos os compostos antioxidantes encontrados apresentaram elevada atividade antioxidante, sendo a atividade antioxidante maior do que a das vitaminas C e E em 1 a 3 vezes (DPPH) e, 10 a 30 vezes (sequestradora do anion radical superóxido).
Resíduos de maçã, pêra e alcachofra	Foram encontrados extratos com elevado conteúdo de fenóis e elevada capacidade antioxidante.
Folhas de chá velho e resíduos de chá preto	O resíduo de chá preto apresentou maior capacidade antioxidante quando comparado com a folha de chá velho. Recomendam o uso destes chás como fontes naturais de antioxidantes.
Sementes (soja) e resíduos agrícolas de soja	Os extratos das sementes mostraram variações no conteúdo de fenólicos (6,4 a 81,7 mg EAG/g), de flavonoides (3,5 a 44,6 mg QE (quercetina)/g) e atividade antioxidante (7,5 a 74,7%).
Resíduos de sementes de groselha preta	Fenóis e os tocoferóis foram os mais importantes constituintes do resíduo pressionado de semente de groselha preta estudado.
Sementes, casca de semente, casca e óleo de abóbora	O ácido p-hidroxibenzoico foi o composto fenólico mais abundante nas amostras estudadas.
Resíduos de cebola	Resíduos de cebola mostraram ser fonte de antioxidantes e de compostos antiescurecimento, podendo ser utilizados como ingredientes de alimentos.
Casca de batata	Extrato da casca de batata foi capaz de proteger eritrócitos contra o estresse oxidativo, provavelmente por atuar como potente antioxidante.

2.3. Compostos bioativos de interesse industrial

Os compostos fenólicos são uma classe com mais de oito mil estruturas químicas que podem ser classificados pelo número e arranjo de seus átomos de carbono, divididos em pelo menos dez grupos, a saber: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, isocumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonóides e ligninas (CROZIER et al., 2009). Entre estas várias substâncias muitas são importantes antioxidantes, uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres (LARRAURI et al., 1996). Lachman e colaboradores (2010) mostraram que uma grande variedade de fontes vegetais biossintetizam compostos que possuem atividade antioxidante e podem ser utilizados como uma fonte natural de substâncias que possuem a capacidade de sequestrar os radicais livres. Os extratos cuja composição possuem compostos fenólicos antioxidantes são de particular interesse para a indústria de cosméticos.

A importância dos compostos fenólicos torna o estudo de subprodutos interessante para as indústrias de alimentos, nutracêutica, farmacêutica e química, principalmente devido à possibilidade de aproveitar os resíduos, ricos em compostos fenólicos, para produção de extratos e produtos de manutenção da saúde humana. A extração desses compostos de materiais derivados das práticas industriais representa uma alternativa atrativa, sustentável e de baixo custo para obter bioativos com alto valor biológico, os quais podem ser incorporados em alimentos e cosméticos (JARA-PALACIOS et al., 2015).

2.4. Métodos de determinação da atividade antioxidante

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Sendo o mais populares o 2,2-Azinobis-3-

etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), *Oxygen Radical Absorbancy Capacity* (ORAC) e o *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de ação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos. Não existe um procedimento metodológico universal, este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (OLIVEIRA et al 2009).

A oxidação ocorre naturalmente em organismos vivos, sendo causada principalmente por espécies reativas de oxigênio (ERO's). O aumento de níveis de ERO's no organismo pode danificar estrutura de biomoléculas, modificar suas funções, levar à disfunção e até a morte celular. Em nível sistêmico as consequências desse aumento podem se manifestar sob a forma de diversos problemas de saúde como câncer, doenças relacionadas à idade e doenças cardiovasculares. Para investigar o potencial antioxidante em produtos naturais, os testes ABTS, DPPH, ORAC, FRAP, etc são os procedimentos analíticos de primeira linha aplicados à análise de atividade antioxidante por serem de baixo custo e de protocolos facilmente implementados (GEOFFROY et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2014; MISHRA et al., 2011).

O DPPH é rotineiramente utilizado para avaliar o potencial de eliminação de radicais livres de uma molécula antioxidante e considerado como padrão entre os métodos colorimétricos. Comumente é usado para medir atividade antioxidante de grãos e farelo de trigo, vegetais, ácidos linoleicos, ervas, óleos de sementes em diferentes sistemas de solventes, incluindo etanol, acetona, metanol e benzeno (CHENG et al., 2006). DPPH é um radical estável em solução de cor roxa com absorção a 515 nm em metanol. Este ensaio baseia-se no princípio de que o DPPH recebe um átomo de hidrogênio (H) da molécula doadora, isto é, antioxidante, resultando na redução do DPPH para DPPH₂, a cor roxa muda para amarelo com concomitante diminuição da absorção. A mudança de cor é monitorada por espectrofotometria e utilizada para a determinação de parâmetros para propriedades antioxidantes. Comparado com o ensaio DPPH, o método ABTS pode ser realizado em meios aquosos e orgânicos e em uma ampla gama de valores de pH. Além disso,

como as medições são realizadas em comprimentos de onda mais longos, a interferência de amostras coloridas é diminuída (MISHRA et al., 2011).

Os testes existentes para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras recorrem normalmente a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensa, tratamento térmico e ou catálise metálica) e permitem quantificar de forma rápida a estabilidade oxidativa de um óleo ou a eficácia teórica de um antioxidante isolado ou em associação (ANTOLOVICH et al., 2002). O Rancimat (Methrom AG, Suíça) é o equipamento que determina a resistência de uma base oleosa à oxidação. O método baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos produtos secundários da oxidação, de baixo peso molecular, obtidos após a iniciação forçada da oxidação à temperatura de 110°C. Por este método o objetivo é testar a eficiência do antioxidante de extratos etanólicos misturado à amostra de óleo, ou seja, avaliar a proteção de bases oleosas (alimentares ou cosméticas) ao dano oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar o potencial antioxidante de extrato fluido padronizado produzido por diferentes técnicas a partir de biomassa residual de oleaginosas da cadeia produtiva do biodiesel, cascas de soja e semente de algodão, para aplicação cosmética.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar condições do processo extrativo que permita maior rendimento de extração de compostos bioativos;
- Quantificar os compostos fenólicos: fenóis totais e flavonoides totais;
- Avaliar a influência da luz e da agitação sobre o rendimento da extração por maceração;
- Caracterizar a capacidade antioxidante dos extratos através dos métodos de DPPH, ABTS e Rancimat;
- Verificar a correlação entre os resultados de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a produção de extratos vegetais movimenta um mercado bilionário. De acordo com a Industry ARC (2016), o mercado global de extratos vegetais movimenta US\$ 41,5 bilhões e estima-se que deverá crescer para US\$ 79,2 bilhões até 2020. Esta empresa também afirma que o mercado de extratos vegetais equivale a 34% do mercado global de cuidados pessoais. No Brasil, estima-se que o mercado de beleza e cuidados pessoais irá crescer de 3,29 trilhões de reais em 2014 até 4,50 trilhões de reais até 2019 (MINTEL, 2016). Portanto, no Brasil, há uma perspectiva positiva para a produção de extratos vegetais e esta crescente demanda impactará nas diferentes cadeias agrícolas devido ao aumento da necessidade de novas fontes de matéria-prima. Paralelamente, há um aumento da geração de resíduos gerados na extração de óleo empregados na síntese de biodiesel. O biodiesel passou ser adicionado ao diesel combustível desde 2008, de forma obrigatória, em nível de 2%. A porcentagem de adição é regulada por lei, atual é de 10% (ANP, 2017), sendo o óleo de soja e o óleo de caroço de algodão, respectivamente, a primeira e terceira fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel. Nos últimos 25 anos, aproximadamente dois terços dos novos fármacos foram originados a partir da descoberta de metabólitos secundários encontrados na biodiversidade. Esse fato se deve principalmente à complexidade estrutural de moléculas encontradas em organismos vivos, tornando-as de grande dificuldade e custo para serem obtidas por síntese química.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COLETA E PREPARO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS:

As cascas da semente do algodão foram adquiridas da empresa Dual Duarte Albuquerque COM. E IND. LTDA situada na cidade de Campo Novo do Parecis – MT (Figura 2). Enquanto as cascas da soja foram adquiridas da Cooperativa Agrícola do Rio Preto – COOARP, BR-320, Planaltina/DF. No laboratório, foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar (Marconi, MA 035/BX), durante 2 dias, a temperatura de 40 °C. Para redução do tamanho de partícula as cascas da soja foram submetidas a moagem em moinho ultracentrífugo (Retsch, ZM 200).

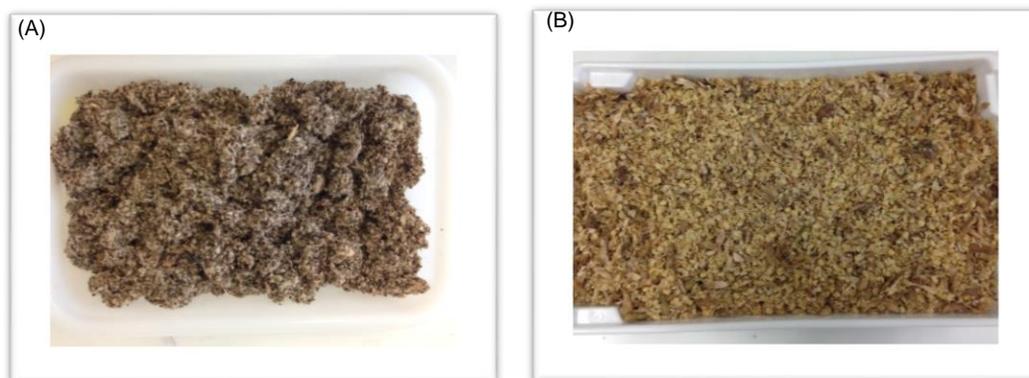


Figura. Resíduos agroindustriais, cascas da semente de algodão (A), e cascas da soja (B).

5.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

5.2.1. MACERAÇÃO DINÂMICA E ESTÁTICA, COM E SEM EXPOSIÇÃO À LUZ:

Os resíduos agroindustriais, cascas da semente do algodão e cascas de soja, foram submetidos aos procedimentos de maceração com e sem agitação mecânica, denominados como processos dinâmico e estático, respectivamente. Cada processo extrativo foi realizado em duas distintas condições de luminosidade, com e sem exposição à luz. Assim, foram obtidos 4 diferentes extratos para cada resíduo, totalizando 8 tipos macerados que foram submetidos à posterior caracterização.

A maceração dinâmica foi realizada com os resíduos da casca da semente do algodão 150 g ou casca da soja 150 g em solução hidroalcoólica a 80%, com e sem exposição à luz. Nesse último caso, envolvendo os recipientes com papel de alumínio. A extração teve duração de 72 h e o solvente extrator foi renovado por 3 vezes a cada 24 horas. Obedecendo as proporções de 1:10 (amostra:solvente). A agitação foi promovida em banho metabólico tipo *Dubnoff* MA 093 (Marconi, Brasil) programado para rotação 5 a temperatura ambiente (Figura 3). O material foi então filtrado em funil de vidro cônico com auxílio de um papel de filtro qualitativo. Os extratos líquidos obtidos foram transferidos para um balão e levado ao rotaevaporador para remoção de solvente em banho-maria a 40 °C, até quase secura. Após isso foram transferidos para frascos âmbar e em seguida congelados em ultrafreezer - 80 °C e posteriormente liofilizados.

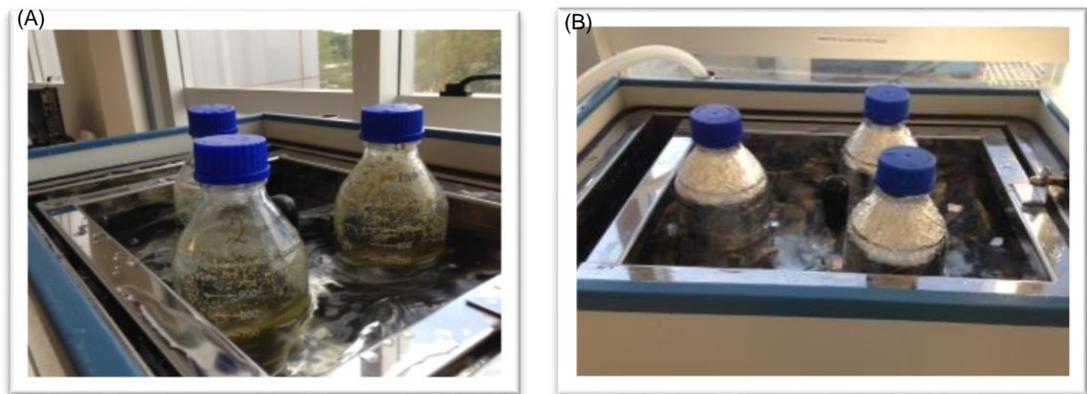


Figura 2. Ilustração do processo de maceração dinâmica em banho metabólico tipo Dubnoff recíprocante, com (A) e sem exposição à luz ambiente (B).

Para a maceração estática todos os passos descritos no procedimento anterior foram seguidos, no entanto, sem a agitação. Os frascos permaneceram na bancada por 72 h e o solvente foi renovado a cada 24 h. A Figura 4 mostra a esquematização do processo de extração até a obtenção do extrato seco.

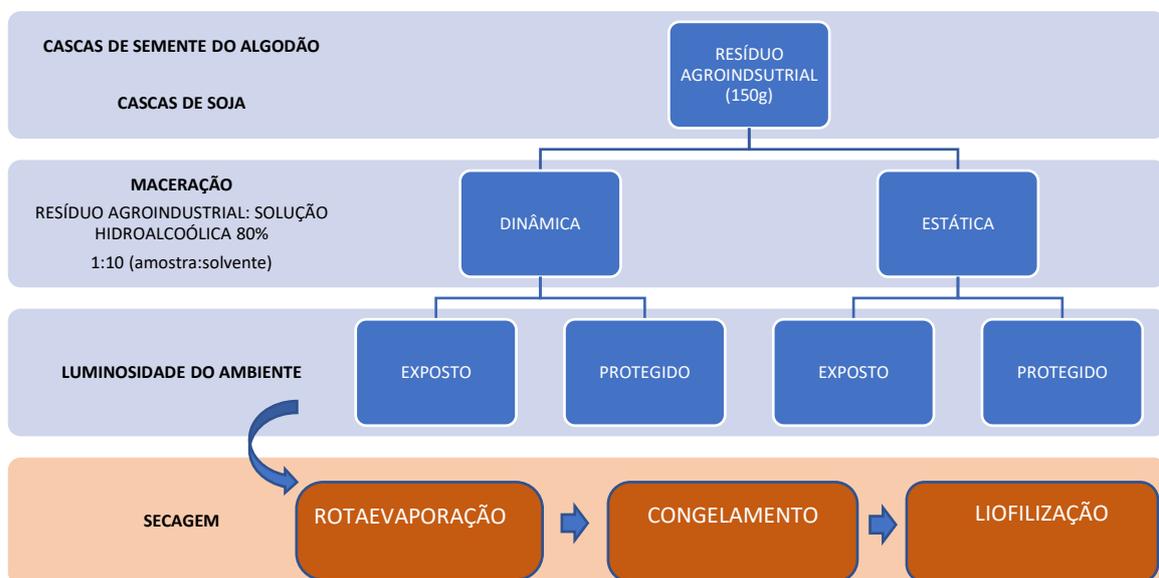


Figura 3. Esquematização do processo de obtenção dos extratos secos para os diferentes resíduos vegetais em estudo.

O rendimento extrativo (R%) foi calculado a partir dos valores de massa inicial de resíduo (m_o) e massa de extrato liofilizado (m_f) dos diferentes vegetais, segundo a equação 1 (RODRIGUES et al, 2011).

$$R(\%) = \frac{m_f \times 100}{m_o}$$

Eq.1

5.3. TEOR DE EXTRATIVOS

Com o objetivo de avaliar a eficiência dos métodos de extração empregados, foi realizada a análise de teor de extrativos da amostra bruta e do resíduo sólido recuperado após a etapa de filtração do extrato.

O método tem como princípio a determinação de materiais não estruturais solúveis presentes em uma amostra de biomassa. Ocorre em duas etapas de extração para remover o material solúvel em água (extrato aquoso) e solúvel em etanol (extrato etanólico). Os compostos solúveis em água podem incluir material inorgânico, açúcares não estruturais, material nitrogenado, entre outros. O material inorgânico do extrato aquoso pode ser proveniente da biomassa ou de qualquer material solúvel que esteja associado à biomassa, como o solo ou o fertilizante. Esse método não tem o objetivo de distinguir a fonte do material inorgânico. O extrato etanólico inclui clorofila, ceras ou outros componentes minoritários (SLUITER et al, 2008).

O ensaio foi realizado de acordo com o proposto pelo NREL - *National Renewable Energy Laboratory* (NREL/TP-510-42619), em equipamento de extração acelerada por solvente (ASE 350, Thermo Scientific, USA), como mostra a Figura 4. Este aparelho emprega alta pressão para realizar extração exaustiva da biomassa. Os parâmetros da extração aquosa e etanólica foram temperatura 100°C, Static Time de 7 minutos, 3 ciclos, Rinse com 150% do volume, Purge de 60 segundos e Cell Type SST de 10 mL.

Os tubos coletores do equipamento foram tarados em estufa a 105°C por 24h, e então deixados em dessecador até atingirem a temperatura e pesados em balança analítica (Tubo_{inicial}), antes de serem levados ao equipamento para coletar os extratos. Para cada amostra contida em uma cela extratora, foram utilizados 2 tubos coletores (um para o extrato aquoso e outro para o extrato etanólico). Ao final das extrações os tubos foram rotaevaporados com auxílio de um multivapor (Buchi, Suíça) e posteriormente levados a estufa por 48 horas, e resfriados em dessecador antes da pesagem final (Tubo_{extrativos}).



Figura 4. Extrator Acelerado por Solvente (ASE 350), Thermo Scientific, USA.

As amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados são relatados, em peso seco, como porcentagem em peso da biomassa. As porcentagens de extrativos são medidas e utilizadas para converter composições de uma base sem extrativos (material livre de extrativos) e como base recebida (material bruto). Os teores de extrativos aquosos e extrativos etanólicos são determinados segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{(\text{Tubo}_{\text{inicial}} - \text{Tubo}_{\text{extrativos}})}{\text{Massa}_{\text{amostra}}} \right) \times 100$$

Eq.2

O teor de extrativos totais é calculado a partir da fórmula a seguir:

$$\% \text{ Extrativos}_{\text{totais}} = \% \text{ Extrativos}_{\text{aquoso}} + \% \text{ Extrativos}_{\text{etanólicos}}$$

Eq.3

Os resultados são expressos em base seca (x_{bs}), tendo-se como base de correção a matéria seca a 105°C. Para isso, basta multiplicar o resultado (x) por 100 e dividir pela porcentagem de matéria seca (% MT), de acordo com a fórmula genérica abaixo:

$$X_{bs} = \frac{x \times 100}{\% \text{MT}}$$

Eq.4

5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

5.4.1. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

A quantificação de fenóis totais foi realizada através do Método de Folin-Ciocalteu com adaptações de Waterhouse (2000). A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de seis diluições de ácido gálico (50-200 µg/mL). As amostras em análise foram submetidas ao mesmo procedimento. As mensurações das absorbâncias em função da concentração foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS a 765 nm, em triplicata. Os resultados foram expressos como µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.

5.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Siatka & Kasparova (2010). A curva de calibração foi obtida fazendo-se diluições de quercetina (5-30 µg/mL). As mensurações das absorbâncias em função da concentração foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS (Agilent, Cary 60) a 425 nm, em triplicata. Os resultados foram expressos como µg de equivalente de quercetina por grama de amostra.

5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.5.1. DPPH

O DPPH é rotineiramente utilizado para avaliar o potencial de eliminação de radicais livres de uma molécula antioxidante e considerado como padrão entre os métodos colorimétricos. Este ensaio baseia-se no princípio de que o DPPH recebe um

átomo de hidrogênio (H) da molécula doadora, isto é, antioxidante, resultando na redução do DPPH• para DPPH₂, a cor roxa muda para amarelo com concomitante diminuição da absorção. A mudança de cor é monitorada por espectrofotometria e utilizada para a determinação de parâmetros para propriedades antioxidantes (MISHRA et al., 2011). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços adaptado de Fukumoto & Mazza (2000). A partir da solução estoque de Trolox 2 mM foram feitas diluições para a construção de uma curva padrão com 6 pontos (80-480 μM), ilustrada na Figura 6. Foram preparadas soluções do extrato de 0,3 mg/mL. Na microplaca foram transferidos 22 μL de cada amostra e 200 μL da solução de DPPH 150 μM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplaca (SpectraMax M3, Molecular Devices, CA, USA) a 520 nm por 5 horas sendo que durante a primeira hora foi realizada de 15 em 15 minutos e depois de 1 em 1 hora. Com os dados obtidos foi construído gráfico inibição do DPPH vs Tempo. A atividade antioxidante foi dada em equivalentes de Trolox.

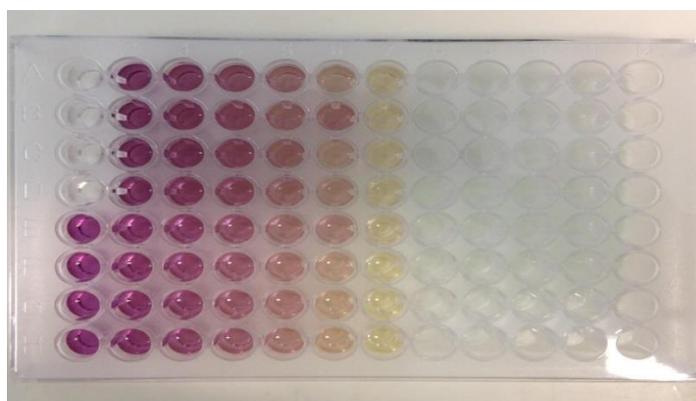


Figura 5. Placa de 96 pontos contendo a curva de calibração de Trolox, cada coluna representa uma concentração diferente (80-480 μM).

5.5.2. ABTS

O ensaio foi realizado segundo o proposto por Torres e colaboradores (2017) com adaptações. Partindo de uma solução estoque de Trolox 2mM foram feitas diluições para a construção da curva de calibração (10-300 μ M), ilustrada na Figura 7. Para a análise das amostras foram feitas soluções dos extratos na concentração de 0,3 mg/mL em triplicata. Para a microplaca foram transferidos 10 μ L das soluções dos extratos para os poços correspondentes e 290 μ L do radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos espectrofotômetro a 734 nm. A atividade antioxidante dos extratos foi expressa em equivalentes de Trolox.

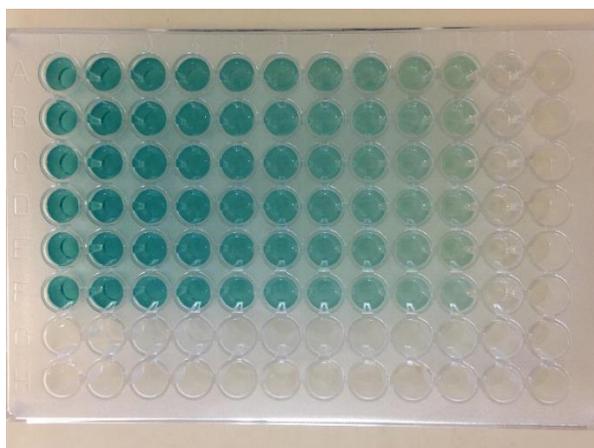


Figura 6. Placa de 96 pontos contendo a curva de calibração de Trolox com 9 pontos (10-300 μ M), cada coluna representa uma concentração diferente.

5.6. ESTABILIDADE OXIDATIVA EM APARELHO RANCIMAT

Este ensaio baseia-se na determinação da condutividade de ácidos voláteis formados durante o processo de oxidação lipídica. O tempo necessário para produzir um aumento da condutividade devido à formação desses ácidos determina o tempo de indução (TI), que pode ser definido como uma medida da estabilidade de uma gordura ou óleo (LÄUBLI; BRUTTEL, 1986; SILVA, 2017). A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada pela medição do tempo de indução para oxidação da

banha de porco comercial, sem adição de antioxidante, através do equipamento Rancimat 873 (Metrohm, EUA), mostrado na Figura 8, que foi configurado para ensaio na temperatura de 110 °C e taxa de fluxo de ar de 20 L/h. Cada tubo continha aproximadamente 3 g de banha de porco sem adição de conservantes e 100 µL do extrato metanólico na concentração de 200 ppm. O teste foi feito em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão do tempo de indução (h).



Figura 7. Aparelho Rancimat 873 (Metrohm, EUA).

5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância para cada característica e as médias foram agrupadas por meio do teste de Tukey com nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R Core Team (2013) e GraphPadPrism®.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

De acordo com Simões e colaboradores (2007) uma série de fatores interfere na extração, tais como características do material vegetal, o seu grau de divisão, o solvente utilizado e a metodologia. Na escolha do método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Os distintos métodos empregados para extração por maceração utilizaram a reposição do solvente extrator na tentativa de esgotar o material vegetal, evitando o efeito de saturação do solvente. Os rendimentos obtidos de extrato seco de cada extrato etanólico bruto estão ilustrados na Figura 9. Os resultados da maceração estática ficaram próximos dos obtidos pela maceração dinâmica e mostraram que não houve interferência da luz na obtenção do extrato seco para nenhum dos resíduos agroindustriais analisados.

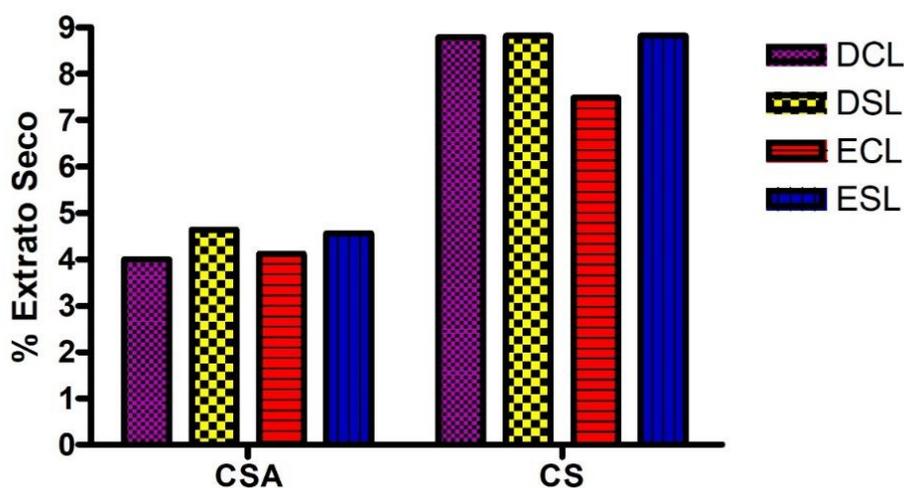


Figura 8. Rendimento da extração (%) a partir dos resíduos agroindustriais, casca da semente do algodão (CSA) e cascas da soja (CS). Nota: DCL – Dinâmica com luz, DSL – dinâmica sem luz, ECL – estática com luz e ESL – estática sem luz.

A análise conjunta destes resultados permitiu afirmar que para esses resíduos a extração por maceração estática foi relativamente equivalente a maceração dinâmica em relação aos valores do rendimento de extrato seco.

6.1.2. TEOR DE EXTRATIVOS

Na Figura 10 podem ser observados no gráfico os resultados do teor de extrativos (%) casca da semente do algodão para as amostras bruta e para as tortas restantes ao final do processo de maceração. O total de extrativos presentes e possíveis de ser extraído da amostra (bruto) foi de 9%. Pode-se notar que a maceração dinâmica com luz (DCL) apresentou a maior porcentagem de resíduos não extraídos com 4,95%. Enquanto a maceração dinâmica sem luz (DSL), a maceração estática com luz (ECL) e maceração estática sem luz (ESL) apresentaram porcentagens residuais equivalentes estatisticamente com 3,71%, 3,83% e 3,88%, respectivamente. Com isso podemos inferir que estas foram mais eficientes que a maceração dinâmica com luz (DCL) em relação ao potencial de extração.

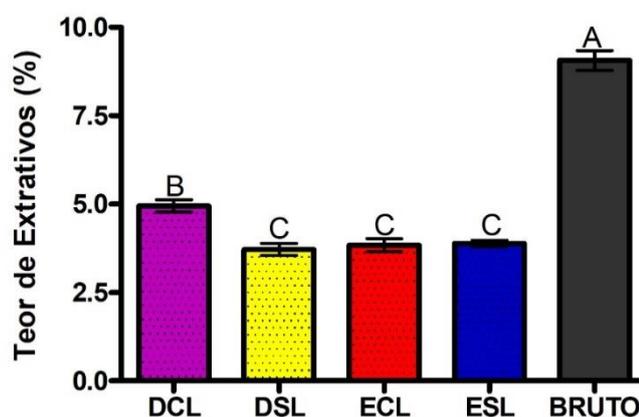


Figura 9. Teor de extrativos (%) do resíduo agroindustrial da casca da semente do algodão obtidos por extração acelerada por solvente (ASE) com as variações dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$), teste de Tukey.

A Figura 11 apresenta os resultados do ensaio de teor de extrativos (%) da casca da soja. A amostra bruta apresentou um total de aproximadamente 20% de extrativos. Para as amostras ECL, ESL e DCL não houve diferença significativa ($p > 0,05$). No entanto, a DSL apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com a DCL, sendo, portanto, a maceração dinâmica sem luz a que foi mais eficiente na extração, deixando menos extrativos residuais.

Além disto, nota-se que talvez seja adequado realizar ensaios com outros solventes, pois este não foi tão eficiente na extração, deixando mais de 50% dos materiais extraíveis no resíduo pós-extração. Futuramente, seria adequado avaliar novos solventes mais eficientes para a casca de soja.

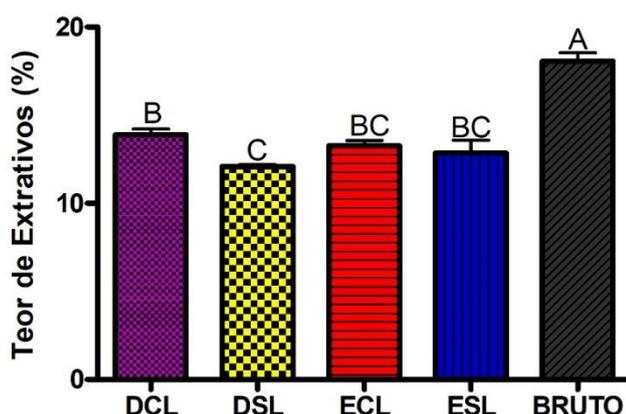


Figura 10. Teor de extrativos (%) do resíduo agroindustrial da casca da soja obtidos por extração acelerada por solvente (ASE) com as variações dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$), teste de Tukey.

6.2. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os resultados obtidos com a avaliação de fenóis totais a partir dos macerados liofilizados dos resíduos agroindustriais da casca da semente do algodão estão ilustrados na Figura 12. Os mesmos demonstraram que apesar dos processos de

maceração dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL) terem sido mais efetivo na obtenção de extrato seco a partir dos resíduos das oleaginosas, o processo de maceração dinâmica com luz (DCL) é mais vantajoso, em virtude da maior obtenção de fenóis, tendo em vista que este apresentou a maior concentração de fenólicos com $188,51 \pm 3,94$ mg EAG/g de extrato seco. Enquanto o extrato que apresentou menor concentração foi o obtido por maceração estática sem luz (ESL) com $95,79 \pm 9,27$ mg EAG/g de extrato.

Em estudo comparando diferentes métodos extrativos entre eles a maceração dinâmica e estática com base no teor de fenóis totais obtido por cada método Cardoso e colaboradores (2017) concluíram que a maceração dinâmica foi a mais eficiente. A maceração dinâmica também apresentou maiores teores de flavonoides e polifenóis totais frente à extração estática assistida por ultrassom em estudo realizado por Cortés-Rojas (2011).

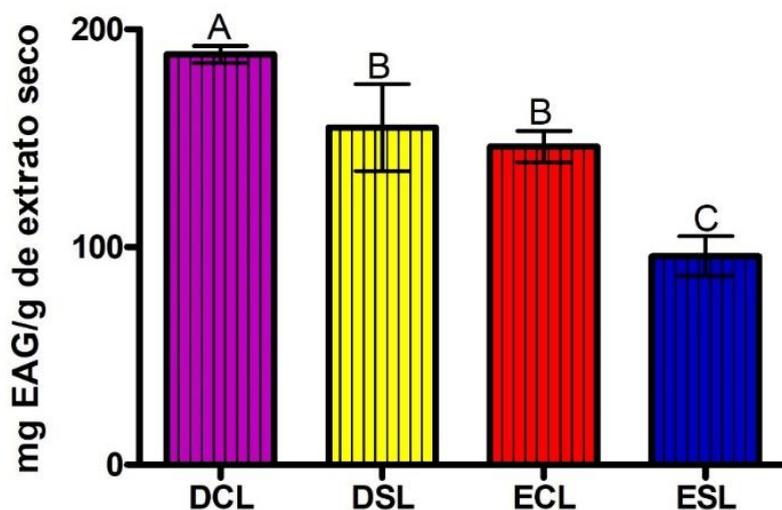


Figura 11. Concentração de fenólicos totais (mg EAG/ g de extrato seco) nos extratos do resíduo da casca da semente de algodão obtidos pelas macerações dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$), teste de Tukey.

Diversos trabalhos descrevem que os compostos fenólicos são as principais substâncias que influenciam diretamente na atividade antioxidante nos extratos vegetais e que existe a correlação entre teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Esta pode ser explicada por diferentes razões, como por exemplo, todos os compostos do conteúdo fenólico total colaboram de forma sinérgica para demonstrar a atividade antioxidante (ARRANZ et al, 2008).

Os resultados obtidos da quantificação de fenóis totais da casca da soja estão ilustrados na Figura 13. Nesta podemos observar que não houve diferença significativa entre os extratos. A média de fenóis da casca de soja foi bem inferior à da casca de semente de algodão, variando de 23,74 a 30,51 mg EAG/ g de extrato seco. A Figura 14 apresenta o rendimento de fenóis totais em g/g de extrato seco obtido de cada amostra.

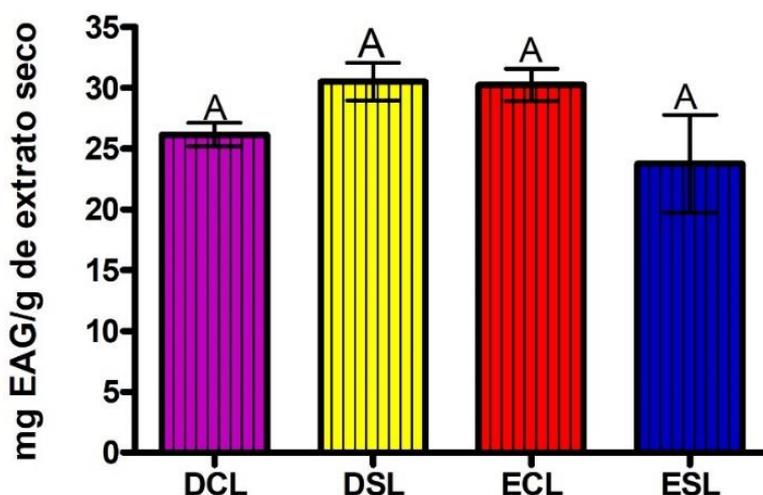


Figura 12. Concentração de fenólicos totais (mg EAG/ g de extrato seco) nos extratos do resíduo das cascas da soja obtidos pelas macerações: dinâmica com luz (DCL), dinâmica sem luz (DSL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Diferença não significativa entre os grupos representado por letras iguais ($p > 0,05$), teste de Tukey.

Segundo Kim e colaboradores (2006) a soja é uma rica fonte de isoflavonas e compostos fenólicos. As isoflavonas primárias presentes na soja total incluem glicosídeos de genisteína e daidzeína, enquanto os ácidos clorogênico, gálico e ferúlico formam os principais compostos fenólicos. Porém até o momento existem poucos trabalhos que avaliam a atividade antioxidante de subprodutos da soja como a casca, o que dificulta na comparação dos resultados obtidos.

Na Figura 14 estão ilustrados o rendimento de fenóis totais em grama por grama de extrato seco obtido das amostras das cascas da semente do algodão e das cascas da soja. Esta última mesmo apresentando maior rendimento de extrato seco como mostra a Figura 9 apresentou quantidades de compostos fenólicos bem inferiores aos dos extratos das cascas da semente do algodão. E entre estes o que apresentou maior quantidade foi o produzido por maceração dinâmica com 12,48 mg EAG/g de amostra bruta de amostra bruta. O extrato que apresentou o menor valor foi o extrato produzido por maceração estática sem luz (ESL) com 6,45 mg EAG/g de amostra bruta. Para os extratos da casca da soja o intervalo de obtido foi de 2,66 a 4,04 mg EAG/g de amostra bruta. Esses valores obtidos para a casca da soja podem estar relacionados a baixa eficiência extrativa observada na análise de teor de extrativos.

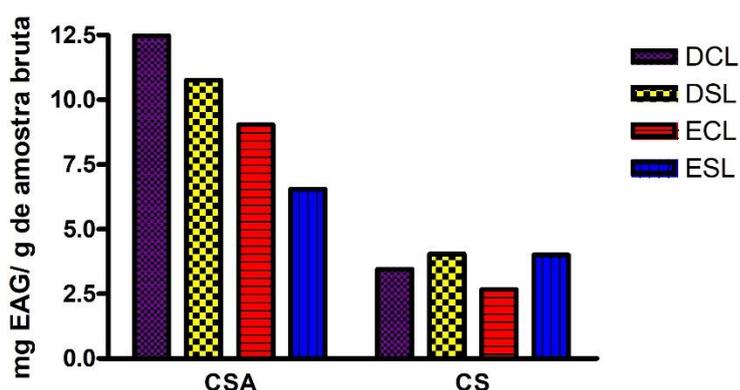


Figura 13. Rendimento de compostos fenólicos em mg EAG/g de amostra bruta das cascas da semente do algodão (CSA) e cascas de soja (CS).

6.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

6.3.1. DPPH

Sánchez-Moreno e colaboradores (1998) propuseram uma metodologia para a avaliação da atividade antioxidante levando em conta não somente a concentração do antioxidante, mas também o tempo de reação necessário para sequestrar este radical, introduzindo assim a eficiência antirradicalar como um novo parâmetro.

Três são os tipos de cinética existentes que podem ser observadas ao realizar estudos com DPPH, devido às interações diferenciadas das amostras com o radical. Na literatura são descritos compostos que possuem cinética lenta (que demoram mais de uma hora para reagir), cinética intermediária (5 a 30 minutos) e cinética rápida que levam poucos segundos para observar a redução do radical (CARPES, 2008; ARBOS, 2009; REZENDE, 2010; LEAL, 2015). O ensaio com DPPH leva em conta a influência da estrutura do composto. Para cada composto químico o DPPH apresenta uma cinética diferente devido ao seu radical de nitrogênio estável e por essa razão, alguns antioxidantes podem reagir de forma diferente ou até mesmo não reagir (MISHRA et al, 2012)

A realização de um estudo cinético para determinação da atividade antioxidante é de extrema importância porque apesar de o DPPH ser um método que avalia a atividade antioxidante de diversos compostos, é necessário verificar se não há a interferência da amostra com o radical. Outra justificativa para a presença do estudo cinético é a de o próprio radical se degradar rapidamente, portanto é necessário acompanhar o perfil cinético a fim de se conhecer o comportamento da amostra frente à atividade antioxidante (PRADO, 2009; LEAL, 2015).

A Figura 15 exibe o gráfico que mostra o comportamento dos extratos metanólicos dos resíduos agroindustriais da casca da semente do algodão frente ao radical DPPH •. Três concentrações foram analisadas, no entanto, apenas a concentração de 0,5 mg/mL foi analisada estatisticamente para determinação do tempo ideal de reação.

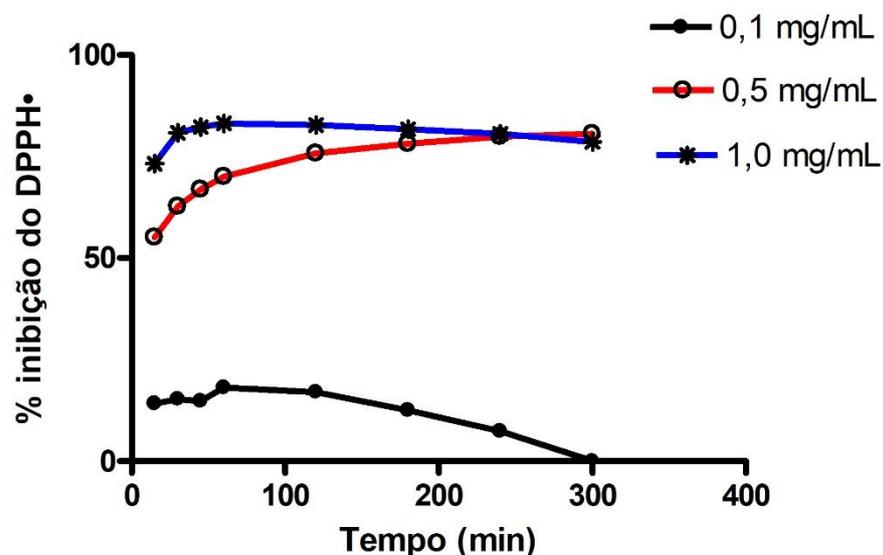


Figura 14. Cinética da inibição do radical DPPH pelo extrato metanólico da casca da semente do algodão em diferentes concentrações.

A curva cinética da casca da semente do algodão foi lenta nas três concentrações. A concentração 1,0 mg/mL consumiu aproximadamente 83% do DPPH em 60 minutos. Enquanto que para as concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL no mesmo tempo a inibição do radical foram de aproximadamente 70% e 18%, respectivamente. Com isso podemos notar que conforme as concentrações do extrato metanólico do resíduo CSA foram diluídas, houve uma menor interação com o radical, demonstrando a influência da concentração para a execução do método de determinação da atividade antioxidante (CARMONA-JIMÉNEZ, 2014).

Os dados das concentrações 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL quando analisados indicaram que o tempo necessário para que a casca da semente do algodão atinja a sua atividade antioxidante máxima é de 180 minutos, momento onde essa atinge um platô e onde não existe diferença significativa quando comparada com os outros tempos.

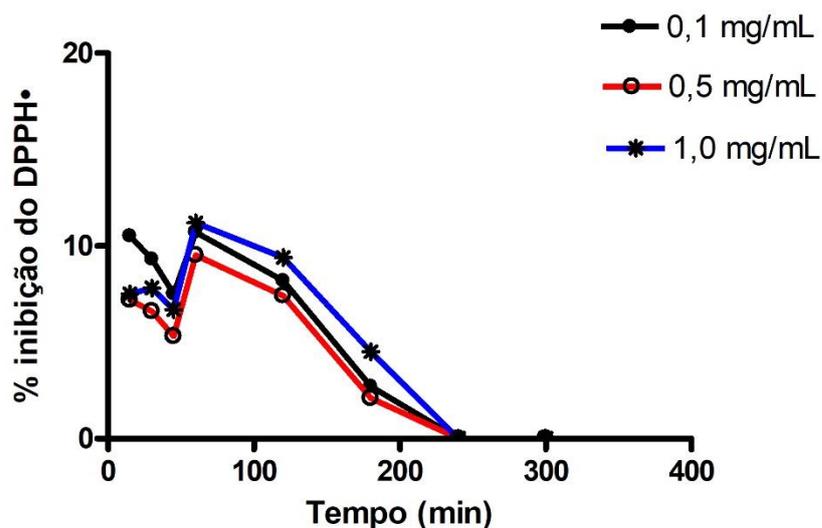


Figura 15. Cinética da inibição do radical DPPH pelo extrato metanólico da casca da soja em diferentes concentrações.

Os extratos metanólicos do resíduo da casca da soja não apresentaram atividade antioxidante significativa para nenhuma das concentrações analisadas como podemos observar na Figura 16. Resultado este contraditório ao que era esperado tendo em vista que a soja possui vários compostos bioativos entre eles isoflavonas e vitamina E que proporcionam inúmeros benefícios a saúde incluindo proteção contra o estresse oxidativo (Tripathi & Misra, 2005). Isto pode ser explicado, em parte, pela baixa eficiência de extração (menor que 50% dos compostos extraíveis foram efetivamente extraídos) do método/solvente empregados.

Diversas são maneiras de interpretação dos resultados provenientes do ensaio de DPPH. A maioria dos resultados são expressos como valor de CE₅₀ ou CI₅₀, que é definida como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH• em 50% (Brand-Williams et al., 1995; Chen; Bertin; Frolidi, 2012). Outra maneira de expressar os resultados é interpolar os valores da absorbância em uma curva dose-resposta de um antioxidante padrão, como o Trolox e expressar os resultados em concentração em equivalentes de Trolox (Oliveira, 2015)

Conforme os resultados obtidos para fenóis totais, o extrato que apresentou maior atividade antioxidante no ensaio de DPPH foi o produzido por maceração dinâmica com exposição à luz com $335,6 \pm 19,84 \mu\text{M}$ equivalente de Trolox para a concentração de $0,3 \text{ mg/mL}$. Esse obteve diferença significativa estatisticamente em relação aos demais. Os extratos produzidos por maceração dinâmica sem luz (DSL) e o estático com luz (ECL) não apresentaram diferenças estatísticas entre si com resultados de $285,1 \pm 7,59$ e $281,9 \pm 5,97 \mu\text{M TEAC/g}$ extrato seco, respectivamente. O ESL foi que apresentou a menor atividade antioxidante com apenas $183,4 \pm 15,91 \mu\text{M TEAC / g}$ de extrato seco. A Figura 17 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de DPPH para os extratos produzidos a partir do resíduo do algodão.

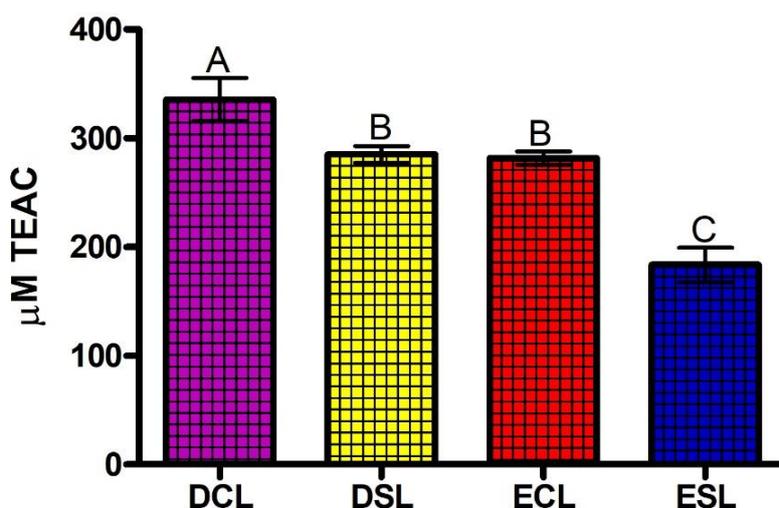


Figura 16. Atividade antioxidante da casca da semente do algodão obtido por maceração dinâmica sem exposição à luz (DSL), com exposição à luz (DCL), e maceração estática sem exposição à luz (ESL) e com exposição à luz (ECL), pelo método DPPH na concentração de $0,3 \text{ mg/mL}$ por 180 minutos. Cada barra representa a média com \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$), teste de Tukey.

6.3.2. ABTS

Na Figura 18 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante expressos em μM de TEAC/g dos extratos obtidos, pelo método ABTS ((2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido-sulfônico)), a partir das cascas da semente do algodão. O extrato produzido por maceração dinâmica sem exposição à luz ambiente (DSL) apresentou a maior atividade com média de $207,6 \pm 21,23$ diferindo significativamente ($p < 0,001$) dos outros extratos. O ECL obteve $180,7 \pm 7,06$ de atividade antioxidante em equivalente de Trolox. Enquanto o que apresentou menor atividade foi o obtido por maceração estática sem exposição à luz (ESL) com atividade antioxidante de $103,1 \pm 6,37 \mu\text{M TEAC}$.

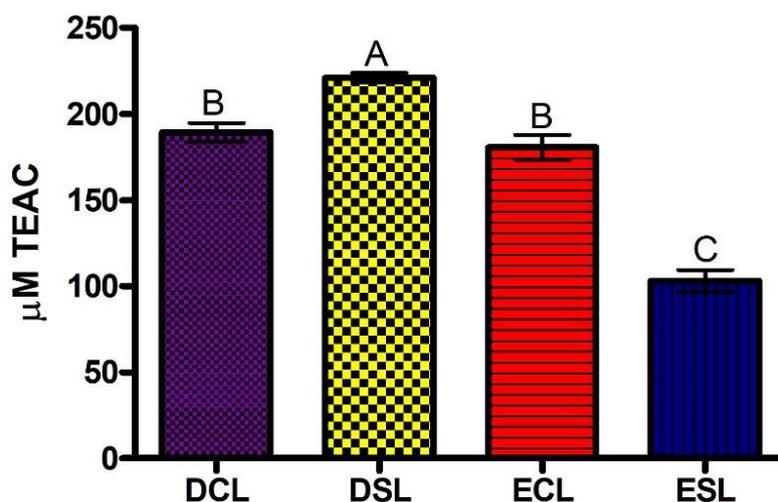


Figura 17. Atividade antioxidante expressa em equivalente de trolox ($\mu\text{M TEAC/g}$ de extrato seco) nos extratos do resíduo das cascas da semente de algodão obtidos por maceração com as variações dinâmica sem luz (DSL), dinâmica com luz (DCL), estática com luz (ECL) e estática sem luz (ESL), pelo método de ABTS. Cada barra representa a média com \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$) por teste de Tukey.

6.4. ESTABILIDADE OXIDATIVA EM APARELHO RANCIMAT

A determinação da atividade antioxidante por meio desta metodologia avalia o potencial do extrato como aditivo em meios ricos em lipídios, evitando a oxidação lipídica. O tempo necessário para gerar compostos secundários perceptíveis pelo equipamento é chamado de Tempo de Indução (TI), é caracterizado pela mudança na condutividade da água deionizada devido aos produtos gerados no processo (LÄUBLI; BRUTTEL, 1986). Na Figura 18 estão apresentados os resultados obtidos para o ensaio de estabilidade oxidativa através do aparelho Rancimat para a casca da semente do algodão. O extrato produzido por maceração de dinâmica com exposição à luz apresentou o maior tempo de indução com diferença significativa quando comparado aos outros extratos e a amostra controle (branco) que continha apenas com a banha suína. O ESL apresentou a menor tempo indução ficando abaixo do tempo de indução do branco e enquanto o DSL e o ECL apresentaram equivalentes tempos entre si e com o branco.

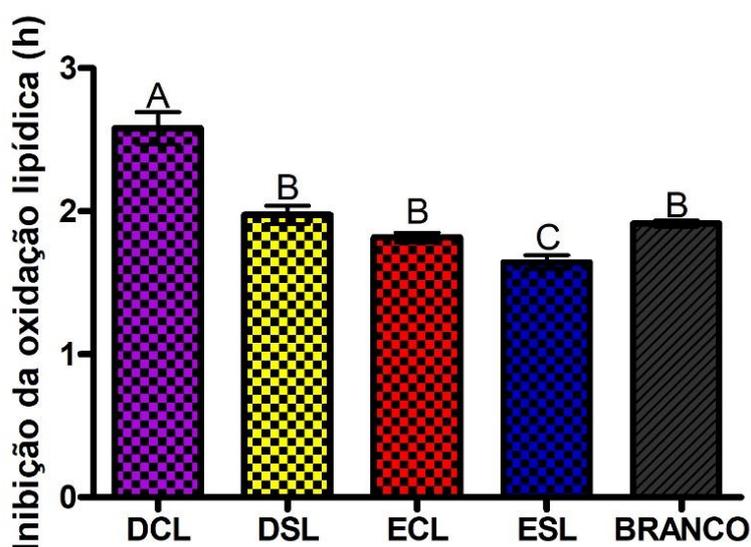


Figura 18. Inibição da oxidação lipídica (h) para os extratos da casca da semente do algodão. Cada barra representa a média com \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$) no teste de Tukey.

O tempo de indução (TI) é um parâmetro comparativo muito utilizado para controle de qualidade de matérias-primas e de processo para se avaliar a eficiência da adição de antioxidantes a oxidação acelerada, sob condições padronizadas. Desenvolvida por HADORN & ZURCHER (1974), a técnica de determinação da estabilidade oxidativa tem como finalidade o aumento da condutividade elétrica, utilizando o equipamento denominado Rancimat. Neste aparelho, o fluxo de ar passa através da banha suína (mantida sob aquecimento em temperatura de 110 °C), depois borbulha em água deionizada, arrastando os ácidos carboxílicos voláteis (principalmente ácido fórmico), gerados do processo de oxidação, que se solubilizam, aumentando a condutividade elétrica da água (ANTONIASSI, 2001).

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de estabilidade oxidativa medida pelo aparelho Rancimat para os extratos da casca da soja.

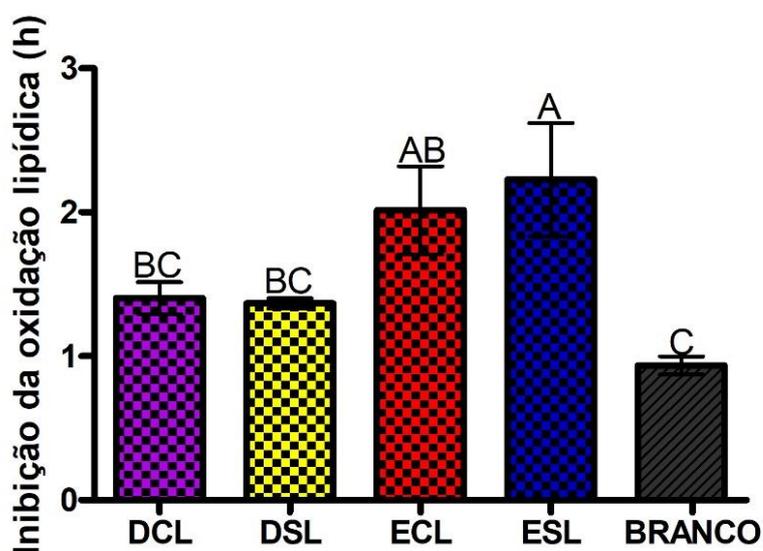


Figura 19. Inibição da oxidação lipídica (h) para os extratos da casca da semente da soja. Cada barra representa a média com \pm desvio padrão. Diferença significativa entre os grupos representado por diferentes letras ($p < 0,05$ no teste de Tukey).

Os extratos obtidos por maceração estática apresentaram os maiores tempos de indução com diferença significativa quando comparados ao branco. Foram equivalentes os extratos produzidos por maceração dinâmica. Com isso pode-se

sugerir que os extratos analisados não solubilizaram de maneira eficiente a banha na banha suína por possuírem composto majoritariamente polares.

6.5. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A análise de correlação apresentou resultados positivos entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante como mostra a Tabela 2. Os ensaios de DPPH e ABTS apresentaram correlação positiva entre si com $R=0,86$ e entre o Rancimat foi de $R=0,79$ para o DPPH e $R= 0,70$ para o ABTS. Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso com seis repetições, para a análise das variáveis DPPH e ABTS e com três repetições, para a análise das variáveis teor total de fenóis e rancimat. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o *software* R Core Team (2013).

As análises de correlação linear de Pearson, entre todas as variáveis, basearam-se na significância de seus coeficientes. A classificação de intensidade da correlação para $p \leq 0,05$ foi: muito forte ($r \pm 0,91$ a $\pm 1,00$), forte ($r \pm 0,71$ a $\pm 0,9$), média ($r \pm 0,51$ a $\pm 0,70$), fraca ($r \pm 0,31$ a $\pm 0,50$) e muito fraca ($r \leq \pm 0,30$) (CARVALHO et al., 2004). Diante disso, podemos classificar a correlação da concentração de Fenóis Totais das cascas da soja e o teste de estabilidade oxidativa Rancimat como muito fraca tendo em vista que a mesma apresentou $R= -0,17$.

Tabela 2. Matriz de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas para a semente da casca de algodão (CSA) e casca da soja (CS).

	DPPH	ABTS	Rancimat
Fenóis Totais (CSA)	0.96**	0.84**	0.80**
DPPH (CSA)		0.86**	0.79**
ABTS (CSA)			0.70*
Fenóis Totais (CS)			-0.17 ^{ns}

** e *: Significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste t; ns: não significativo.

7. CONCLUSÃO

A maceração dinâmica foi a técnica mais eficiente na extração de compostos fenólicos e como consequência disso a que apresentou maior atividade antioxidante. A maceração estática apesar de resultar em rendimentos de extrato seco equivalentes e em alguns casos até superior à maceração dinâmica para as amostras analisadas, apresentou teor de fenóis totais e atividade antioxidante inferiores a DCL, com exceção dos extratos de casca de soja pelo método rancimat. Quando fixamos a questão da agitação, e comparamos apenas o efeito da luz, podemos verificar que não foi vantajoso produzir os extratos ao abrigo da luz, tendo em vista que os extratos produzidos ao abrigo da luz apresentaram concentrações de fenólicos equivalentes aos que foram expostos, e as atividades antioxidantes sempre foram iguais ou inclusive menores para as amostras protegidas da luz.

Os extratos produzidos a partir da casca da semente do algodão apresentaram concentração fenólica e atividade antioxidante superior comparado a casca da soja para os métodos de DPPH, ABTS e Rancimat. A cinética de inibição do radical DPPH foi de 3 horas para a CSA.

Existe uma alta correlação entre os métodos antioxidantes empregados e o teor de fenólicos totais. O método de rancimat é o que menos se correlaciona, provavelmente pela maior polaridade dos compostos em questão, tendo em vista que a técnica privilegia compostos apolares, solúveis no meio reacional lipídico empregado.

8. REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; FILHO, J. C. S.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes.
- AJILA, C. M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. 2007, 105, 982.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>> Acesso em: 17 out. 2017.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127, pp. 183-198, 2002.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. B. CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, jul./dez. 2001.
- ARAÚJO, A. D., SILVA, C. D., FREIRE, E., COSTA, J., AMARAL, J. D., MEDEIROS, J. D. C., FIRMINO, P. D. T. (2003). **Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar**. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Arranz, S.; Cert, R.; Pérez-Jiménez, J.; Cert, A.; Saura-Calixto, F. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chem.*, 2008, 110(4), 985–990.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. 2006, 99, 191–203.
- BELTRÃO, N.E.M. O que fazer com a semente de algodão? 2000. Disponível em <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/o-que-fazer-com-a-semente-de-algodao> Acesso em: outubro 2017.
- BIODIESELBR. Matéria-Prima para Biodiesel. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/plantas/oleaginosas/index.htm>> Acesso em 07 nov. 2017.

BRASIL. Lei nº 12.305, de agosto de 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília- DF, 2010.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Boletim dos Biocombustíveis nº 109 maio-junho de 2017.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010.

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

CARDOSO, I. C.; PEREIRA, H. M. G.; TAPPIN, M. R. R.; BEHRENS, M. D. Influence of extraction technique and particle size of the plant material in the content of total phenolic compounds of tincture of *Alpinia zerumbet* leaves. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, Supl, 1-126, 2017.

CARMONA-JIMÉNEZ, Y; GARCÍA-MORENO, V; IGARTUBURU, J.M; BARROSO, C.G. Simplification of the DPPH assays for estimating the antioxidant activity of wine and Wine by-products. *Food Chemistry*. v. 165, p. 198-204, 2014.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; BENIN, G. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal**. Pelotas: Universitárias da UFPel, 2004.

CHENG, Z., MOORE, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical assay. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*, 54, 7429–7436.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, v. 138, n. 1, p. 414-420, 2013

CORTÉS-ROJAS, D. F. Extratos secos padronizados de *Bidens pilosa* L.: Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade biológica. Ribeirão Preto, 2011.

COSTA, F. I. B. Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de farinhas produzidas a partir dos resíduos de Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Cam.) e Maracujá do Mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). Dissertação de mestrado, 2013.

CGEE; Química Verde no Brasil: 20102030, Centro de Estudos e Gestão Estratégicos: Brasília, 2010.

CROZIER, A., et al. . Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

CRUZ, R. G. Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico. Dissertação de mestrado, 2014.

DEMAJORIVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. *Revista de Administração de Empresas*, São Paulo, v.35, n.3, p.88-93, 1995.

GEOFFROY, T. R. MEDA, N. R. STEVANOVIC, T. Suitability of DPPH spiking for antioxidant screening in natural products: the example of galloy derivatives from red maple bark extract. **Anal Bioanal Chemistry** (2017) 409:5225–5237.

JARA-PALACIOS, M. J. et al. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v. 183, p. 78-82, 2015.

Kim, J. A., Jung, W. S., Chun, S. C., Yu, C. Y., Ma, K. H., Gwag, J. G., et al. (2006). A correlation between the level of phenolic compounds and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max* L.) varieties. **European Food Research and Technology**, 224, 259–270.

LARRAURI J.A. et al. Measurement of health promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. **Journal Science Food Agriculture**, v. 71, p. 515-519, 1996

LACHMAN, J. et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **Food Science and Technology**, v.43, p. 52–58, 2010

LÄUBLI, M. W.; BRUTTEL, P. A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 6, p. 792–795, 1986.

LEAL, L. P. V. Síntese e Avaliação da cinética da reação de compostos imidazo[4,5-C]-4,5,6,7-tetrahidropiridina frente aos radicais DPPH e ABTS. Apucarana, 2015.

MATTEI, L. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): Trajetória, Situação Atual e Desafios. Volume 41, Nº 04, outubro – dezembro, 2010.

MELO, P. S. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, jun, 2011.

MISHARA, K. OJHA, H. CHAUDHURY, NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**. 2012; 130:1036–43. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127.

MOURE, A. Cruz, J. Franco, D. Dominguez, J. Sineiro, J. Dominguez, H. Núñez, M. Parajó, J. Natural antioxidants from residual sources, **Food Chemistry**, Barking, v. 72, n. 1, p. 145-171, 2001.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.

OKONOGI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S.; Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, Kidlington, v.103, n.33, p.839-846, 2007.

POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Antioxidants in food practical applications. Boca Raton: CRC Press, 2001.380p.R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SUILTER, A. RUIZ, R. SCARLATA, C. SLUITER, J. TEMPLETON, D. **Laboratory analytical procedure (LAP): determination of extractives in biomass**. Golden, CO, USA: National Renewable Energy Laboratory; 2008. Report No.: NREL/TP-510-42619.

TRIPATHI, A. K., & MISRA, A. K. Soybean-a consummate functional food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 2, 42–46, 2005.

ZHANG J, YUAN K, ZHOU W, ZHOU J, YANG P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimmosa pudica* Linn. From southern China. **Pharmacognosy Magazine**. 2011.