



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos

**THAÍS DOLFINI ALEXANDRINO**

**OBTENÇÃO DE INGREDIENTES FRACIONADOS A PARTIR DA FARINHA DE  
GIRASSOL E AVALIAÇÃO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS,  
FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS**

CAMPINAS

2017

THAÍS DOLFINI ALEXANDRINO

OBTENÇÃO DE INGREDIENTES FRACIONADOS A PARTIR DA FARINHA DE  
GIRASSOL E AVALIAÇÃO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS,  
FUNCIONAIS E NUTRICIONAIS

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Tecnologia de Alimentos para obtenção do  
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.*

Aluna: Thaís Dolfini Alexandrino

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Bertoldo  
Pacheco

Este exemplar corresponde à versão final da *Dissertação defendida pela aluna Thaís  
Dolfini Alexandrino e orientada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Bertoldo Pacheco.*

CAMPINAS

2017

Agência: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)  
Nº do proc.: projeto 402022 / 2014-9 e bolsa 133901/2015-7

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO ITAL

Instituto de Tecnologia de Alimentos

Biblioteca Central do ITAL

Adriana Gomes do Nascimento CRB/8 8853.

A382                    Alexandrino, Thais Dolfini. Obtenção de ingredientes fracionados a partir da farinha de girassol e avaliação de algumas características químicas, funcionais e nutricionais. Thais Dolfini Alexandrino / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2017. 89f.

Orientadora: Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Inclui bibliografia

1. Girassol. 2. Isolado proteico de girassol. 3. Concentrado fibroso. 4. Extrato fenólico. 5. Atividade antioxidante. I. Pacheco, Maria Teresa Bertoldo. II. Instituto de Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Fractionated ingredients obtained from sunflower flour and evaluation of some chemical, functional and nutritional characteristics

Palavras-chave em inglês: Sunflower, sunflower protein isolate, fibrous concentrate, phenolic extract, antioxidant activity

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Vera Sônia Nunes da Silva, Marta Cristina Teixeira Duarte

Data da Defesa: 10 de fevereiro de 2017

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Thaís Dolfini Alexandrino, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de fevereiro de 2017.



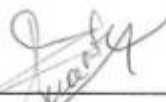
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Teresa Bertoldo Pacheco  
CCQA/ITAL - (Presidente)



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vera Sônia Nunes da Silva  
CCQA/ITAL - (Titular)



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte  
CPQBA/UNICAMP - (Titular)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me sustentado e me ensinado a ter mais fé e humildade em tudo;

aos meus pais e minha irmã por todo incentivo e apoio incondicional;

à professora Maria Teresa Bertoldo Pacheco pela paciência e dedicação, além de todo aprendizado nesses dois anos de convivência;

ao CNPq pela concessão da bolsa e apoio ao projeto;

ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL por toda estrutura concedida para realização desse trabalho. Em especial agradeço à todos os funcionários e colaboradores que me auxiliaram no laboratório, especialmente à Rosana;

à colaboração de todos os coautores nas análises e redação dos artigos desenvolvidos;

aos meus amigos e colegas do programa de mestrado, Esther, Luana, Marília, Diogo, Luís, Karen e todos os outros, pelas alegrias e momentos importantes compartilhados.

## RESUMO

O girassol (*Helianthus annus* L.) é uma oleaginosa cujo óleo é amplamente explorado e gera em seu processamento um farelo com alto teor proteico, rico em fibras e compostos fenólicos. Devido ao seu elevado teor de compostos fenólicos, o farelo tem sido destinado, principalmente para alimentação de ruminantes. O subproduto apresenta sabor adstringente e coloração verde escura. Desta forma, este estudo objetivou o aproveitamento integral dos grãos descascados de girassol para obtenção de produtos destinados a alimentação humana. Para retirada dos compostos fenólicos da farinha desengordurada foram utilizadas 3 soluções extratoras: etanol 70%, bissulfito de sódio 0,1% e mistura de bissulfito de sódio e etanol 70% (70:30). Assim, a partir da farinha foram obtidas, para cada solução extratora, três frações: isolado proteico, concentrado fibroso e extrato rico em compostos fenólicos. Dois extratos foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos e avaliados *in vitro* as atividades antioxidante (DPPH e ABTS), antimicrobiana (concentração inibitória mínima) e antiproliferativa contra 9 linhagens de células tumorais e 1 linhagem não tumoral. A eficiência de extração dos compostos fenólicos foi avaliada nos 3 isolados proteicos obtidos. Os isolados proteicos e concentrados fibrosos foram caracterizados quimicamente e os isolados avaliados quanto aos aspectos físico-químicos (cor e estabilidade térmica), funcionais (solubilidade) e nutricionais (escore químico de aminoácidos e digestibilidade). Os isolados apresentaram conteúdo proteico acima de 92,00 g/100 g e fenólicos inferiores a 0,45 g/100 g. Todos apresentaram elevada solubilidade proteica (> 84,22%), bem como digestibilidade *in vitro* (> 90,00%). Os fenólicos mesmo em quantidade residuais afetaram a coloração e digestibilidade dos isolados. A lisina foi o aminoácido limitante para todas as amostras. Os concentrados fibrosos, além das fibras como componente principal, apresentaram um considerável conteúdo proteico. O conteúdo de fenólicos totais nos extratos foram determinados em equivalente de ácido gálico (AG) e clorogênico (ACG) e resultaram em 92,7 mg AG eq/g e 154,35 mg eq ACG/g para o etanol 70%. A atividade antimicrobiana do extrato elaborado com bissulfito de sódio se mostrou mais efetiva contra as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (CIM 3,00 mg/mL) e Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* (CIM 2,50 mg/mL). Os extratos não mostraram atividade

citotóxica contra a proliferação de células tumorais. A potencialidade do uso integral da farinha foi demonstrada e as características e propriedades dos produtos obtidos se mostraram apropriadas para aplicação como ingrediente alimentar.

**Palavras-chave:** girassol, isolado proteico de girassol, concentrado fibroso, extrato fenólicos, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an oleaginous whose oil is widely exploited and is generates in its processing a high protein content meal, rich in fibers and phenolic compounds. Due to the high content of phenolic compounds, the meal has been destined mainly for ruminant feed. The by-product presented astringent taste and dark green coloring. Thus, this study aimed the integral use of the sunflower dehulled grains to obtain products destined for human consumption. For the removal of the phenolic compounds from the defatted flour, three extractive solutions were used: 70% ethanol, 0.1% sodium bisulfite and 70% sodium bisulfite and 70% ethanol. Therefore, for each extractive solution, three fractions were obtained: protein isolate, fibrous concentrate and extract rich in phenolic compounds. Two extracts were characterized in terms of phenolic compounds content and evaluated *in vitro* antioxidant (DPPH and ABTS), antimicrobial (minimal inhibitory concentration) and antiproliferative activities in 9 tumor cell lines and 1 non-tumoral lineage. The phenolic compounds extraction efficiency was evaluated in the 3 protein isolates obtained. Protein isolates and fibrous concentrates were characterized chemically and the isolates assessed regarding to physicochemical (color and thermal stability), functional (solubility) and nutritional aspects (chemical score of amino acids and digestibility). The isolates presented protein content above 92.00 g / 100 g and phenolics below 0.45 g / 100 g. In general all isolates presented high protein solubility (> 84.22%), as well as *in vitro* digestibility (> 90.00%). Although in low amount the residual phenolics affected the coloration and digestibility of the isolates. Lysine was the limiting amino acid for all samples. The fibrous concentrates, besides the fibers as main component, presented a substantial protein content. The total phenolic content in the extracts was determined in gallic (GA) and chlorogenic acid (ACG) equivalents and resulted in 92.7 mg AG eq / g and 154.35 mg eq ACG / g for 70% ethanol. The antimicrobial activity of the extract prepared with sodium bisulfite showed to be more effective against Gram-positive *Staphylococcus aureus* (MIC 3.00 mg / mL) and Gram-negative *Salmonella choleraesuis* (MIC 2.50 mg / mL) bacteria. The extracts did not present cytotoxic activity against the proliferation of tumor cells. The potential of the integral use of flour was demonstrated and the obtained products exhibited characteristics and properties suitable for application as



food ingredient.

**Keywords:** sunflower, sunflower protein isolate, fibrous concentrate, phenolic extract, antioxidant activity.

## ÍNDICE

RESUMO .....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
Objetivo Geral.....	3
Objetivos Específicos .....	3
CAPÍTULO 1.....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: GIRASSOL E INGREDIENTES FRACIONADOS OBTIDOS A PARTIR DA FARINHA DE GIRASSOL .....	4
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
1.1 GIRASSOL .....	5
1.1.1 Composição química.....	5
1.2 PROTEÍNAS DO GIRASSOL .....	6
1.2.1 Propriedades funcionais das proteínas do girassol .....	7
1.2.2 Obtenção de produtos proteicos de girassol .....	8
1.2.3 Utilização das proteínas do girassol.....	10
1.3 FIBRAS DO GIRASSOL.....	11
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS DO GIRASSOL.....	11
1.4.1 Propriedades ativas dos compostos fenólicos.....	12
1.4.2 Principal composto fenólico do girassol .....	13
1.4.3 Determinação do ácido clorogênico .....	14
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
CAPÍTULO 2.....	27
FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES DA FARINHA DE GIRASSOL: AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E NUTRICIONAL DAS FRAÇÕES .....	27
Resumo .....	28
1. Introdução.....	28

2. Materiais e métodos .....	30
2.1. Materiais .....	30
2.2. Obtenção do concentrado fibroso (SFC) e isolado proteico convencional (SI) .....	30
2.2.1 Tratamento para redução dos fenólicos e obtenção dos componentes fracionados .....	30
2.3. Rendimento de proteína e eliminação dos compostos fenólicos .....	32
2.4. Determinação da composição química .....	32
2.5. Cor .....	32
2.6. Solubilidade proteica em água .....	32
2.7. <i>Differential scanning calorimetry</i> (DSC) .....	33
2.8. Determinação do perfil de aminoácidos .....	33
2.9. Valor nutricional .....	33
2.10. Análise estatística .....	34
3. Resultados e discussão.....	34
3.1. Composição química, rendimento de extração proteica e eliminação de fenólicos.....	34
3.2. Cor dos isolados proteicos.....	37
3.3. Solubilidade e estabilidade térmica dos isolados proteicos .....	38
3.4. Avaliação nutricional .....	40
4. Conclusão .....	42
Referências .....	43
CAPÍTULO 3 .....	49
POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO E ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATO FENÓLICO DE GIRASSOL ( <i>Helianthus annuus</i> L.).....	49
Resumo.....	50
1. Introdução .....	50
2. Material e métodos.....	52

2.1. Material.....	52
2.2. Preparação da farinha de girassol.....	52
2.3. Extração dos compostos fenólicos da farinha de girassol.....	52
2.4. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	53
2.5. Capacidade de captura do radical DPPH.....	53
2.6. Capacidade de captura do radical ABTS.....	54
2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana pela concentração inibitória mínima (CIM).....	54
2.8. Atividade antiproliferativa.....	55
2.9. Análise estatística.....	57
3. Resultados e discussão.....	57
3.1. Compostos fenólicos totais extraídos.....	57
3.2. Atividade antioxidante.....	58
3.3. Atividade antimicrobiana.....	60
3.4. Avaliação da atividade antiproliferativa.....	62
4. Conclusão.....	64
Referências.....	65
CONCLUSÕES.....	71
ANEXOS.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA - aminoácido
- ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- ACG - ácido clorogênico
- AG - ácido gálico
- AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*
- AOAS - *American Oil Chemists' Society*
- BS - bissulfito de sódio
- BHT - *butylated hydroxyl toluene*
- CIM - concentração inibitória mínima
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CS - escore químico
- CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono
- DAD - *diode array*
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DSC - *Differential scanning calorimetry*
- EC<sub>50</sub> - concentração para extingui 50% dos radicais
- ESI - *electrospray*
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
- FCB - concentrado fibroso de girassol extração dos fenólicos com solução de bissulfito de sódio 0,1%
- FCE - concentrado fibroso de girassol extração dos fenólicos com solução de etanol 70%
- FCM - concentrado fibroso de girassol extração dos fenólicos com solução de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30)
- HaCat - Linhagem celular humana de queratinócito
- HPLC - *high performance liquid chromatography*
- HT29 - Linhagem celular tumoral humana de cólon
- ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

K562 - Linhagem celular tumoral humana de leucemia  
MCF-7 - Linhagem celular tumoral humana de mama  
MS - espectrômetro de massa  
ND - não determinado  
NCI - *National Cancer Institute*  
NCI-ADR/RES - Linhagem celular tumoral humana de ovário (fenótipo de multiresistência)  
NCI-H460 - Linhagem celular tumoral humana de pulmão (tipo não pequenas células)  
NIC - não inibiu o crescimento  
OGM - organismo geneticamente modificado  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
ONU - Organização das Nações Unidas  
OVCAR-03 - Linhagem celular tumoral humana de ovário  
PC-3 - Linhagem celular tumoral humana de próstata  
PDCAAS - aminoácidos corrigidos pela digestibilidade da proteína  
SFB - soro fetal bovino  
SFC - concentrado fibroso de girassol convencional  
SI - isolado proteico de girassol convencional  
SIB - isolado proteico de girassol extração dos fenólicos com solução de bissulfito de sódio 0,1%  
SIE - isolado proteico de girassol extração dos fenólicos com solução de etanol 70%  
SIM - isolado proteico de girassol extração dos fenólicos com solução de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30)  
TCA - *trichloroacetic acid*  
TEAC - mmol de equivalentes Trolox por g de extrato liofilizado  
TROLOX - ácido (S)-6-metoxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico  
U251 - Linhagem celular de glioma humano  
UV - ultravioleta  
786- 0 - Linhagem celular tumoral humana de rim

## INTRODUÇÃO

A cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.) tem importância econômica para produção mundial de óleos comestíveis. O interesse mundial por esta cultura é associado não somente à excelente qualidade do óleo, mas também por não ser uma planta geneticamente modificada (WILDERMUTH et al., 2016). Do processamento do óleo é gerado um subproduto de elevado teor proteico, o farelo, que até o momento têm sido utilizados apenas para alimentação de ruminantes. Contudo, esta demanda é insuficiente para utilização total do farelo proveniente da produção de óleo (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2002; PEDROSA et al., 2000).

Devido à qualidade e ao conteúdo de proteínas presentes, o farelo de girassol, poderia ser destinado à alimentação humana, assim como o de soja. Entretanto, sua aplicação na alimentação humana tem como principal fator limitante a presença de elevado conteúdo de compostos fenólicos (1 a 4%). Na produção de isolados e concentrados proteicos pelo método convencional, utilizando pH alcalino, os compostos fenólicos são oxidados e se ligam as proteínas. Esta reação é indesejável, pois interfere principalmente no aspecto visual, sensorial e nutricional do produto, conferindo-lhe uma coloração esverdeada, sabor adstringente, além de afetarem algumas propriedades das proteínas. Sendo assim, medidas de redução no conteúdo de fenólicos do farelo de girassol são importantes para possibilitar sua exploração na produção de novos ingredientes (GONZÁLEZ-PÉREZ e VEREIJIKEN, 2007). Para superar esta limitação, há uma contínua busca por metodologias para extração dos fenólicos do farelo de girassol. Até o momento, não existe um consenso do melhor processo a ser empregado, com viabilidade técnica e econômica para a indústria. A viabilidade tecnológica deve incluir, além da extração dos fenólicos, um concomitante e significativo rendimento proteico, com manutenção das propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas (WILDERMUTH et al., 2016).

As metodologias propostas na literatura focam apenas na produção dos produtos proteicos, sendo que, outros componentes majoritários, depois das proteínas, acabam não sendo explorados. Como é o caso das fibras do farelo, ingrediente com apelo de funcionalidade em muitos produtos, e os próprios compostos fenólicos extraídos. Os compostos fenólicos apresentam elevado

potencial de aplicação devido as suas características antioxidantes. A exploração das suas características antioxidantes vem de encontro a atual procura por antioxidantes naturais para serem adicionados em alimentos ou utilizados em embalagens ativas.

O objetivo deste trabalho foi propor um processo tecnológico para aproveitamento integral dos grãos de girassol, com redução dos fenólicos na farinha, caracterização e avaliação das frações obtidas. Deste forma, os resultados ampliam as possibilidades de aplicações em produtos alimentícios, resultando paralelamente em valorização da sua cadeia produtiva e atendimento à tendência global de uma agricultura sustentável.

O capítulo 1 deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto. Os artigos dos capítulos 2 e 3 foram redigidos conforme as normas das revistas *LWT- Food Science and Technology* e *Food Chemistry*, respectivamente.

### **Referências Bibliográficas**

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; MERCK, K. B.; VEREIJKEN, J. M.; VAN KONINGSVELD, G. A.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1713-1719, 2002.

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

PEDROSA, M. M.; MUZQUIZ, M.; GÁRCIA-VALLEJO, C.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; AYET, G.; ROBREDO, L. M. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 4, p. 459-464, 2000.

WILDERMUTH, S. R.; YOUNG E. E.; WERE L. M. Chlorogenic acid oxidation and its reaction with sunflower proteins to form green-colored complexes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.0, p. 1-15, 2016.



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Aproveitamento integral dos grãos descascados de girassol para obtenção de produtos destinados a alimentação humana, onde a farinha desengordurada foi submetida a um processo para produção concomitantemente de um extrato rico em compostos fenólicos, isolado proteico e um concentrado fibroso.

### Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar quimicamente a matéria-prima (grãos com casca e sem casca), farinha desengordurada, isolados proteicos e concentrados fibrosos produzidos.
- ✓ Extrair os compostos fenólicos da farinha aplicando diferentes soluções e obter um extrato bruto de compostos fenólicos.
- ✓ Fracionar a farinha com teores reduzidos de compostos fenólicos em isolado proteico e concentrado fibroso.
- ✓ Avaliar os isolados proteicos quanto ao: rendimento de extração proteica, cor, ácido clorogênico residual, estabilidade térmica, solubilidade proteica e avaliação nutricional *in vitro* das proteínas.
- ✓ Avaliar extratos de compostos fenólicos obtidos quanto ao teor de compostos fenólicos e capacidades: antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa.

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: GIRASSOL E INGREDIENTES FRACIONADOS**  
**OBTIDOS A PARTIR DA FARINHA DE GIRASSOL**

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 GIRASSOL

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma dicotiledônea anual originária da América do Norte e Central e é uma das mais importantes culturas de oleaginosas do mundo (USDA, 2016). Seu cultivo é destinado prioritariamente para obtenção de óleo comestível, além do mercado de grãos para alimentação de pássaros, confeitaria ou consumo dos grãos torrados (EMBRAPA, 2015).

No Brasil sua produção passou a ser contabilizada recentemente, há menos de dez anos, e vem crescendo ao longo dos anos (CONAB, 2016). Seu plantio é realizado nas regiões centro-oeste, sudeste e sul. Destacam-se o estado do Mato Grosso, correspondendo a 86,6% de área plantada, em seguida vem o estado de Minas Gerais, com 7,9%, e o Rio Grande do Sul, com 2,2%. Entretanto, está longe de ser comparada aos grandes países produtores, onde cultivo já está bem estabelecido (Ucrânia, Rússia e Argentina) (CONAB, 2016; USDA, 2016). O maior produtor mundial de girassol é a Ucrânia, com 28% de todo o óleo de girassol produzido no mundo, o segundo maior produtor em termos percentuais é a Rússia, 23% da produção mundial, e o maior consumidor é a União Européia. A Argentina ocupa a quinta posição na produção mundial, sendo o Brasil um grande importador de seu óleo (CONAB, 2016).

O girassol pode ser cultivado em todas as regiões do Brasil, pois seu rendimento é pouco influenciado pelas latitudes, altitudes e fotoperíodo, o que facilita a expansão do cultivo. Assim sendo, o girassol se apresenta como nova opção nos sistemas de rotação e sucessão de culturas para as regiões produtoras de grãos, inclusive com a soja, principal oleaginosa cultivada no Brasil (CASTRO e FARIAS, 2005; EMBRAPA, 2015). Para se estabelecer como uma cultura efetiva no Brasil precisa superar algumas barreiras, tais como a falta de viabilidade de escoamento, o reduzido valor de mercado a baixa qualidade e valor comercial do farelo resultante da extração do óleo.

#### 1.1.1 Composição química

A semente de girassol consiste em um embrião formado por dois cotilédones contendo as reservas lipídicas e proteicas usadas durante a germinação das sementes (GONZÁLEZ-PÉREZ, 2003). A composição dos grãos difere de acordo com a variedade de girassol (EARLE et al.,1968), sendo mostrada na Tabela 1 a composição química dos grãos com casca e descascadas.

**Tabela 1** - Faixa de composição química em base seca de grãos com casca e sem casca de girassol.

Componentes	Grãos com casca (%)	Grãos descascados (%)
Lipídios	34 - 55	47 - 65
Proteínas	10 - 27	20 - 40
Carboidratos	18 - 26	4 - 10
Fibras	22 - 24	8 - 12
Compostos fenólicos	1 - 4,5	0,3 - 3
Minerais	2 - 4	3 - 4

Fonte: González-Pérez e Vereijken, 2007; Salgado, 2009; Mandarino,1992.

O farelo obtido do processamento do óleo, é um subproduto de elevado teor proteico, variável de acordo com a variedade dos grãos, teor de óleo residual, bem como ausência ou presença de cascas. Em geral, o farelo de girassol contém, aproximadamente 40% de proteína, quando o óleo é extraído mecanicamente e 50% quando é utilizado extração por solventes no processo, ou ainda cerca de 60% quando é proveniente de grãos descascados (BAU et al., 1983; KABIRULLAH e WILLS, 1982; ROBERTSON e RUSSELL, 1972).

## 1.2 PROTEÍNAS DO GIRASSOL

A proteína do girassol é constituída por dois grupos principais: as globulinas majoritárias (40-90%), conhecidas como heliantinina, e albuminas (10-30%) (GHEYASUDDIN, CATER e MATTIL, 1970; PRASAD, 1990). As outras pequenas frações seriam de glutelinas e prolaminas (GONZÁLEZ-PÉREZ e VEREIJKEN, 2007). A composição aminoacídica do girassol em termos de aminoácidos essenciais só não atende ao padrão de referência proteica da FAO para lisina (FAO,

2007; GASSMANN,1983). Embora a lisina seja um aminoácido essencial, isso não exclui o girassol de ser considerado uma fonte proteica de qualidade, que pode ser complementada com outras proteínas vegetais, onde a lisina seja abundante (CONDE et al., 2005; SOSULSKI, 1979).

A digestibilidade das proteínas pode ser reduzida por inibição de enzimas digestivas proteolíticas, quando ocorre ligação dos compostos fenólicos presentes nos grãos com as proteínas (BAU et al.,1983; SYNGE,1975). Porém, este resultado é controverso, pois há estudos com animais que mostraram que a presença do ácido clorogênico (ACG) não afetou a digestibilidade *in vivo* das proteínas (EKLUND, 1975; TREVIÑO et al., 1998). Valores encontrados por Salgado et al. (2012) mostram uma elevada digestibilidade *in vitro* das proteínas, de 95,4% para concentrado proteico de girassol contendo 2,5% de compostos fenólicos.

As proteínas do girassol apresentam como característica positiva a ausência de fatores antinutricionais, tais como, inibidores de proteases (inibidor de tripsina) e hemaglutininas (PRASAD et al., 1990). Pelas características apresentadas vários autores concluíram que as proteínas de girassol se mostraram um ingrediente alimentar promissor, para ser aplicado em formulações alimentares, principalmente, na área de panificação, produtos lácteos e cárneos (GONZÁLEZ-PÉREZ e VEREIJKEN, 2007; SALUNKHE et al., 1992).

### 1.2.1 Propriedades funcionais das proteínas do girassol

A funcionalidade das proteínas nos alimentos resulta da forma como os polímeros interagem com o meio, proveniente de suas características físicas, químicas e conformacionais. Tais características incluem o tamanho, configuração, composição e sequência de aminoácidos e distribuição de cargas. Por apresentar múltiplas propriedades é difícil delinear papel de cada uma delas em relação a uma determinada propriedade funcional (DAMODARAN, 2010).

As propriedades funcionais das proteínas do girassol são estudadas principalmente nos produtos obtidos a partir da farinha desengordurada e sem cascas obtidos em laboratório e não de resíduos industriais (SALGADO, 2009). A literatura mostra resultados contraditórios de funcionalidade proteica, pois os procedimentos aplicados durante o processo de obtenção das proteínas afetam sua

funcionalidade. As diferenças observadas refletem a diversidade de métodos e pré-tratamentos aplicados, variedade e cultivar utilizado. Trabalhos reportam uma solubilidade em água entre 50 e 75% a pH 7 (SAEED e CHERYAN, 1988; SODINI e CANELLA, 1977). Sendo a solubilidade da heliantinina extremamente dependente do pH e força iônica, já as albuminas são solúveis independentemente destes dois fatores (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2004).

A desnaturação proteica pelo calor, bem como a força iônica do meio, causa o aumento da hidrofobicidade da superfície proteica alterando o perfil de solubilidade destas. Valores entre 15 a 30% de solubilidade para farelo e isolados proteicos de girassol, respectivamente, em pH variando de 2 a 6, e valores superiores à 80% em pH acima de 7 foram descritos por Sosulski e Fleming (1977). Os autores observaram elevada solubilidade em concentrações variadas de cloreto de sódio e cálcio, propriedade incomum para outras proteínas como as de soja e amendoim.

A capacidade de absorção de água, encontrada por Canella, Castriotta e Sodini (1977), para a farinha, concentrado proteico e isolado proteico de girassol, foram de 67,7, 143,0 e 74,6%, respectivamente. Em geral, os produtos proteicos de soja têm maior capacidade de absorção de água, quando comparadas as do girassol. Em relação a absorção de gordura, excelentes resultados foram reportados por Lin, Humbert e Sosulski (1974), sendo de 207,8 e 256,7% para farinha e isolado proteico, respectivamente. As propriedades emulsificantes, em particular, se mostraram propícias e comparáveis à da soja, apresentando emulsões estáveis (GONZÁLEZ-PÉREZ e VEREIJKEN, 2007; PICKARDT et al., 2015). Porém, a capacidade de formação de espuma e gel não são promissoras (GONZÁLEZ-PÉREZ e VEREIJKEN, 2007).

### 1.2.2 Obtenção de produtos proteicos de girassol

A obtenção de produtos concentrados ou isolados proteicos, a partir da farinha desengordurada, tem como objetivo a remoção de compostos não proteicos presentes na matriz. Geralmente, estes processos utilizam soluções extratoras alcalinas ou salinas, baseadas nas diferenças de solubilidade que proteínas possuem frente ao pH e força iônica do meio (VIOQUE et al., 2001).

O uso do girassol como fonte proteica é afetado principalmente por fatores

extrínsecos ou intrínsecos aos grãos. Temperaturas elevadas durante o processo de extração do óleo (140°C) podem acarretar em desnaturação proteica ocasionando alteração de suas propriedades funcionais originais. Com isso a solubilidade, importante propriedade para aplicação das proteínas como ingrediente alimentar, pode ser afetada (GONZÁLEZ-PÉREZ e VEREIJKEN, 2007; PARRADO et al., 1993). Outra dificuldade para a utilização das proteínas consiste na presença dos compostos fenólicos, os quais em meio alcalino se ligam as proteínas. Esta ligação é de natureza covalente e pode reduzir a solubilidade proteica, alterar a digestibilidade, estabilidade no armazenamento, modificação das propriedades organolépticas, principalmente a cor (RAWEL et al., 2002; SALGADO et al., 2011; SASTRY e SUBRAMANIAN, 1984). Após a extração do óleo não ocorre redução do teor dos compostos fenólicos no produto gerado, pois estes dificilmente se solubilizam na fase lipídica (MATTHÄUS, 2002).

Portanto, a remoção de compostos fenólicos constitui uma estratégia relevante para a obtenção de produtos proteicos derivados do girassol. Para tal, as tentativas de extração dos compostos fenólicos mostrada na literatura utilizaram extração com mistura de solventes orgânicos e água (GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2002; PRASAD, 1990; POMENTA e BURNS, 1971; SAEED e CHERYAN, 1988; SODINI e CANELLA, 1977); soluções aquosa ácidas, salinas ou com agentes redutores (RAHMA e RAO, 1981; PICKARDT et al. 2009; SALGADO et al. 2011; SASTRY e SUBRAMANIAN, 1984); membrana filtrante (O'CONNOR, 1971); remoção por co-precipitação ou complexação com pigmentos e outros compostos não proteicos, adsorção em resina (NUZZOLO, VIGNOLA e GROGGIA, 1980; PICKARDT et al., 2011; WEISZ et al., 2010) ou a combinação desses métodos (FAN, SOSULSKI e HAMON, 1976; PICKARDT et al., 2015; RAYMOND et al., 1984; SOSULSKI; MCCLEARY e SOLIMAN, 1972).

A completa remoção dos compostos fenólicos não foi alcançada por nenhuma das metodologias propostas, provavelmente devido a associação dos fenólicos com as proteínas, que ocorre em geral em pH alcalino, meio adequado para extração das proteínas (SALGADO et al., 2011). Devido à falta de consenso do melhor processo a ser empregado, com viabilidade técnica e econômica para a indústria ainda se pesquisam metodologias para extração dos fenólicos dos subprodutos proteicos resultantes da extração do óleo. É desejável que as técnicas utilizadas mantenham

ou aumentem propriedades funcionais e tecnológicas das proteínas (WILDERMUTH, YOUNG e WERE, 2016). Por outro lado, existem questionamentos de que a extração total dos compostos fenólicos talvez não seja necessária, pois nos últimos anos há uma busca por manter ou adicionar esses componentes às formulações, devido à sua interessante capacidade antioxidante (SALGADO et al., 2011).

### 1.2.3 Utilização das proteínas do girassol

As alegações favoráveis para valorização dos ingredientes proteicos do girassol incluem sua baixa alergenicidade, comparada com outras proteínas vegetais, e ao fato de não ser uma planta geneticamente modificada (GM) (WILDERMUTH, YOUNG e WERE, 2016). Estas características apontam para seu uso como uma alternativa em substituição aos produtos de soja, que em geral são transgênicos (GMO, 2016). Algumas das aplicações de proteínas do girassol texturizadas, sem extração de fenólicos, foram realizadas por Bhise et al. (2014a), em cookies, e Bhise, Kaur e Aggarwal (2014b), macarrão (tipo "noodles"). Os autores aplicaram até 10% das proteínas de girassol nas formulações, e estas foram aceitas sensorialmente em todos os atributos avaliados. Sendo assim, mostraram que o produto de girassol texturizado é uma promissora fonte proteica a ser adicionada em produtos alimentares. Shchekoldina e Aider (2012) aplicaram 5% de um isolado proteico de girassol submetido a extração de compostos fenólicos, como emulsificante em pães e obtiveram aceitabilidade dos consumidores. Embora, o ingrediente tenha elevado o valor nutricional do produto, ocorreram problemas relacionados a cor, mesmo com a redução do teor de compostos fenólicos. A presença desses compostos representa um importante fator de limitação da aceitabilidade, apontando a necessidade de serem eliminados ou minimizados para possibilitar seu efetivo uso em maiores proporções (DORRELL, 1978).

A aplicação das proteínas do girassol para elaboração de filmes flexíveis biodegradáveis revelou que estes apresentam uma interessante atividade antioxidante devido a presença dos compostos fenólicos, que pode ser útil na preservação de produtos sensíveis à oxidação (SALGADO et al., 2010). Por outro lado, devido ao conteúdo residual de fenólico, este conferiu modificações na cor e



opacidade do filme, característica indesejável que pode limitar a aplicação em embalagens.

### 1.3 FIBRAS DO GIRASSOL

Os efeitos benéficos e a eficácia das fibras alimentares dependem não apenas de sua ingestão, mas também de sua composição, estrutura organizacional, características físico-químicas e se estiverem associadas a compostos bioativos (ELLEUCH et al., 2011). Ainda é muito utilizada a classificação baseada na solubilidade em água, sendo denominadas como fibra alimentar solúvel e insolúvel. Porém, a definição atual está relacionada com dois fatores principais, ao número de polímeros de carboidratos presentes na sua constituição (10 ou mais unidades monoméricas) e a propriedade de não ser hidrolisada por enzimas endógenas pertencentes ao intestino delgado (CODEX, 2008; GIUNTINI e MENEZES, 2011). O farelo resultante do processo de extração do óleo é constituído em grande parte por fibras insolúveis, como lignina e celulose, devido a presença das cascas (GROMPONE, 2005). As fibras insolúveis apresentam efeito mecânico no trato gastrointestinal, entumecem com a água e aceleram o tempo de trânsito intestinal (COPPINI et al., 2004).

Atualmente, não há estudos que explorem muito a classificação e aplicação das fibras alimentares do girassol, por conta do farelo ser utilizado para alimentação de ruminantes. Por isso os dados da literatura relacionados as análises de fibra se referem a fibra bruta, detergente ácido e detergente neutro (ROSA et al., 2009).

As fibras do girassol são separadas durante a produção do isolado proteico, quando este é produzido pelo processo de extração das proteínas em pH alcalino, portanto, seria um produto gerado durante o processamento que poderia também ser comercializado (WILDERMUTH, YOUNG e WERE, 2016).

### 1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS DO GIRASSOL

Compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente encontrados em vegetais e fazem parte do desenvolvimento natural da planta. Devido a sua variedade estrutural os fenólicos desempenham diferentes papéis fisiológicos nas

plantas (KAMMERER et al., 2007). Podem atuar como: antioxidantes, fitoalexinas, substâncias antinutricionais e contribuir com a pigmentação da planta entre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Dentre a grande variedade de polifenóis, destacam-se os: flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis, cumarinas, taninos, lignanas e estilbenos. Em comum, todos apresentam no mínimo um anel aromático ligado a uma (ou mais) hidroxila(s). Essa característica confere ação antioxidante a esses compostos, no caso de plantas atuam em sua proteção contra danos oxidativos (KARAKAYA, 2004). A divisão entre as várias classes de fenólicos é feita baseada no número de anéis fenólicos e nos elementos estruturais que ligam os anéis uns aos outros (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Estes compostos não estão distribuídos uniformemente nas plantas e podem ser encontrados complexados com carboidratos, proteínas e outros componentes do vegetal (NACZK e SHAHIDI, 2004). As alterações observadas nos subprodutos do girassol se devem a oxidação dos fenólicos e sua ligação às proteínas, principalmente, pela atuação da enzima polifenoloxidase. Esta catalisa a oxidação do ACG em o-quinonas, os quais são altamente reativos. Em condições propícias ligam-se covalentemente aos grupos tiol ou amino das proteínas, especialmente as globulinas, que são o grupo majoritário de proteínas presentes no grão de girassol (NACZK e SHAHIDI, 2004; NAKATANI et al., 2000). Essas interações covalentes só ocorrem se as condições do meio, durante o processamento, permitirem a oxidação do ACG à quinonas (SAEED e CHERYAN, 1989). Além das ligações covalentes, os compostos fenólicos também podem se unir as proteínas por ligação não covalente (ligação de hidrogênio, interações iônicas ou hidrofóbicas).

Os grãos de girassol apresentam entre 1 a 4% de compostos fenólicos (SAEED e CHERYAN, 1988; WEISZ, KAMMERER e CARLE, 2009). A literatura comenta sobre a possibilidade da produção de novos genótipos de girassol com baixo teor de fenólicos. Porém, como o destino principal do girassol é a extração de óleo, o ponto central da pesquisa na produção de novos híbridos é voltado para o maior rendimento em óleo e produtividade de grãos (DE LA VEGA et al., 2007; MANDARINO, 1992).

#### 1.4.1 Propriedades ativas dos compostos fenólicos

As ações dos compostos fenólicos no organismo ainda não estão totalmente reconhecidas, devido às inúmeras funções que eles podem desempenhar e a grande variedade e complexidade de suas estruturas químicas (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Os polifenóis são as substâncias antioxidantes mais abundantes em dietas com ingestão de frutas e vegetais. Esse comportamento pode proteger os constituintes das células contra os danos oxidativos e com isso limitar o risco de várias doenças degenerativas, associadas ao estresse gerado por espécies oxidadas. Estudos experimentais mostram sua relação com a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas (SCALBERT et al., 2005).

Trabalhos recentes relacionam a atuação dos polifenóis contra células cancerosas não apenas com sua atividade antioxidante, mas proveniente também de outras interações realizadas com proteínas e peptídeos celulares. Essas resultariam provavelmente, em alterações de sinalização celular modificando processos que favorecem a formação de tumores (LEWANDOWSKA et al., 2016).

Devido a sua estrutura conter fenóis esses compostos podem ser ativos contra membrana citoplasmática e outras estruturas dos microorganismos. Ao atacar sua membrana citoplasmática ocorrem danos irreversíveis que ocasionam uma perda da habilidade de manter sua integridade causando morte da bactéria. Ao serem internalizados podem reagir componentes do citoplasma e proteínas celulares (LOU et al., 2011; PUUPPONEN-PIMIÄ et al. 2005). O grau de hidroxilação dos compostos fenólicos pode influenciar em sua atividade antibacteriana. Os ácidos fenólicos, que são predominantes no girassol, apresentam sensibilidade diferentes perante bactérias Gram negativas e positivas, e alguns autores discutem que sua ação seria apenas contra bactérias Gram-negativas (PUUPPONEN-PIMIÄ et al. 2001; PUUPPONEN-PIMIÄ et al. 2005).

Vários dos mecanismos de ação para as diferentes propriedades ativas dos compostos fenólicos não estão completamente elucidados, mas muitos estudos vêm sendo realizados com este intuito (D'ARCHIVIO et al., 2007).

#### 1.4.2 Principal composto fenólico do girassol

Nos grãos de girassol o composto fenólico mais abundante é o ACG, e em menores proporções o cafeíco (isoladamente), ferrúlico, rosmarínico, miricetina e rutina (ZILÍC et al., 2010). O termo ACG é usado para designar uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH), 3,4,5- tetra-hidroxíciclohexanóico) (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

Os grupos majoritários encontrados na natureza são: éster do ácido cafeico com o ácido quínico (ácido cafeoilquínico - ACQ) (isômeros 3-, 4-, 5-); éster de dois resíduos do ácido cafeico com ácido quínico (ácido dicafeoilquínico - diACQ) (isômeros 3,4-, 3,5-, 4,5-) e éster do ácido ferúlico com ácido quínico (ácido feruloilquínico - AFQ) (isômeros 3-, 4-, 5-). Dentre eles o ácido 5-cafeoilquínico (Figura 1) é considerado mais abundante, e se trata do isômero predominante no girassol (CLIFFORD, 1978; DE MARIA e MOREIRA, 2004; WEISZ, KAMMERER e CARLE, 2009).

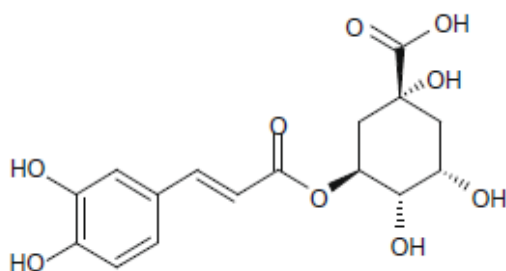


Figura 1 - Estrutura química do ácido 5-O-cafeoilquínico

Fonte: Weisz, Kammerer e Carle, 2009.

O ACG está presente em maior proporção na amêndoa, mas também está presente na casca, que apresenta teores de 0,7 a 5,4% dos compostos fenólicos totais do grão. Dos compostos fenólicos extraídos da amêndoa, o ACG compreende de 43 a 73%, dependendo da variedade estudada (DURAN e PADILLA, 1993; KARAMÁC et al., 2012; PEDROSA et al., 2000).

#### 1.4.3 Determinação do ácido clorogênico

Dentre os principais métodos empregados na determinação de ACG total e de seus isômeros, estão espectrofotométricos e de cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE) (DE MARIA e MOREIRA, 2004). Moores, Mcdermott e Wood (1948) desenvolveram um método espectrofotométrico de baixo custo para análise de ACG em cafés verdes não processado e torrado, baseado na absorção seletiva destes compostos na região do ultravioleta (UV). Inicialmente, a matriz desengordurada foi submetida à extração aquosa e, em seguida, foi feita uma análise da absorbância no comprimento de onda de 324 nm. O método espectrofotométrico de absorção do UV, com pequenas modificações, introduzidas por Weiss (1953), foi adotado oficialmente pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), sendo considerado um método simples e barato.

A partir da metade da década de 70, com a introdução da CLAE, houve um grande avanço na análise de isômeros individuais do ACG em extratos vegetais (DE MARIA e MOREIRA, 2004). Comparando 5 métodos de extração de ACG presente em café, Ky, Noirot e Hamon (1997), concluíram que o método de Trugo e Macrae (1984) foi o mais adequado no que diz respeito aos parâmetros repetibilidade, precisão, rapidez e baixo custo da análise. Os autores utilizaram uma extração com metanol/água (40:60, v/v), seguida pela clarificação do extrato com reagente de Carrez (ferrocianeto de potássio + acetato de zinco), se mostrando o método mais adequado para a extração dos isômeros do ACG em cafés torrado e solúvel. Ky, Noirot e Hamon (1997) também constataram que o uso do reagente de Carrez foi fundamental para a precipitação de material coloidal, particularmente proteínas e polissacarídeos, que formam complexos com o ACG em pH ácido.

Indubitavelmente, a CLAE é o método mais utilizado para a análise de isômeros individuais do ACG, tanto pela sua simplicidade e rapidez como também pela separação satisfatória dos isômeros (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAU, H. M.; MOHTADI NIA, D. J.; MEJEAN, L.; DEBRY, G. Preparation of colorless sunflower protein products: effect of processing on physicochemical and nutritional properties. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 60, n. 6, p. 1141-1148, 1983.

BHISE, S.; KAUR, A.; AGGARWAL, P. Development of protein enriched noodles

using texturized defatted meal from sunflower, flaxseed and soybean. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5882-5889, 2014a.

BHISE, S.; KAUR, A.; AHLUWALI, P.; THIND S. S. Texturization of deoiled cake of sunflower, soybean and flaxseed into food grade meal and its utilization in preparation of cookies. **Nutrition & Food Science**, v. 44, n. 6, p. 576-585, 2014b.

CANELLA, M.; CASTRIOTTA, G.; SODINI, G. Proprietà funzionali di prodotti di girasole dopo estrazione dei pigmenti fenolici con butanolo ácido. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, v. 54, n. 2, p. 73-76, 1977.

CASTRO, C. DE; FARIAS, J. R. B. Ecofisiologia do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. de. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005, p.163-218.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids - their complex nature and routine determination in coffee beans. **Food Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 63-71,1978.

CODEX. Codex Alimentarius 2008. Report of the 30th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. Cape Town, South Africa, 3-7 Novembro, 2008. Disponível em: < [www.fao.org/input/download/report/710/al32\\_26e.pdf](http://www.fao.org/input/download/report/710/al32_26e.pdf) >. Acesso em: 19 dez. de 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento de safra - safra 2014/15**, 2015. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 19 mar. de 2016.

CONDE, J. M.; ESCOBAR, M. DEL M. Y.; JIMÉNEZ, J. J. P.; RODRÍGUEZ F. M.; PATINO, J. M. R. Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 8038-8045, 2005.

COPPINI, L. Z.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G.; HARB-GAMA, A. Fibras Alimentares e Ácidos Graxos de Cadeia Curta. In: WAITZBERG, D. L., **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 79-94.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010, p 179-262.

D'ARCHIVIO, M. M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DE LA VEGA, A. J.; DELACY, I. H.; CHAPMAN, S. C. Progress over 20 years of sunflower breeding in central Argentina. **Field Crops Research**, v. 100, n. 1, p. 61-72, 2007.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586 - 592, 2004.

DORREL, D. G. Processing and utilization of oilseed sunflower. In: CARTER, J. F **Sunflower Science and Technology**. Agronomy. A Series of monographs, n. 19; The American Society of Agronomy, Inc. Madison Wisconsin, USA, 1978, p 407- 440.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

EARLE, F. R.; VANETTAN, C. H.; CLARK, T. F.; WOLFF, I. A. Compositional data on sunflower seed. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, n. 12, p. 876-879, 1968.

EKLUND, A. Effect of chlorogenic acid in a casein diet for rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 18, n. 5-6, p. 258-264, 1975.

ELLEUCH, M.; BEDIGIAN, D.; ROISEUX, O.; BESBES, S.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 411-421, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Girassol**, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/girassol>>. Acesso em: 2 abr. de 2015.

FAN, T. Y.; SOSULKI, F. W.; HAMON, N. W. New techniques for preparation of improved sunflower protein concentrates. **Cereal Chemistry**, n. 53, p 118, 1976.

FAO. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: **Protein and amino acid requirements in human nutrition**, 2007. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43411/1/WHO\\_TRS\\_935\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43411/1/WHO_TRS_935_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 19 out. de 2016.

GASSMANN, B. Preparation and application of vegetables proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. **Nahrung**, v. 27, p. 351-369, 1983.

GHEYASUDDIN, S.; CATER, C. M.; MATTIL, K. F. Effect of several variables on the extractability of sunflower seed proteins. **Journal of Foods Sceince**, v. 35, p. 453-456, 1970.

GIUNTINI, E. B.; MENEZES, E. W. Fibra Alimentar. In: **Série de Publicações ILSI Brasil-Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes**. São Paulo: ILSI, 2011, 23 p.

GMO. GMO Compass. **Sunflower**, 2016. Disponível em: <<http://www.gmo-compass.org/eng/database/plants/68.sunflower.html>>. Acesso em: 21 nov. de 2016.



GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; MERCK, K. B.; VEREIJKEN, J. M.; VAN KONINGSVELD, G. A.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1713-1719, 2002.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S. **Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins**. 2003. Tese (Doutorado), Universidade de Wageningen, Holanda.

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; VEREIJKEN, J. M.; MERCK, K. B.; VAN KONINGSVELD, G. A.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Conformational states of sunflower (*Helianthus annuus*) helianthinin: Effect of heat and pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6770-6778, 2004.

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

GROMPONE, M. A. Sunflower. In: SHAHIDI, F.(ed.) **Bailey's Industrial Oil & Fat Products**. 6ª ed. Edible Oil & Fat Products. Edible oil, 2005.

KABIRULLAH, M.; WILLS, R. B. H. Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 235-249, 1982.

KAMMERER, D. R.; SALEH, Z. S.; CARLE, R.; STAMLEY, R. A. Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 5, p. 605-613, 2007.

KARAKAYA, Sibel. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KARAMÁC, M.; KOSIŃSKA, A.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; DUEÑAS, M. Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds. **Europe Food Research and Technology**, v. 235, n. 2, p. 221-230, 2012.

KY, C. L.; NOIROT, M; HAMON, S. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea* sp.). **Journal of Agriculture Food Chemistry**, n. 45, v. 3, p. 786-790, 1997.

LEWANDOWSKA, H.; KALINOWSKA, M.; LEWANDOWSKI, W.; STĘPKOWSKI, T. M.; BRZÓSKA, K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 32, p. 1-19, 2016.

LIN, M. J. Y.; HUMBERT, E. S.; SOLSULKI, F. W. Certain functional properties of sunflower meal products. **Journal Food Science**, v. 39, n. 2, p. 368-370, 1974.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; MA, C.; WANG, Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M398-M403, 2011.

MANDARINO, J. M. G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. Londrina: Emprapa- CNPSo, (Documento 52), p. 25, 1992.

MATTHÄUS, B. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.12, p. 3444-3452, 2002.

MOORES, R. G.; MCDERMOTT, D. L.; WOOD, T. R. Determination of Chlorogenic acid in coffee. **Analytical Chemistry**, v. 20, n. 7, 620-624, 1948.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NAKATANI, N.; KAYANO, S. I.; KIKUZAKI, H.; SUMINO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T. Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities Of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). **Journal of Agricultural**

**and Food Chemistry**, v. 48, n.11, p. 5512-5516, 2000.

NUZZOLO, C.; VIGNOLA, R.; GROGGIA, A. **Method for preparing a protein isolate from sunflower seed meal using aluminum salts**. US Patent 4212799, 15 jul. 1980. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

O'CONNOR, D. E. **Preparing light-coloured protein isolate from sunflower meal by alkali extraction under an inert gas blanket followed by membrane ultrafiltration**. US Patent 3,62256, 23 nov. 1971. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

PARRADO, J.; MILLÁN, F.; HERNÁNDEZ, P. I.; BAUTISTA, J.; MACHADO, A. Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 41, p. 1821-1825, 1993.

PEDROSA, M. M.; MUZQUIZ, M.; GÁRCIA-VALLEJO, C.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; AYET, G.; ROBREDO, L. M. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 4, p. 459-464, 2000.

PICKARDT, C.; NEIDHART, S.; GRIESBACH, C.; DUBE, M.; KNAUF, U.; KARAMMER, D. R.; CARLE, R. Optimisation of mild-acid protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 208-219, 2009.

PICKARDT, C.; HAGER, T.; EISNER, P.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Isoelectric protein precipitation from mild-acidic extracts of de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 1, p. 31-44, 2011.

PICKARDT, C.; EISNER, P.; KARAMMER, D. R.; CARLE, R. Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.)

press cake by mild-acid protein extraction and polyphenol adsorption. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 208-219, 2015.

PRASAD, D. T. Proteins of the phenolic extracted sunflower meal. II: Solubility fractionation and characterization of major protein fractions. **Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie**, v. 23, n. 3, p. 236-241, 1990.

POMENTA, J. V.; BURNS E. E. Factors affecting chlorogenic, quinic and caffeic acid levels in sunflower kernels. **Journal of Food Science**, n. 36, p. 490 - 492, 1971.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; ALAKOMI, H. L.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 8-18, 2005.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

RAHMA, E. H.; RAO, M. S. N. Isolation and characterization of the major protein fraction of sunflower seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 518-521, 1981.

RAWEL, H. M.; ROHN. S.; KRUSE, H. P.; KROLL, J. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. **Food Chemistry**, n. 78, p. 443-455, 2002.

RAYMOND, J.; DALGALARRONDO, M.; AZANDA, J. L.; DUCASTAING, A. Preparation of protein isolates from sunflower cakes. **Revue Francaise des Corps Gras**, v. 6, p. 233-242, 1984.

ROBERTSON, J. A.; RUSSEL, R. B. Sunflower: American's neglected crop. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.49, p. 239- 244, 1972.

ROSA, P. M.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C.; BIZZO, H. R.; ZANOTTO, D. L.; OLIVEIRA, M. F.; CASTIGLIONI, V. B. R. Chemical composition of brazilian sunflower varieties. **HELIA**, v.32, n.50, p.145-156, 2009.

SAEED, M.; CHERYAN, M. Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. **Journal of Food Science**, n. 53, p. 1127- 1143, 1988.

SAEED, M.; CHERYAN, M. Chlorogenic acid and interactions with sunflower proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1270-1274, 1989.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K., ADSULE, R. N.; KADAM, S. S. Sunflower. In: SALUNKHE, D. K. (Ed.). **World Oilseeds: Chemistry, Technology and Utilization**, New York: Van Nostrand Reinhold, 1992, p. 97-139.

SASTRY, M. C. S.; SUBRAMANIAN, N. Preliminary studies on processing of sunflower seed to obtain edible protein concentrates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, p. 1039-1042, 1984.

SALGADO, P. R.; MOLINA, O. S. E.; PETRUCCELLI, S.; MAURI, A. N. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidants compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 5, p. 525-533, 2010.

SALGADO, P.R.; MOLINA ORTIZ, S.E.; PETRUCCELLI, S.; MAURI, A.N. Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cake have water solubility and antioxidant capacity. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.88, p.351-360, 2011.

SALGADO, P. R.; DRAGO, S. R.; ORTIZ, S. E. M.; PETRUCCELLI, S.; ANDRICH, O.; GONZÁLEZ, R. J.; MAURI, A. N. Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. **LWT-Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 65-72, 2012.

SALGADO, P. **Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria**. 2009. Tese (Doutorado) Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, La Plata, Argentina.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287-306, 2005.

SHCHEKOLDINA, T.; AIDER, M. Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2331-2343, 2012.

SODINI, G; CANELLA, M. Acidic butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 25, p. 822 - 825, 1977.

SOSULSKI, F.; FLEMING, S. E. Chemical, functional, and nutritional properties of sunflower protein products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 54, n. 2, p. A100-A104, 1977.

SOSULSKI, F. Food uses of sunflower proteins. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 56, p. 438-442, 1979.

SOSULSKI, F. W., MCLEARY, C. W.; SOLIMAN, F. S. Diffusion extraction of chlorogenic acid from sunflower kernels. **Journal of Food Science**, v. 37, p. 253-256, 1972.

SYNGE, R. L. M. Interactions of polyphenols with proteins in plants and plant products. **Qualitas Plantarum**, v. 24, n. 3-4, p. 337-350, 1975.

TREVIÑO, J.; REBOLÉ, A.; RODRÍGUEZ, M. L.; ORTIZ, L. T.; CENTENO, C.; ALZUETA, C. Nutritional effect of chlorogenic acid fed to growing broiler

chicks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 156-160, 1998.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, v. 109, p. 263-266, 1984.

VIOQUE, J.; SÁNCHEZ VIOQUE, R., PEDROCHE, J., YUST, M. D. M., MILLÁN, F. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 2, p. 127-131, 2001.

USDA. United States Department of Agriculture. **Oilseeds: world market and trade**, 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 19 mar. de 2015.

WEISS, L. C. Report on chlorogenic acid in coffee. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 36, n. 3, p. 663-670, 1953.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of pheolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS<sup>n</sup>. **Food Chemistry**, v. 115, p. 758-765, 2009.

WEISZ, G. M.; SCHNEIDER, L.; SCHWEIGGERT, U.; KAMMERER, D. R.; REINHOLD, C. Sustainable sunflower processing - I. Development of a process for the adsorptive discoloration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein extracts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 733-741, 2010.

WILDERMUTH, S. R.; YOUNG E. E.; WERE L. M. Chlorogenic acid oxidation and its reaction with sunflower proteins to form green-colored complexes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 0, p. 1-15, 2016.

ŽILIĆ, S.; MAKSIMOVIĆ DRAGIŠIĆ, J.; MAKSIMOVIĆ, V.; MAKSIMOVIĆ, M.;

BASIĆ, Z.; CREVAR, M.; STANKOVIĆ, G. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel. **HELIA**, v. 33, n. 52, p. 75-84, 2010.



**CAPÍTULO 2**  
**FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES DA FARINHA DE GIRASSOL:**  
**AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E NUTRICIONAL DAS FRAÇÕES**

Thaís Dolfini Alexandrino, Léa Mariza de Oliveira, Roseli Aparecida Ferrari, Rita de  
Cassia S.C.Ormeneze, Maria Teresa Bertoldo Pacheco

O artigo foi traduzido para o inglês e submetido à revista *LWT - Food Science and Technology*.

## Resumo

Produtos reduzidos em conteúdo fenólico foram obtidos a partir da farinha desengordurada de girassol, utilizando um processamento para viabilizar o aproveitamento integral dos componentes. Para eliminação dos compostos fenólicos foi realizada extração em pH 5 com diferentes soluções extratoras, tais como: etanol 70%, solução de bissulfito de sódio 0,1% e mistura deles (proporção 70:30). A matéria-prima, isolado proteico e concentrado fibroso foram caracterizados quimicamente. Isolados foram avaliados quanto ao rendimento de extração de proteínas, solubilidade da proteína, estabilidade térmica e propriedades nutricionais (escore químico, digestibilidade, PDCAAS). Concentrados fibrosos resultantes da extração com bissulfito apresentaram 60,84 g/100 g de fibras e 35,67 g/100 g de proteínas. Os isolados apresentaram conteúdo proteico acima de 92,00 g/100 g e fenólicos inferior a 0,45 g/100 g. Todos apresentaram elevada solubilidade proteica (> 84,22%), bem como digestibilidade *in vitro* (> 90,00%). O teor de fenólico residual interferiu na digestibilidade e coloração dos isolados. A viabilidade do processo prévio de extração de fenólicos e obtenção de produtos de alto valor proteico e nutricional foi demonstrada. A mistura de bissulfito e etanol foi a mais promissora para obtenção dos isolados, enquanto a solução de bissulfito a melhor para coprodução de concentrado fibroso.

Palavras-chave: proteína de girassol, compostos fenólicos, solubilidade proteica, concentrado fibroso, digestibilidade.

### 1. Introdução

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma das quatro maiores culturas oleaginosas predominantes no mundo, amplamente cultivada nos cinco continentes (USDA, 2016). O crescimento dessa cultura no mundo em grande parte está vinculado a adoção de sistemas de aproveitamento integral da semente, pois este resultaria em ganhos ambientais, além de promover a ampliação e sustentabilidade da cultura. Portanto, o aproveitamento total e efetivo dos subprodutos provenientes da extração do óleo das sementes de girassol ocasionaria a valorização econômica

de toda a cadeia produtiva (Pedroche, 2015). O potencial do residual da extração do óleo inclui: elevado conteúdo proteico (40 a 50 g/100 g), não ser OGM e raramente alergênico. Todos esses critérios apontam o farelo de girassol como matéria-prima na alimentação humana (Gassmann, 1983; González-Pérez & Vereijken, 2007; Wildermuth, Young, & Were, 2016). Contudo, o entrave para sua utilização consiste no elevado teor de compostos fenólicos (1 a 4 g/100 g), sendo predominante o ácido clorogênico. Os fenólicos conferem uma coloração verde escuro e se ligam as proteínas, ocasionando alteração de propriedades funcionais e características organolépticas indesejáveis. Atualmente, com a falta de tecnologia apropriada no tratamento do farelo resultante da extração do óleo, seu destino é principalmente, destinado à alimentação animal (González-Pérez, Merck, Vereijken, Van Koningsveld, Gruppen, & Voragen, 2002; Pedrosa et al., 2000; Sodini & Canella, 1977; Weisz, Kammerer, & Carle, 2009).

Portanto, existe uma busca contínua por tecnologias para extração dos compostos fenólicos dos subprodutos do girassol, que tenham viabilidade técnica e econômica para a indústria, visto que não há um consenso do melhor processo a ser empregado (Wildermuth et al., 2016). É desejável que a extração dos fenólicos ocorra concomitante a um elevado rendimento proteico e sejam mantidas as propriedades tecnológicas das proteínas afim de viabilizar sua aplicação em alimentos (González-Pérez & Vereijken, 2007). Na obtenção de isolados proteicos as estratégias exploradas propõem o uso de misturas de solventes orgânicos, soluções salinas e/ou agentes redutores, antes da extração alcalina das proteínas (González-Pérez et al., 2002; Pickardt et al., 2009; Salgado, Ortiz, Petruccelli, & Mauri, 2011). Outras, a combinação da extração proteica levemente ácida com adsorção dos fenólicos em resina (Pickardt, Hager, Eisner, Carle, & Kammerer, 2011; Weisz, Schneider, Schweiggert, Kammerer, & Carle, 2010).

O objetivo deste trabalho consiste no aproveitamento integral dos subprodutos resultantes da extração do óleo de girassol, através do fracionamento dos componentes majoritários da farinha, sendo produzidas as frações: isolado proteico, concentrado fibroso e extrato rico em compostos fenólicos. Os procedimentos foram selecionados de acordo com seu elevado rendimento de extração proteica e teor reduzido de compostos fenólicos, características de coloração e propriedades tecnológicas e nutricionais apropriadas para seu uso na alimentação humana.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. *Materiais*

Grãos de girassol (*Helianthus annuus* L.), variedade Aguará 3 sem casca foram fornecidos pela empresa Giroil Agroindústria Ltda (Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brasil). A extração do óleo foi realizada em duas etapas: 1) extração à frio em prensa mecânica (Carver Press, USA), 2) extração com solvente (hexano) para extrair o óleo residual. Posteriormente, o material foi triturado e homogeneizado (Retsch ZM 200, Alemanha) para obter a farinha de girassol utilizada nos processamentos a seguir.

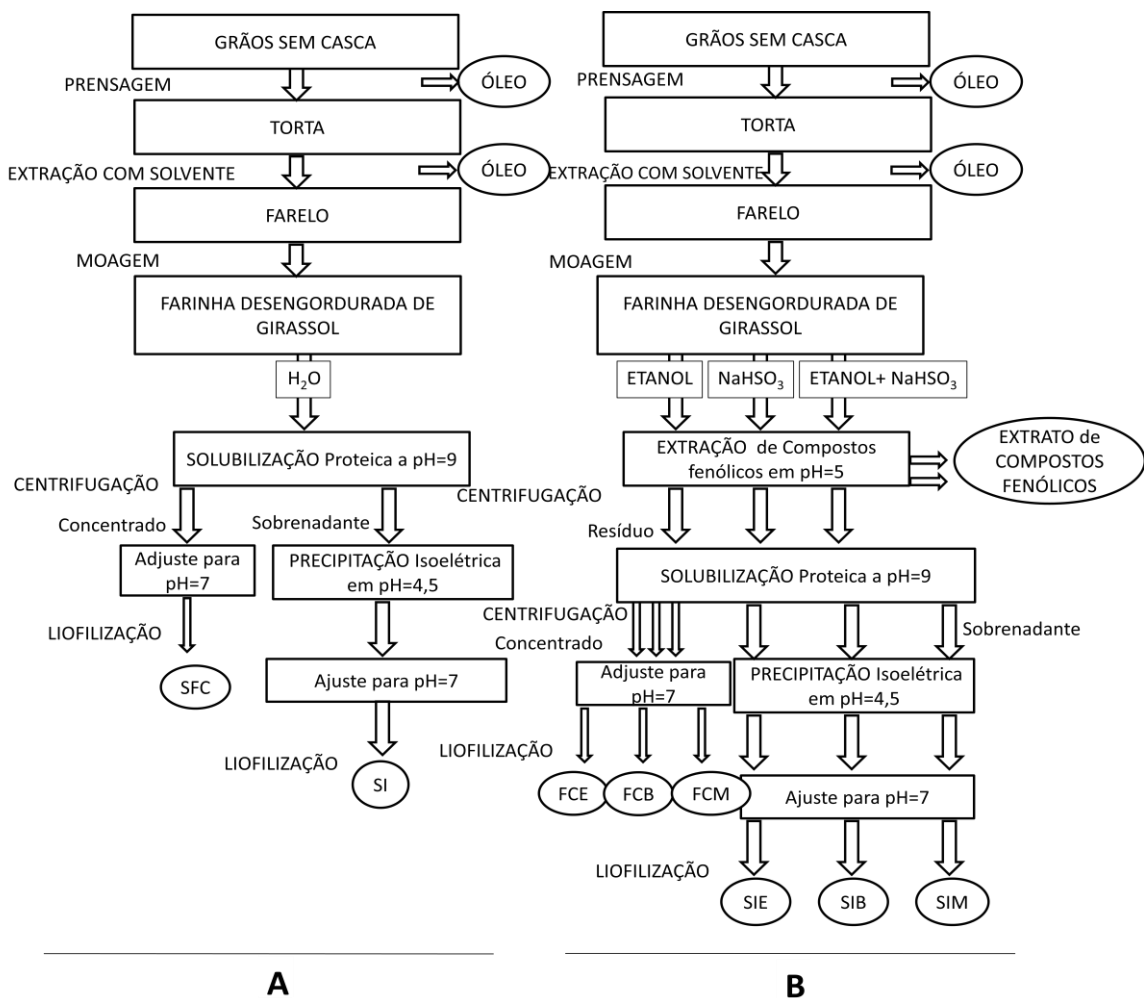
### 2.2. *Obtenção do concentrado fibroso (SFC) e isolado proteico convencional (SI)*

As condições utilizadas foram baseadas na metodologia de Salgado et al. (2011) modificada, de acordo com Fig. 1. A farinha foi dispersa em água (1:10 p/v), o pH ajustado para 9 (NaOH 1 mol/L) e deixada em agitação por 1 h, com monitoramento do pH. Depois, centrifugado a 11000×g por 20 min a 20°C (Sorvall RC-26 Plus, USA). O sobrenadante foi reservado e o resíduo submetido à re-extração. Unidos os sobrenadantes, foi realizada precipitação isoelétrica (pH 4,5/ HCl 1 mol/L) das proteínas, deixado 1 h em repouso antes da centrifugação (11000×g por 20 min a 4°C). O concentrado fibroso (SFC) final e o isolado proteico final tiveram seu pH ajustado para 7 (NaOH 1 mol/L) e foram secos por liofilização. O processo foi realizado em duplicata para validação dos resultados de rendimento.

#### 2.2.1 *Tratamento para redução dos fenólicos e obtenção dos componentes fracionados*

Para obtenção dos isolados proteicos com baixo conteúdo fenólico foram avaliados a eficiência de 3 sistemas extratores: 1) etanol 70% (v/v), 2) bissulfito de sódio 0,1% (p/v) em água, 3) mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30). Os isolados proteicos gerados foram denominados: SIE, SIB e SIM e

concentrados fibrosos: FCE, FCB e FCM, respectivamente. Para cada sistema extrator a farinha desengordurada de girassol foi submetida à 2 extrações sequenciais (1:10 p/v) em pH 5, agitados por 1 h, com monitoramento do pH. Após extrações, o resíduo de cada sistema foi submetido ao processo de extração alcalina das proteínas (1:10 p/v) obtendo 3 produtos: 1) concentrado fibroso, 2) extrato rico em compostos fenólicos e 3) isolado proteico pelo mesmo procedimento descrito para obtenção do isolado proteico de girassol convencional (SI). Os processos foram realizados em duplicatas para validação dos resultados de rendimento.



**Fig. 1.** Fluxogramas para obtenção dos produtos do girassol sem (A) e com (B) extração prévia de compostos fenólicos. SFC e SI = concentrado fibroso e isolado proteico convencional de girassol, FCE e SIE = concentrado fibroso e isolado proteico de girassol extraído com etanol 70%, FCB e SIB = concentrado fibroso e isolado proteico de girassol extraído com bissulfito de sódio 0,1% e FCM e SIM = concentrado fibroso e isolado proteico de girassol extraído com mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30).

### *2.3. Rendimento de proteína e eliminação dos compostos fenólicos*

O rendimento de extração proteica (g de proteína no isolado proteico/ g de proteína na farinha) e o percentual residual de compostos fenólicos expresso como ácido clorogênico (ACG) nos isolados (g de ACG no isolado proteico/ g de ACG na farinha) foi determinado para cada processo. O ACG foi usado na determinação do teor de compostos fenólicos residual por ser o componente predominante no girassol (Weisz et al., 2009).

### *2.4. Determinação da composição química*

As análises de umidade (AOAC, 925.09), cinzas (AOAC, 923.03), fibras dietéticas (AOAC, 985.29) e proteínas, pelo método de Kjeldahl, usando fator de conversão 5,75 (AOAC, 960.52), foram realizadas segundo Latimer Jr. (2012). E os lipídios de acordo com AOCS Ai 3-75 de acordo com Firestone (2013). Compostos fenólicos totais da farinha determinados, por espectrofotometria em 750 nm (Varian Cary 50, USA), usando ácido clorogênico (Sigma-Aldrich Co., CAS 327-97-9, St Louis, MO, USA) como padrão baseado em Kim, Jeong, e Lee (2003). O teor de ácido clorogênico foi determinado por HPLC-DAD em 324 nm (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão), como descrito por Tfouni et al. (2012).

### *2.5. Cor*

Isolados proteicos de girassol tiveram a cor determinada em triplicata no sistema de cor CIE L\*a\*b\* usando um CR 300 Minolta Chroma Meter (Minolta Chroma Co., Osaka, Japan).

### *2.6. Solubilidade proteica em água*

Determinada em pH 7 de acordo com Pilosof (2000). Amostras foram dispersas em água destilada (0,40 mg/mL) deixadas em agitação por 2 h à temperatura de 30°C. A seguir centrifugadas (2000×g/ 30 min/ 25°C) e filtradas. No

sobrenadante filtrado (Whatman nº 1) foi realizada a determinação das proteínas solúveis por Kjeldahl (AOAC 960.52). Resultados expressos em porcentagem de proteínas solúveis em relação conteúdo proteico da amostra inicial.

### 2.7. *Differential scanning calorimetry (DSC)*

Um TA Instrument DSC modelo 2010 (New Castle, EUA) foi usado para estudo da estabilidade térmica de acordo com Añón (2000). Foram analisados 10-15 mg de amostras, dispersas em água destilada à 10 mg/100 mg (p/p), em painéis hermeticamente fechadas. A taxa de aquecimento foi de 10°C/min no intervalo 20-160°C.

### 2.8. *Determinação do perfil de aminoácidos*

Perfil aminoacídico da farinha e isolados proteicos, foi realizada em RP-HPLC com detector de UV em 254 nm (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), equipado com uma coluna Luna/Phenomenex C18 (250 mm × 4,6 mm ×, 5 µ; Phenomenex Inc., Torrence, USA). Identificação e quantificação realizada com padrão externo (Pierce / PN 20088), e o ácido α-aminobutírico (AAAB) como padrão interno (Aldrich, Milwaukee-USA) como padrão interno descritos por Hagen, Geada, e Augustin (1989) e White, Hart, e Fry (1986). Triptofano foi determinado separadamente de acordo com Spies (1967).

### 2.9. *Valor nutricional*

Para avaliação nutricional da farinha e produtos proteicos do girassol foi realizada a digestibilidade *in vitro*, calculado o escore químico de aminoácidos, e PDCAAS (aminoácidos corrigidos pela digestibilidade da proteína). O PDCAAS foi calculado segundo Henley e Kuster (1994), com modificações, utilizando o valor da digestibilidade *in vitro* das proteínas. Digestibilidade *in vitro* foi realizada segundo Argyri, Miller, Glahn, Zhu, & Kapsokelafou (2007). Farinha (0,05 g/mL) e isolados proteicos (0,01 g/ mL) dispersos em água tiveram o pH ajustado para 2,8 (HCl 6 mol/L) e adicionados de 0,5 mL de uma suspensão de pepsina (4 g da enzima em

100 mL HCl 0,1 mol/L) incubadas por 2 h em banho (37°C) com agitação. A seguir o pH ajustado para 5,7 (NaOH 5 mol/L) e adicionadas de 2,50 mL da solução de pancreatina com ácidos biliares (0,20 g da enzima e 1,20 g de sais biliares em 100 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L), seguido de incubação (2 h em agitação a 37°C) nas mesmas condições anteriores. As amostras foram centrifugadas (9000×g/ 15 min/ 20°C) e o nitrogênio digerido determinado no sobrenadante pelo método de Kjeldahl. O resultado foi expresso em porcentagem de nitrogênio solúvel em relação a quantidade na amostra inicial.

### *2.10. Análise estatística*

Resultados foram expressos como média ± desvio padrão e avaliados por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para verificar a diferença entre as médias, com um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Utilizando programa estatístico XLSTAT versão 2012.6.03 (Addinsoft, França).

## **3. Resultados e discussão**

### *3.1. Composição química, rendimento de extração proteica e eliminação de fenólicos*

A composição química e rendimento de extração proteica estão apresentados na Tabela 1. O uso de grãos sem cascas, na produção da farinha contribuíram para redução do conteúdo fibra alimentar total, ocasionando elevação do conteúdo de seus demais componentes, principalmente do teor proteico (61,06 g/100 g em base seca). Os FC obtidos dos diferentes sistemas de extração apresentaram uma composição nutricional interessante, devido à proporção elevada de componentes de grande interesse pela indústria de alimentos como também para alimentação, tais como proteína e fibras. Teor de fibra acima de 35,15 g/100 g em base seca e um conteúdo proteico de até 44,30 g/100 g em base seca foram obtidos. O conteúdo fibroso mais elevado foi do FCB, possivelmente devido ao seu conteúdo de cinzas reduzido, de 3 a 4 vezes menor que os demais, o que ocasionou a concentração dos demais componentes (Van Soest, Robertson, & Lewis, 1991). O teor de resíduo mineral foi o menor na amostra FCB, provavelmente, devido à força iônica da



solução de bissulfito de sódio, que concentrou os íons no extrato fenólico, visto que o conteúdo mineral de SIB também foi proporcionalmente um dos menores dentre os isolados proteicos.

Rendimentos de recuperação da proteína nos isolados variaram de 43,24% a 60,40%, sendo que o SIE mostrou menor rendimento (43,24%) e conteúdo proteico (92,08 g/100 g em base seca). Todavia, todos os isolados submetidos a extração prévia com diferentes soluções extratoras, apresentaram redução de fenólicos, mostrada na Tabela 2. Características semelhantes de menor rendimento de proteínas na produção de concentrados proteicos de girassol utilizando etanol 70% foram observadas por Salgado e colaboradores (2011). As demais amostras mostraram rendimento de proteína semelhante, inclusive o isolado convencional, na faixa de 55,67% a 60,40%. Contudo, a amostra SI como esperado arrastou o maior conteúdo de ácido clorogênico (0,45 g/100 g base seca), pois não passou pela etapa de extração prévia dos fenólicos, antes do tratamento alcalino.

Os isolados proteicos SIB e SIM não apresentaram diferenças em relação ao conteúdo proteico, rendimento e residual de fenólicos, mostrando que mistura entre um solvente orgânico (etanol) e um agente redutor (bissulfito de sódio) tem efeitos combinados que conduzem aos melhores bons resultados. Outros trabalhos empregando diferentes métodos, como o de Pickardt et al. (2011) obtiveram isolados proteicos com elevados conteúdo de proteína (99 g/100 g), aplicando sistema salino (2 mol/L) em meio levemente ácido (pH 6), com rendimento proteico de 58,00%. Para redução dos compostos fenólicos utilizou resina polimérica para adsorção, resultando um residual de 0,26 g/100 g em base seca de ácido clorogênico. Porém, etapas de lavagem foram necessárias a fim de desalinizar o produto obtido, uma vez que foi utilizada elevada concentração salina para favorecer a extração das proteínas (Pickardt et al., 2009).

Valores encontrados em outros trabalhos diferem deste, tanto no conteúdo fenólico residual como no conteúdo e rendimento proteico, devido às diferentes matérias-primas e metodologias empregadas (González-Pérez et al., 2002; Kabirullah & Wills, 1981; Pickardt, Eisner, Kammerer, & Carle, 2015; Salgado et al., 2011; Salgado et al., 2012; Shchekoldina, & Aider, 2012). Estas diferenças podem ser atribuídas ao uso de diferentes soluções, tempo de extração e intensidade de agitação que diferem entre os processos (Salgado et al., 2011; Salgado et al., 2012).

**Tabela 1.** Composição química do grão inteiro de girassol, grão descascado e farinha usada para produzir os isolados proteicos e concentrados fibrosos. Rendimento foi expresso como recuperação de proteína para cada processo de produção dos isolados proteicos.

Amostras de girassol <sup>A</sup>	Composição química (g/ 100 g)					Rendimento (%)
	Lipídios	Proteínas	Cinzas	Umidade	Fibras dietéticas	Recuperação de proteínas
Grão inteiro	39,99 ± 0,36 <sup>b</sup>	18,36 ± 0,11 <sup>g</sup>	3,21 ± 0,01 <sup>e,f,g</sup>	7,82 ± 0,04 <sup>a</sup>	36,08 ± 0,07 <sup>c</sup>	-
Grão sem casca	57,68 ± 0,44 <sup>a</sup>	25,99 ± 0,49 <sup>f</sup>	3,94 ± 0,02 <sup>e,f</sup>	6,03 ± 0,04 <sup>b,c,d,e</sup>	6,73 ± 0,11 <sup>e</sup>	-
Farinha	1,70 ± 0,28 <sup>c</sup>	61,06 ± 0,33 <sup>c</sup>	8,63 ± 0,04 <sup>d</sup>	9,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	15,93 ± 0,05 <sup>d</sup>	-
Isolados proteicos						
SI	ND	92,68 ± 2,02 <sup>b</sup>	2,26 ± 0,08 <sup>g</sup>	5,44 ± 0,37 <sup>c,d,e,f</sup>	ND	60,40 ± 3,01 <sup>a</sup>
SIE	ND	92,08 ± 1,10 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,25 <sup>e,f</sup>	3,54 ± 1,64 <sup>f,g</sup>	ND	43,24 ± 1,67 <sup>b</sup>
SIB	ND	94,81 ± 0,82 <sup>a,b</sup>	2,48 ± 0,04 <sup>f,g</sup>	3,34 ± 0,27 <sup>g</sup>	ND	55,67 ± 1,20 <sup>a</sup>
SIM	ND	95,69 ± 2,30 <sup>a</sup>	3,86 ± 0,84 <sup>e,f</sup>	4,15 ± 1,71 <sup>f,g</sup>	ND	58,90 ± 0,75 <sup>a</sup>
Concentrados fibrosos						
SFC	ND	23,01 ± 0,80 <sup>f</sup>	21,99 ± 1,94 <sup>a</sup>	6,92 ± 0,12 <sup>b,c</sup>	43,62 ± 0,49 <sup>b</sup>	-
FCE	ND	44,30 ± 0,33 <sup>d</sup>	15,92 ± 0,18 <sup>c</sup>	4,81 ± 0,68 <sup>d,e,f,g</sup>	35,15 ± 0,79 <sup>c</sup>	-
FCB	ND	35,67 ± 1,39 <sup>e</sup>	4,74 ± 1,06 <sup>e</sup>	4,60 ± 0,07 <sup>e,f,g</sup>	60,84 ± 0,21 <sup>a</sup>	-
FCM	ND	37,87 ± 0,29 <sup>e</sup>	17,83 ± 0,15 <sup>b</sup>	6,77 ± 0,39 <sup>b,c,d</sup>	43,10 ± 0,44 <sup>b</sup>	-

Valores de composição química foram expressos em base seca. Proteínas (N = 5,75). ND = não determinado. (n = 2).

Rendimento (%) = são expressos como média da recuperação proteica para cada processo considerando o teor de proteína em 100% da farinha.

a, b, c, d, e, f, g Valores de média nas colunas seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

<sup>A</sup> Abreviações na coluna 'Amostras de girassol' representam isolados de proteína de girassol e concentrados fibrosos obtidos sem extração de compostos fenólicos (SI e SFC) e com extração prévia de compostos fenólicos utilizando solução de etanol 70% (SIE e FCE), bissulfito de sódio 0,1% e FCB) E uma mistura de etanol a 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30) (SIM e FCM), respectivamente.

O conteúdo de fenólicos totais da farinha, determinado pelo ensaio utilizando o reagente Folin-Cicalteu, foi de 4,00 ( $\pm 0,01$ ) g/100 g em base seca, expresso em equivalente de ácido clorogênico. Neste estudo, o ácido clorogênico determinado por HPLC corresponde a aproximadamente 62% dos fenólicos totais, pois a farinha apresentou 2,46 g/100 g em base seca. Valores de fenólicos totais são comparáveis aos de Weisz e colaboradores (2009) em farelo de girassol desengordurado ( $\sim 4,20$  g/100 g). Neste trabalho o perfil de compostos fenólicos foi discriminado e o ácido clorogênico foi predominante em todas as frações e várias variedades de girassol analisadas. Baseado nos dados da literatura o ácido clorogênico foi selecionado para expressar o rendimento de extração de compostos fenólicos.

Apesar dos elevados rendimentos de extração de fenólicos, nenhum dos processos extrativos apresentou sua remoção completa, provavelmente devido à interação com proteínas (Salgado et al., 2012). González-Perez et al. (2002) obteve remoção total de ácido clorogênico e cafeico utilizando metanol 80%. Outros métodos de eliminação de fenólicos utilizando resina de adsorção (Weisz et al., 2010) e combinação de métodos extração ácida branda com adsorção e troca iônica em resina levaram à remoções acima de 99,40% (Pickardt et al., 2015).

**Tabela 2.** Conteúdo de ácido clorogênico (ACG) da farinha e isolados proteicos e sua eliminação dos isolados proteicos em relação a quantidade presente na farinha.

Amostras de girassol <sup>A</sup>	ACG (g/100 g)	Eliminação ACG (%)
Farinha	2,46 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	-
Isolados proteicos		
SI	0,45 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	80,86 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
SIE	0,07 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	97,01 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
SIB	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	96,53 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
SIM	0,08 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	96,71 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>

Os valores na coluna 'ACG' são expressos em base seca.

<sup>a,b,c</sup> Valores de média seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

<sup>A</sup> Abreviações na coluna 'Amostras de girassol' são isolados proteicos de girassol obtidos sem extração de compostos fenólicos (SI) e com extração prévia de compostos fenólicos utilizando etanol 70% (SIE), bissulfito de sódio 0,1% (SIB) e uma mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% na proporção 70:30 (SIM).

### 3.2. Cor dos isolados proteicos

Os parâmetros de cor observados nos isolados proteicos apresentaram

diferenças de tonalidade entre eles (Tabela 3), provavelmente relacionadas com a ligação dos compostos fenólicos as proteínas durante a extração proteica, pois a farinha mesmo com maior conteúdo de fenólicos (2,46 g/100 g em base seca) foi a mais clara (maior  $L^*$ ). Dentre os isolados proteicos SIE foi o mais claro (maior  $L^*$ ) e SIB mais escuro, de tonalidade levemente mais avermelhada (maior  $a^*$ ) quando comparado com SIM. O isolado proteico SI apresentou tonalidade esverdeada (valor negativo de  $a^*$ ), característica indesejável, pois a cor é considerada um item importante para a aplicação tecnológica dos isolados. A cor verde escura pode ser atribuída à presença dos compostos fenólicos oxidados durante a extração alcalina das proteínas (Saeed & Cheryan, 1988). Portanto, Budryn e Rachwal-Rosiak (2013) afirmam ser necessário a remoção dos compostos fenólicos, para obter uma proteína de alta qualidade e sem a pigmentação verde, decorrente da oxidação de fenólicos e ligação covalente às proteínas. Entretanto, devido ao apelo dos fenólicos em relação a sua capacidade antioxidante e benefícios provenientes desta, é discutível a busca um balanço entre capacidade antioxidante e a cor dos produtos proteicos (Salgado et al., 2011; Wildermuth et al., 2016).

**Tabela 3.** Parâmetros de cor de farinha de girassol e isolados de proteína.

Amostras de girassol <sup>A</sup>	Parâmetros de cor		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Farinha	85,16 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,04 <sup>d</sup>	8,11 ± 0,14 <sup>d</sup>
Isolados proteicos			
SI	51,66 ± 0,12 <sup>e</sup>	-7,02 ± 0,03 <sup>e</sup>	2,21 ± 0,02 <sup>e</sup>
SIE	66,88 ± 0,38 <sup>b</sup>	1,16 ± 0,08 <sup>c</sup>	10,23 ± 0,33 <sup>c</sup>
SIB	62,27 ± 0,09 <sup>d</sup>	5,17 ± 0,07 <sup>a</sup>	12,22 ± 0,07 <sup>b</sup>
SIM	65,11 ± 0,35 <sup>c</sup>	3,73 ± 0,02 <sup>b</sup>	12,92 ± 0,06 <sup>a</sup>

a, b, c, d, e Valores de média nas colunas seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

$L^*$  (luminosidade),  $a^*$  = (+a= avermelhado, -a = esverdeado),  $b^*$  = (+b = amarelado, -b= azulado).

<sup>A</sup> Abreviações na coluna 'Amostras de girassol' representam os isolados proteicos de girassol obtidos sem extração de compostos fenólicos (SI) e com extração prévia de compostos fenólicos utilizando solução de etanol 70% (SIE), bissulfito de sódio 0,1% (SIB) e uma mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30) (SIM).

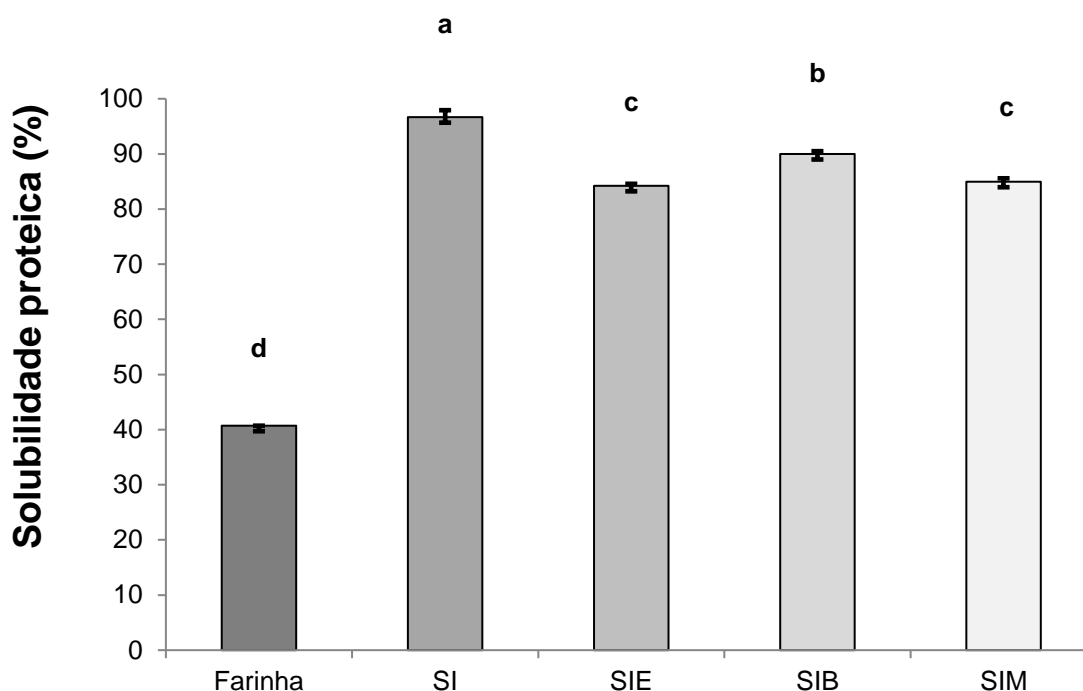
### 3.3. Solubilidade e estabilidade térmica dos isolados proteicos

Resultados obtidos (Fig. 2) mostram elevada solubilidade em água dos

isolados, com valores entre 78,49% a 96,66%, independente do conteúdo residual de fenólico. Visto que, amostra SI mostrou maior valor (96,66%) de proteína solúvel em relação as demais amostras, embora apresente maior conteúdo de fenólicos (0,45 g/ 100g em base seca). Rahma e Rao (1981) ao aplicar diversos tipos de soluções extratoras observaram que solventes orgânicos reduzem a solubilidade dos isolados proteicos, fato apresentado pelas amostras SIE e SIM. A solubilidade da farinha foi bem reduzida em relação aos isolados (40,71%), possivelmente devido ao envolvimento das proteínas com os demais os componentes da matriz.

Estudos afirmam que a ligação não covalente dos compostos fenólicos às proteínas globulares não altera de modo pronunciado a solubilidade, enquanto a ligação covalente pode ocasionar efeitos deletérios nas propriedades funcionais da proteína (Prigent, Gruppen, Visser, Van Koningsveld, De Jong, & Voragen, 2003). Valores distintos de solubilidade proteica foram encontrados na literatura, sendo de aproximadamente 10% a 80%. Estes resultados devem refletir a desnaturação proteica como consequência dos procedimentos adotados para extração dos fenólicos e/ou proteínas (González-Pérez et al., 2002; Salgado et al., 2011; Pickardt et al., 2009; Pickardt, et al., 2015).

Os valores das temperaturas de desnaturação proteica dos isolados obtidos neste trabalho variaram entre 108,7°C a 113,0°C, um pouco acima (~105,0°C) do valor encontrado para globulina heliantinina, majoritária do girassol, no pH entre 6 e 8 (Molina, Petrucelli & Añón, 2004). A amostra SIE apresentou a menor temperatura de desnaturação (108,7°C) bem como menor solubilidade. Já a menor entalpia de desnaturação foi registrada para a amostra SIM, sendo que as demais foram ligeiramente superiores e não apresentaram diferença entre elas (dados não mostrados). A solubilidade da proteína bem como a entalpia de desnaturação das proteínas revela que as condições do processo foram brandas e não ocasionaram desnaturação acentuada das proteínas.



**Fig. 2.** Solubilidade proteica (pH 7) da farinha e isolados proteicos obtidos sem extração de compostos fenólicos (SI) e com extração prévia dos compostos fenólicos utilizando soluções de etanol 70% (SIE), bissulfito de sódio 0,1% (SIB) e mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% (70:30) (SIM). Valores reportados para cada amostra são média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). As barras seguidas por letras diferentes diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

### 3.4. Avaliação nutricional

A farinha de girassol e produtos obtidos apresentaram balanceamento adequado dos aminoácidos essenciais, exceto para o aminoácido lisina, de acordo ao padrão da FAO/OMS/ONU (2007). Na farinha os aminoácidos limitantes foram lisina (0,70), e sulfurados (0,81) (Tabela 4). Os resultados mostram que os processos utilizados para a obtenção dos isolados reduziram ainda mais os teores de lisina (0,48 a 0,59). Esta redução provavelmente foi ocasionada pelo álcali na etapa de extração proteica (Bagnis, 1984). Embora a lisina seja um aminoácido essencial e indicativo da qualidade nutricional, não exclui o girassol de ser considerado uma proteína adequada de qualidade e complementar a outras fontes proteicas cujo teor de lisina seja excedente (Conde, Escobar, Jiménez, Rodríguez, & Patino, 2005).

**Tabela 4.** Composição de aminoácidos essenciais e PDCAAS para farinha de girassol e isolados proteicos.

Aminoácidos (mg/g proteína)	FAO (referência) <sup>A</sup>	Farinha		Isolados Proteicos <sup>B</sup>							
		AA	CS	SI		SIE		SIB		SIM	
				AA	CS	AA	CS	AA	CS	AA	CS
Histidina	16,00	24,81	1,55	26,22	1,64	25,43	1,59	25,36	1,58	26,70	1,67
Isoleucina	31,00	41,65	1,34	45,67	1,47	44,60	1,44	42,68	1,38	46,74	1,51
Leucina	61,00	61,83	1,01	66,04	1,08	63,71	1,04	62,93	1,03	66,68	1,09
Lisina	48,00	33,83	0,70	29,05	0,61	26,85	0,56	25,35	0,53	28,93	0,60
Metionina + cisteína	24,00	19,40	0,81	31,33	1,31	30,30	1,26	27,29	1,14	30,50	1,27
Fenilalanina + tirosina	41,00	72,05	1,76	80,73	1,97	82,36	2,01	75,90	1,85	84,18	2,05
Treonina	25,00	39,20	1,57	39,49	1,58	36,83	1,47	33,09	1,32	39,19	1,57
Triptofano	6,60	10,90	1,65	13,49	2,04	14,38	2,18	14,71	2,23	13,51	2,05
Valina	40,00	50,67	1,27	55,97	1,40	53,09	1,33	50,56	1,26	56,72	1,42
Digestibilidade (%)		83,13 ± 0,82 <sup>c</sup>		90,66 ± 2,64 <sup>b</sup>		95,32 ± 1,13 <sup>a</sup>		91,72 ± 2,17 <sup>a,b</sup>		91,62 ± 1,93 <sup>a,b</sup>	
PDCAAS		0,59 ± 0,00 <sup>a</sup>		0,55 ± 0,00 <sup>b</sup>		0,53 ± 0,00 <sup>c</sup>		0,48 ± 0,00 <sup>d</sup>		0,55 ± 0,00 <sup>b</sup>	

<sup>A</sup> FAO (referência) aminoácidos essenciais recomendados para crianças de 3-10 anos pela FAO/OMS/ONU, 2007.

AA = aminoácidos. ( $n = 2$ ) CS = escore químico. PDCAAS = digestibilidade proteica corrigida pelo escore de aminoácidos.

<sup>a, b, c</sup> Valores médios de digestibilidade ( $n = 4$ ) nas linhas seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

<sup>B</sup> Valores em colunas abaixo da linha 'Isolados proteicos' representam isolados proteicos de girassol obtidos sem extração de compostos fenólicos (SI) e com extração prévia de compostos fenólicos utilizando solução de etanol a 70% (SIE), bissulfito de sódio 0,1% (SIB) e uma mistura de etanol 70%.

Existem controvérsias sobre a influência dos fenólicos na digestibilidade das proteínas. Alguns autores encontraram valores reduzidos para a digestibilidade *in vitro*, justificando que a ligação entre compostos fenólicos e proteínas do girassol poderia ocasionar inibição de enzimas digestivas proteolíticas (Bau, Mohtadi-Nia, Mejean, & Debry, 1983; Synge, 1975). Porém, estudos com animais mostraram que a presença do ácido clorogênico não afetou a digestibilidade *in vivo* das proteínas (Eklund, 1975; Treviño, Rebolé, Rodríguez, Ortiz, Centeno, & Alzueta, 1998). Salgado et al. (2012) mostraram uma elevada digestibilidade *in vitro*, onde a amostra de concentrado proteico sem pré-extração dos fenólicos, contendo 2,50 g/100 g em base seca de compostos fenólicos, apresentaram 95,40% de digestibilidade. As amostras avaliadas neste estudo também mostraram elevados valores de digestibilidade *in vitro* (Tabela 4), sendo todos os valores dos isolados proteicos acima de 90%. O maior valor de digestibilidade foi apresentado pela amostra SIE. A farinha apresentou menor digestibilidade proteica (83,13%), provavelmente, devido a interação das proteínas com outros componentes da matriz, como também teor elevado de compostos fenólicos (4,00 g/100 g em base seca). Foi observado que o conteúdo de compostos fenólicos afeta sensivelmente a digestibilidade, pois a amostra SI com residual de 0,45 g/100 g em base seca de ácido clorogênico também apresentou digestibilidade reduzida (90,66%) em relação aos demais isolados (Tabela 4).

A digestibilidade da proteína quando associada à limitação da lisina determinada pelo escore químico dos aminoácidos dos isolados reflete nos valores calculados de PDCAAS. A farinha foi a amostra que apresentou maior valor (0,59), sendo o menor resultado obtido para a amostra SIB (0,48). As demais não apresentaram diferença significativa.

#### **4. Conclusão**

A potencialidade de uso integral da farinha para obtenção fracionada de seus componentes foi demonstrada. Os isolados proteicos mostraram baixo residual de fenólicos, elevado rendimento de recuperação das proteínas, principalmente o que empregou a mistura de bissulfito de sódio 0,1% e etanol 70% (70:30). Os concentrados fibrosos além das fibras como componente principal, apresentaram um



considerável conteúdo proteico. Os compostos fenólicos mesmo em quantidade reduzida afetaram a coloração e digestibilidade dos isolados proteicos. Entretanto, as características e propriedades dos produtos obtidos se mostraram apropriadas para aplicação como ingrediente alimentar.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a empresa Giroil Agroindústria Ltda e ao suporte financeiro do CNPq (processo 402022/2014-9) e T. D. Alexandrino agradece ao CNPq pela bolsa concedida (processo 133901/2015-7).

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## **Referências**

- Añón, M. C. (2000). Calorimetria diferencial de barrido. In A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai (Eds.), *Caracterizacion funcional y estructural de proteínas* (pp. 97–126). Buenos Aires: Eudeba.
- Argyri, K., Miller, D. D., Glahn, R. P., Zhu, L., & Kapsokefalou, M. (2007). Peptides isolated from in vitro digests of milk enhance iron uptake by Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(25), 10221-10225.
- Bagnis, C. G. (1984). *Isolado protéico de girassol obtenção e propriedades*. Dissertação de Mestrado, Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas.
- Bau, H. M., Mohtadi-Nia, D. J., Mejean, L., & Debry, G. (1983). Preparation of colorless sunflower protein products: Effect of processing on physicochemical and nutritional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *60*(6), 1141–1148.

- Budryn, G., & Rachwal-Rosiak, D. (2013). Interactions of hydroxycinnamic acids with proteins and their technological and nutritional implications. *Food Reviews International*, 29(3), 217–230.
- Conde, J. M., Escobar, M. del M. Y., Jiménez, J. J. P., Rodríguez, F. M., & Patino, J. M. R. (2005). Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8038–8045.
- Eklund, A. (1975). Effect of chlorogenic acid in a casein diet for rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 18(5–6), 258–264.
- FAO/OMS/ONU. (2007). Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: Protein and amino acid requirements in human nutrition.
- Firestone, D. (ed.) (2013). *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 6th ed., AOCS, Urbana, Illinois, USA.
- Gassmann, B. (1983). Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. *Food / Nahrung*, 27(4), 351–369.
- González-Pérez, S., & Vereijken, J. M (2007). Review. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173–2191.
- González-Pérez, S., Merck, K. B., Vereijken, J. M., Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., & Voragen, A. G. J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1713–1719.
- Hagen, S. R., Frost, B., & Augustin, J. (1989). Precolumn phenylisothiocyanate

- derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72, 912-916.
- Henley, E. C., & Kuster, J. M. (1994). Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. *Food Technology*, 48(4), 74-77.
- Kabirullah, M., & Wills, R. B. H. (1981). Functional properties of sunflower protein following partial hydrolysis with proteases. *Lebensmittel-Wissenschaft +Technologie = Food science+ technology*, 14, 232–236.
- Kim, D., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321–326.
- Latimer Jr., G. W. (ed.) (2012). *Official methods of analysis of AOAC International*. In 19<sup>th</sup> ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Molina, M. I., Petruccelli, S., & Añón, M. C. (2004). Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 6023–6029.
- Pedroche, J. (2015). Utilization of Sunflower Proteins. In E. Martínez-Force, N. T. Dunford, J. J Salas. *Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (pp. 395–439). United States of American: United States of American.
- Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., García-Vallejo, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Ayet, G., et al. (2000). Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(4), 459–464.
- Pickardt, C., Eisner, P., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2015). Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption. *Food*

*Hydrocolloids*, 44, 208–219.

Pickardt, C., Hager, T., Eisner, P., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Isoelectric protein precipitation from mild-acidic extracts of de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake. *European Food Research and Technology*, 233(1), 31–44.

Pickardt, C., Neidhart, S., Griesbach, C., Dube, M., Knauf, U., Kammerer, D. R., et al. (2009). Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1966–1973.

Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. In A. M. R. Pilosof, & G. B. Bartholomai (Eds.), *Caracterizacion funcional y estructural de proteínas* (pp. 31–39). Buenos Aires: Eudeba.

Prigent, S. V. E., Gruppen, H., Visser, A. J. W. G., Van Koningsveld, G. A., De Jong, G. A. H., & Voragen, A. G. J. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5088–5095.

Rahma, E. H., & Rao, M. S. N. (1981). Removal of polyphenols from sunflower meal by various solvents - effects on functional-properties. *Journal of Food Science*, 46(5), 1521-1522.

Saeed, M., & Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. *Journal of Food Science*, 53(3), 1127–1131.

Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2011). Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 351–360.

Salgado, P. R., Drago, S. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., Andrich, O.,

- González, R. J., et al. (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 65–72.
- Shchekoldina, T., & Aider, M. (2012). Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2331–2343.
- Sodini, G., & Canella, M. (1977). Acidic butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(4), 822-825.
- Spies, J. R. (1967). Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, 39(12), 1412–1416.
- Synge, R. L. M. (1975). Interactions of polyphenols with proteins. *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition*, 24, 337–350.
- Tfouni, S. A. V., Serrate, C. S., Carreiro, L. B., Camargo, M. C. R., Teles, C. R. A., Cipolli, K. M. V. A. B., et al. (2012). Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two *Coffea* cultivars: *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and *Coffea canephora* cv. Apoatã IAC-2258. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), 406-415, 2012.
- Treviño, J., Rebolé, A., Rodríguez, M. L., Ortiz, L. T., Centeno, C., & Alzueta, C. (1998). Nutritional effect of chlorogenic acid fed to growing broiler chicks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 156–160.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597.

- USDA. United States Department of Agriculture (2016). Oilseeds: world market and trade. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso 02.10.16
- Weisz, G. M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS<sup>n</sup>. *Food Chemistry*, 115(2), 758–765.
- Weisz, G. M., Schneider, L., Schweiggert, U., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2010). Sustainable sunflower processing - I. Development of a process for the adsorptive decolorization of sunflower [*Helianthus annuus* L.] protein extracts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 733–741.
- White, J. A., Fry, J. C., & Hart, R. J. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8(4), 170–177.
- Wildermuth, S. R., Young, E. E., & Were, L. M. (2016). Chlorogenic acid oxidation and its reaction with sunflower proteins to form green-colored complexes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 0, 1–15.

**CAPÍTULO 3**  
**POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO E ANTIPROLIFERATIVO DE**  
**EXTRATO FENÓLICO DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)**

Thaís Dolfini Alexandrino, Marta Gomes da Silva, Roseli Aparecida Ferrari, Ana  
Lúcia Tasca Gois Ruiz, Renata Maria Teixeira Duarte, Maria Teresa Bertoldo  
Pacheco

O artigo será traduzido para o inglês e submetido à revista *Food Chemistry*.

## Resumo

Extratos fenólicos brutos de girassol foram obtidos a partir de farinha desengordurada com soluções extratoras de bissulfito de sódio 0,1% e etanol 70%. Os extratos foram caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos e avaliadas as atividades *in vitro* antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa. O conteúdo de fenólicos totais determinados em equivalente de ácido gálico (AG) e clorogênico (ACG) resultaram em 70,03 mg AG eq/g e 115,74 mg ACG eq/g para extrato obtidos com bissulfito de sódio 0,1% e 92,7 mg AG eq/g e 154,35 mg eq ACG/g com etanol 70%, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de ABTS e DPPH. Ambos extratos mostraram atividade antioxidante, conferida pela presença dos compostos fenólicos. A ação antimicrobiana dos extratos fenólicos foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) para 5 bactérias e 1 levedura. A atividade antimicrobiana do extrato elaborado com bissulfito de sódio se mostrou mais efetiva contra as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (CIM 3,00 mg/mL) e Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* (CIM 2,50 mg/mL). Os extratos não mostraram atividade citotóxica contra a proliferação das 9 linhagens de células tumorais e 1 linhagem não tumoral testadas. O extrato bruto de girassol pode ser considerado fonte de compostos fenólicos com ação antioxidante, e sua extração utilizando bissulfito de sódio conferiu-lhe uma ação antimicrobiana. Ambos exibiram um potencial para futuras aplicações na indústria de alimentos.

Palavras-chave: extrato fenólico, girassol, atividade antimicrobiana, atividade antiproliferativa, capacidade antioxidante.

### 1. Introdução

O girassol (*Helianthus annuus* L.) uma das maiores culturas de oleaginosas do mundo. O processo de extração do óleo gera um subproduto de elevado teor proteico e rico em compostos fenólicos. O conteúdo de fenólicos representa de 1 a 4 g/100 g, com predominância do ácido clorogênico (Saeed & Cheryan, 1988; USDA, 2016; Weisz, Kammerer, & Carle, 2009). Para a utilização deste subproduto



proteico do girassol, a extração dos compostos fenólicos é de suma importância, pois os fenólicos se ligam as proteínas e causam alterações de suas propriedades funcionais e características organolépticas indesejáveis, impedindo sua aplicação na alimentação humana (González-Pérez, Merck, Vereijken, Van Koningsveld, Gruppen, & Voragen, 2002; Pedrosa et al., 2000; Sodini & Canella, 1977; Weisz et al., 2009).

De encontro ao processamento de retirada dos compostos fenólicos, tem sido observada uma tendência pelo uso de agentes naturais antimicrobianos e antioxidantes pelas indústrias de alimentos. A substituição dos aditivos sintéticos por naturais em alimentos tem sido almejada visto que há algumas alegações de efeitos prejudiciais à saúde (Wildermuth, Young, & Were, 2016). Compostos fenólicos do girassol exibiram elevado poder antioxidante quando avaliados *in vitro* (Karakaya, 2004). Trabalhos desenvolvidos por Salgado, Molina Ortiz, Petruccelli, & Mauri (2010) e Salgado, López-Caballero, Gómez-Guillén, Mauri e Montero (2012b) utilizaram isolados proteicos de girassol naturalmente enriquecidos de compostos fenólicos na elaboração de filmes biodegradáveis e os resultados mostraram seu potencial como agente antioxidante.

Inúmeras funções biológicas têm sido atribuídas aos compostos fenólicos, dentre elas antioxidante, antibacteriana, antimutagênica e antiinflamatória (Albayrak, Aksoy, Sagdic, & Hamzaoglu, 2010; Senevirathne, Kim, Siriwardhana, Ha, Lee, & Jeon, 2006). Estudos realizados com o intuito de separar, identificar e quantificar tais compostos, a partir de fontes naturais, tem como objetivo futuras aplicações tecnológicas em alimentos processados e nutracêuticos (Gunduc & El, 2003; Salgado et al., 2012a; Shahidi, Alasalvar, & Liyana-Pathirana, 2007).

Os compostos fenólicos compreendem os ácidos fenólicos e flavonóides. Dentre os ácidos fenólicos se encontram os derivados do ácido benzóico como o ácido gálico e derivados do ácido cinâmico, como o ácido cumarinico, caféico e ferrúlico (Karakaya, 2004). O mais abundante em frutas e vegetais é o ácido cafeico, frequentemente encontrado na forma esterificada com o ácido quínico, denominado ácido clorogênico (D'Archivio, Filesì, Di Benedetto, Gargiulo, Giovannini, & Masella, 2007).

Já se encontra bem estabelecida a realização de testes *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais humanas para avaliação preliminar do potencial de

extratos brutos e de substâncias puras isoladas. Em extratos de farinhas de frutas a capacidade de inibir a proliferação de células de câncer de cólon HT-29 foi significativamente correlacionada ao conteúdo de compostos fenólicos. Isso sugere que sua presença pode ser um importante indicador para atividade antiproliferativa (Parry et al., 2006).

Devido a poucos dados presentes na literatura sobre as características bioativas do extrato bruto de compostos fenólicos de girassol, o propósito do presente estudo foi extrair os compostos fenólicos com diferentes soluções, quantificar e avaliar seu potencial quanto às atividades *in vitro*: antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Material*

Grãos de girassol (*Helianthus annuus* L.) sem cascas, variedade Aguará 3, para obtenção da farinha foram fornecidos pela empresa Giroil Agroindústria Ltda (Santo Ângelo, RS, Brasil). Os reagentes ácido clorogênico, ácido gálico, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e Trolox foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes utilizados foram grau e pureza analítica.

### *2.2. Preparação da farinha de girassol*

A farinha desengordurada de girassol foi obtida através da extração do óleo dos grãos sem casca realizada em duas etapas: 1) extração a frio em prensa mecânica (Carver Press, USA), 2) extração do óleo residual da torta com solvente hexano em extrator de Soxhlet. O material sem óleo foi moído (Retsch ZM 200, Alemanha) e homogeneizado e utilizado para extração dos fenólicos.

### *2.3. Extração dos compostos fenólicos da farinha de girassol*

As condições utilizadas foram baseadas na metodologia de Salgado, Ortiz,

Petrucelli, e Mauri (2011) com modificações. Foram utilizadas como soluções extratoras bissulfito de sódio 0,1% (p/v) e etanol 70% (v/v) em água. A farinha foi dispersa na proporção 1:10 (p/v) nas soluções extratoras, o pH ajustado para 5 (HCl 1 mol/L) e permaneceram em agitação por 1 h, com monitoramento do pH. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a  $11000\times g$  por 20 min a 20°C (Sorvall RC-26 Plus, USA). O extrato fenólico obtido com solução de etanol 70% teve o solvente evaporado em evaporador rotatório (Logen Scientific, LSRE, circulador de água Logen Scientific, LS 540, Reino Unido e bomba Vacuunbrand, PC3001 Vario, Alemanha) à 40°C. Os extratos de ambos procedimentos foram congelados a -20°C e liofilizados para realização das análises. Para todas análises a seguir foram utilizadas alíquotas a partir da dispersão de 100 mg do extrato liofilizado diluído em 100 mL de água destilada, resultando na concentração de 1 mg/mL.

#### *2.4. Determinação dos compostos fenólicos totais*

As concentrações de fenólicos totais foram determinadas nos extratos liofilizados e expressas em equivalente de ácido gálico e clorogênico segundo a metodologia de Kim, Jeong, e Lee (2003). Para reação utilizou-se uma alíquota de 1 mL do extrato diluído (1 mg/mL), 9 mL de água destilada, 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu e após 5 min adicionado 10 mL de solução 7% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A absorbância foi determinada após 90 min, a 750 nm (Varian Cary 50, USA), à temperatura de 25°C na ausência de luz, e usadas para calcular o conteúdo de fenólicos utilizando ácidos gálico e clorogênico como padrão. As análises foram feitas em duplicata.

#### *2.5. Capacidade de captura do radical DPPH*

A capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazida) pelos compostos antioxidantes dos extratos foi realizada de acordo com o método descrito por Brand-William, Cuvelier, e Berset (1995). Os extratos diluídos em água (1mg/mL) foram misturados a uma solução de metanol 80% (v/v) na proporção de 1:10 (v/v) e ao DPPH•. A faixa de concentração de DPPH• na análise foi de 13 a 53  $\mu\text{mol/mL}$  e o volume total de reação de 4 mL. Os extratos

foram testados para as suas concentrações de EC<sub>50</sub>, após 60 min de reação a 25°C, com leitura da absorbância em 515 nm. EC<sub>50</sub> é a concentração de extrato necessária para extinguir 50% dos radicais DPPH, sob condições experimentais, num tempo predeterminado. Os resultados também foram expressos em TEAC (mmol de equivalentes Trolox por g de extrato liofilizado) mediante comparação entre a porcentagem de inibição de DPPH• da curva de Trolox e das amostras.

## 2.6. Capacidade de captura do radical ABTS

O ensaio foi realizado baseado no método descrito por Re, Pelegri, Proteggente, Pannala, Yang e Rice-Evans (1999), com modificações. O radical catiônico ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (0,76 g/100 mL) foi gerado por reação com persulfato de potássio (0,13 g/100 mL), ambos dissolvidos em água, com incubação à temperatura ambiente (25°C) por 16 h, e posteriormente diluído em metanol até atingir absorbância de 0,70 ± 0,02 à 750 nm. Alíquotas das amostras diluídas em água e depois em metanol 80% foram usadas para reação com ABTS•+. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro e a absorbância obtida a 750 nm. Resultados foram expressos em TEAC (mmol de equivalentes Trolox por g de extrato liofilizado) mediante comparação entre a curva de porcentagem de inibição de ABTS•+ pelo padrão de Trolox e a das amostras.

## 2.7. Avaliação da atividade antimicrobiana pela concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana dos extratos fenólicos de girassol foi estudada contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 5061 e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. As bactérias foram cultivadas em meio de cultura Mueller-Hinton (Merck, Alemanha) por 24 h a 36°C e a levedura foi cultivada em Sabouraud Dextrose Agar (Merck, Alemanha) a 36°C por 48 h.

Os inóculos foram preparados diluindo-se a massa celular em NaCl 0,85% (p/v), ajustados para 0,5 na escala McFarland e confirmados por leitura em

espectrofotômetro a 625 e 530 nm para bactérias e levedura, respectivamente. As suspensões de células bacterianas foram diluídas para análise a  $10^5$  UFC/mL em meio Mueller-Hinton (Merck, Alemanha) e a de levedura para  $10^4$  UFC/mL em meio RPMI-1640 (Difco®). Os testes de CIM foram realizados em triplicata de acordo com CLSI (2012) usando microplacas de cultura de células (96 poços) contendo 100 µL de meio de cultura. O extrato fenólico de girassol, baseado em sua concentração de compostos fenólicos, foi diluído nos meios de cultura (32 mg de ácido gálico/mL). Diluições seriadas do extrato bruto foram realizadas na faixa de 8 a 0,0078 mg/mL. O inóculo (100 µL) foi adicionado aos poços, e as placas foram incubadas a 36°C por 24 e 48 h para bactérias e levedura, respectivamente. Como controle realizou-se o ensaio apenas com a solução de bissulfito de sódio 0,1%, levando em conta as concentrações presentes no extrato, mensuradas através da análise de sulfito (AOAC, 990.28) realizada no extrato líquido. O teste foi realizado na faixa de 0,5 a 0,0002 mg/mL. A CIM foi definida como a menor concentração do material capaz de inibir o crescimento microbiano.

## 2.8. Atividade antiproliferativa

O extrato de compostos fenólicos extraído com bissulfito de sódio foi avaliado *in vitro* quanto a sua atividade antiproliferativa em células humanas tumorais e uma linhagem não tumoral (Tabela 1), de acordo com a metodologia recomendada pelo Instituto Nacional do Câncer NCI/NIH (Frederick, WA, EUA) (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006).

As suspensões celulares, cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) suplementados com 5% soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) e 1% de solução de estreptomicina/penicilina (VitroCell®) foram plaqueadas, em triplicata, em placas de 96 poços (100 µL/poço) e incubadas por 24 horas, a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (T<sub>0</sub>), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento as células dessa placa foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) no momento da adição do extrato.

Após 24 h de incubação, o extrato de compostos fenólicos de girassol foi adicionado sobre as células em quatro concentrações (0,25; 2,5; 25; e 250 µg/mL)

previamente diluído em meio RPMI 1640, SFB 5% e DMSO 0,2% (Merck®). A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL.

Após 48 h de incubação, todas as células tratadas foram fixadas com TCA 50% (p/v) e a proliferação celular determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo proteico celular, usando o corante sulforodamina B (Monks et al., 1991). Desta forma, três medidas de absorbância foram obtidas, no início da incubação (tempo zero,  $T_0$ ) e 48 horas pós-incubação das células na presença (T) e na ausência ( $T_1$ ) do extrato.

A partir dos valores médios de absorbância realizou-se o cálculo do crescimento celular, e considerou-se a relação entre T e  $T_0$ . Assim, quando  $T \geq T_0$ , o crescimento celular foi determinado de acordo com a equação  $100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$ , enquanto para  $T < T_0$ , foi utilizada a equação  $100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$ . Os resultados para cada linhagem foram expressos como crescimento celular, expresso em porcentagem, em função da concentração do extrato de compostos fenólicos, utilizando-se software Origin Pro® 8.0 (OriginLab Corporation).

**Tabela 1** Linhagens de células tumorais e não tumorais humanas utilizadas na análise da capacidade antiproliferativa do extrato de compostos fenólicos do girassol obtido com solução de bissulfito de sódio 0,1%.

Tecidos de origem	Linhagens celulares
Glioma	U251
Mama	MCF-7
Ovário (fenótipo de multirresistência)	NCI-ADR/RES
Rim	786-0
Pulmão (tipo não pequenas células)	NCI-H460
Próstata	PC-3
Ovário	OVCAR-03
Cólon	HT29
Leucemia	K562
Queratinócitos humanos (não tumorais)	HaCat

## 2.9. Análise estatística

Resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para verificar a diferença entre as médias, com um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Utilizando programa estatístico XLSTAT versão 2012.6.03 (Addinsoft, França).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Compostos fenólicos totais extraídos

Resultados do conteúdo de fenólicos totais (Tabela 2) mostraram que a solução de etanol 70% foi mais eficiente na extração dos fenólicos. No trabalho de Salgado et al. (2011) ao testar várias soluções extratoras observaram que o fenólico residual dos concentrados proteicos de girassol foi menor quando utilizada a solução de etanol 70%. Embora, os autores não avaliaram a composição da solução extratora ao final do processo, provavelmente, esta deve conter a maior quantia de fenólicos. Estudo realizado por Weisz e colaboradores (2009), confirma que o ácido clorogênico é o composto predominante dentre os fenólicos, utilizando a técnica de HPLC-DAD/ESI-MS, em amostras de amêndoas, cascas de girassol e farelo desengordurado, procedentes de sementes de várias regiões.

Ao testar diferentes soluções extratoras de fenólicos em farelo desengordurado de girassol tais como: água, metanol 70%, acetona 70% e mistura de acetato de etila e água (70:30 v/v), outro autor considerou a água como sendo a melhor solução extratora (Matthäus, 2002). O autor encontrou o valor de 38,80 mg de eq AG/g de resíduo desengordurado, valor muito abaixo do encontrado no presente trabalho (92,7 mg de eq AG/g de extrato fenólicos obtido com etanol 70%). Karamać, Kosińska, Estrella, Hernández, e Dueñas (2012) utilizando técnica de cromatografia preparativa, metanol como eluente e coluna Sephadex LH-20, conseguiram separar 6 frações de um extrato bruto de fenólicos. Os valores de fenólicos totais das frações variaram de 24,50 mg de eq ACG/g a 666,00 mg eq ACG /g de solução de extrato fracionado. As primeiras frações apresentaram os menores conteúdos de fenólicos devido a possível extração simultânea de açúcares

solúveis, enquanto as últimas frações apresentaram elevados teores devido à maior grau de purificação (Wanasundara, Amarowicz, & Shahidi, 1994). No presente trabalho os valores expressos em ACG para o extrato obtido por etanol 70%, foram equivalentes à segunda fração do extrato obtido por Karamać et al. (2012), referente a 150 mg eq ACG/g. Embora o processo de extração de fenólicos empregado tenha sido eficiente, menores teores foram observados no extrato, provavelmente devido ao arraste de muitos outros componentes solúveis no extrato bruto.

**Tabela 2.** Conteúdo de fenólicos totais expressos em equivalente de ácido gálico (AG/g) e ácido clorogênico (ACG/g) dos extratos fenólicos de girassol obtidos com solução extratora de bissulfito de sódio 0,1% e etanol 70%.

Soluções extratoras	Compostos fenólicos	
	(mg eq AG/g amostra)	(mg eq ACG/g amostra)
Bissulfito de sódio 0,1%	70,25 ± 0,32 <sup>b</sup>	115,74 ± 0,55 <sup>b</sup>
Etanol 70%	92,7 ± 3,8 <sup>a</sup>	154,35 ± 6,50 <sup>a</sup>

AG = ácido gálico. ACG = Ácido clorogênico.

<sup>a,b</sup> Valores de médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tuckey ( $n = 2$ ).

### 3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de extratos naturais de frutas, vegetais e grãos tem sido correlacionada à presença de compostos fenólicos. O potencial antioxidante de vários polifenóis como ácidos cafeico, clorogênico, ferúlico e sinápico, tem sido demonstrada (Moure et al., 2001; Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998). A atividade antioxidante tem sido atribuída, dentre os compostos fenólicos do girassol principalmente, ao ácido clorogênico e em menor extensão ao ácido cafeíco (Salgado et al., 2012b; Velioglu et al., 1998).

Os valores da capacidade antioxidante estão expressos na Tabela 3. Para este trabalho também foi observado uma correlação do conteúdo fenólico (Tabela 2) com a ação antioxidante dos extratos. Foi verificada maior atividade para o extrato obtido com etanol 70% por ambas análises realizadas, e nas menores concentrações de EC<sub>50</sub> (0,36 g amostra/g DPPH•) quando comparado ao extrato



obtido com bissulfito de sódio 0,1% (1,01 g amostra/g DPPH•).

Na avaliação da capacidade antioxidante através da redução do radical ABTS, Karamać et al. (2012) obteve para a fração de fenólicos de girassol, que apresentou 150 mg eq ACG/g de amostra, 0,51 mmol Trolox eq/g. Valores muito próximos aos obtidos neste estudo, como apresentado na Tabela 3. Extratos de resíduo de diferentes oleaginosas como colza, mostarda e crambe avaliados por Matthäus (2002), mostraram através da análise do DPPH, que o girassol teve maior atividade dentre os resíduos analisados. Já Siger, Nogala-Kalucka, e Lampart-Szczapa (2008) ao investigar a capacidade antioxidante de diferentes tortas de oleaginosas observaram maior atividade antioxidante da canola comparada ao girassol.

A ação antioxidante dos ácidos fenólicos ocorre pelo número de grupos hidroxilas na molécula, devido sua habilidade de doação de H (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). A atividade antioxidante *in vivo* dos ácidos hidroxicinâmicos, classe à qual o ácido clorogênico pertence, mostrou efeito na redução de risco de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, incluindo a aterosclerose, inibição de alguns tipos de carcinógenos e doenças neurodegenerativas (Cheng, Dai, Zhou, Yang, & Liu, 2007; Scalbert, Manach, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2013). Em situações onde ocorre o aumento na produção de radicais livres no organismo, o reforço de sistemas endógenos de proteção, através da ingestão de antioxidantes dietéticos pode ser de grande importância para atenuação dos efeitos cumulativos de danos causados por moléculas oxidativas (Silva, Ferreres, Malva, & Dias, 2005).

Embora os extratos fenólicos obtidos apresentem atividade antioxidante, avaliadas pelas análises com radicais ABTS e DPPH, é importante a realização de testes complementares na matriz alimentar ao qual for empregado. A ação dos compostos antioxidantes depende do meio onde estão inseridos, sendo passíveis de auto-oxidação, o que gera substâncias reativas com ação prooxidantes (Moure et al., 2001). Este comportamento foi observado por Frankel, Huang e Aeschbach (1997) na utilização de chá verde em emulsões óleo em água, onde foi observado um efeito prooxidante dos compostos presentes no chá. Estas divergências de ação podem ocorrer devido às diferenças na partição relativa entre fases em sistemas lipídicos, pois a atividade dos antioxidantes naturais é grandemente afetada por fenômenos interfaciais complexos, como emulsões e alimentos, com multicomponentes

(Frankel, 1996).

O antioxidante sintético butylated hydroxyl toluene (BHT) em concentrações de 40 µg/mL possui 83,7% de inibição do radical DPPH (Ghasemzadeh, Jaafar, & Rahmat, 2010). Os extratos fenólicos de girassol obtidos com bissulfito de sódio e etanol 70%, em concentração semelhante (40 µg/mL), apresentam 24,14% e 75,16% de inibição do DPPH, respectivamente. Portanto, os resultados mostraram que para o extrato fenólico bruto de girassol há necessidade de ajustar as concentrações dos extratos para desempenharem um efeito antioxidante similar ao do BHT. É necessário também considerar, ao formular produtos alimentares com adição do extrato, as possíveis interações com as proteínas, bem como alterações organolépticas devido ao sabor amargo dos polifenóis (Budryn & Rachwal-Rosiak, 2013; Moure et al., 2001).

**Tabela 3.** Capacidade de captura dos radicais DPPH• e ABTS•+ expressa em capacidade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC) e DPPH• como coeficiente de inibição (EC<sub>50</sub>) para os extratos fenólicos de girassol obtidos com solução extratora de bissulfito de sódio 0,1% e etanol 70%.

Extratos fenólicos	TEAC (mmol Trolox eq/g)		EC <sub>50</sub> <sup>A</sup> (g amostra/g DPPH•)
	DPPH•	ABTS•+	
Bissulfito de sódio 0,1%	0,40 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,05 <sup>a</sup>
Etanol 70%	0,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,00 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Valores de médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), de acordo com o teste de Tuckey ( $n = 2$ ).

<sup>A</sup> = quantidade em g de extrato equivalente para diminuir a concentração de DPPH em 50% da concentração inicial.

### 3.3. Atividade antimicrobiana

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da CIM para duas amostras: 1) extrato de compostos fenólicos obtido com uso da solução bissulfito de sódio 0,1% e 2) controle contendo apenas a solução de bissulfito de sódio (faixa analisada de 0,5 a 0,0002 mg/mL). E o teor residual de bissulfito de sódio (BS) correspondente ao valor de CIM da amostra 1 estão apresentados na segunda coluna de resultados da Tabela 4.

Foi verificado com os resultados do controle, que a solução de bissulfito de sódio apresentou valores de CIM (0,25-0,50 mg BS/mL) expressivos em relação ao extrato de compostos fenólicos (2,50-4,00 mg/mL) avaliado. Os resultados da amostra 1 foram interessantes, pois apontam para um efeito diferenciado entre o bissulfito de sódio e os compostos fenólicos. Este comportamento pode ser comprovado pelos valores da coluna 2 de resultados da Tabela 4, que apresentam os teores residuais de bissulfito de sódio presente nos resultados de CIM do extrato. Portanto, comparando os valores de CIM nota-se que o teor de bissulfito de sódio presente no extrato foi efetivo em conjunto com os compostos fenólicos em concentrações inferiores aos da amostra 2. Isto denota que de alguma forma a presença do bissulfito de sódio auxilia a expressão da ação dos compostos fenólicos. O extrato elaborado com bissulfito de sódio não foi efetivo para a levedura *C. albicans*, mas foi efetivo contra todas as bactérias, sendo os menores valores de CIM para *S. aureus* (3,00 mg/mL) e *S. choleraesuis* (2,50 mg/mL).

A avaliação do extrato obtido com etanol, testado nas mesmas condições do ensaio (concentração inicial de compostos fenólicos de 8 a 0,0078 mg/mL), não apresentou atividade antimicrobiana. Entretanto, foi observado um menor crescimento microbiano, correspondente à maior concentração de compostos fenólicos presentes, visualizados pela menor intensidade de coloração nos poços da placa. Este fato sugere que provavelmente em maiores concentrações o extrato possa ter um efeito inibitório crescimento microbiano.

Lou, Wang, Zhu, Ma, e Wang (2011) mostraram que a CIM do extrato de folhas de burdock (*Arctium lappa*) contendo ácido clorogênico, em concentrações acima de 98%, foi efetivo para 6 bactérias testadas, onde o maior valor de inibição foi para *E. coli*, de 0,08 mg/ mL. Lou et al. (2011) e verificaram ação dos fenólicos contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, e Puupponen-Pimiä et al. (2001) e Puupponen-Pimiä, Nohynek, Alakomi, e Oksman-Caldentey (2005) observaram ação dos ácidos fenólicos somente contra bactérias Gram-negativas. Salgado et al. (2012b) em sua aplicação de concentrados proteicos de girassol naturalmente enriquecidos com compostos fenólicos na elaboração de filmes observaram que esses conferiram propriedades antioxidantes, mas não mostraram efeito antimicrobiano.

Estudos mostram que o ácido clorogênico pode se ligar e permear a

membrana bacteriana, porém não pode rompê-la completamente. Contudo, o dano provocado pode causar uma mudança irreversível na membrana da célula ocasionando uma perda da habilidade de manter sua integridade causando morte da bactéria (Lou et al., 2011).

**Tabela 4.** Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de compostos fenólicos do girassol obtido com solução de bissulfito de sódio 0,1% e controle contra 5 bactérias e 1 levedura.

Micro-organismos	Solução	Extrato	Residual de BS
	Controle <sup>A</sup> (mg BS/mL)	fenólico <sup>B</sup> (mg AG/mL)	no Extrato fenólico <sup>C</sup> (mg BS/mL)
	CIM (mg/mL)		
<b>Bactérias Gram-positivas</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50	3,00	0,04
<i>Bacillus subtilis</i>	0,25	4,00	0,05
<b>Bactérias Gram-negativas</b>			
<i>Escherichia coli</i>	0,50	4,00	0,05
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0,50	2,50	0,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,25	4,00	0,05
<b>Levedura</b>			
<i>Candida albicans</i>	NIC	NIC	NIC

AG = ácido gálico. BS = bissulfito de sódio. NIC = não inibiu crescimento. ( $n = 3$ ).

<sup>A</sup> = Solução de bissulfito de sódio 0,1%.

<sup>B</sup> = Extrato fenólico extraído com bissulfito de sódio 0,1%.

<sup>C</sup> = Teor residual de bissulfito de sódio (BS) correspondente aos valores de CIM do extrato fenólico de bissulfito de sódio 0,1%.

### 3.4. Avaliação da atividade antiproliferativa

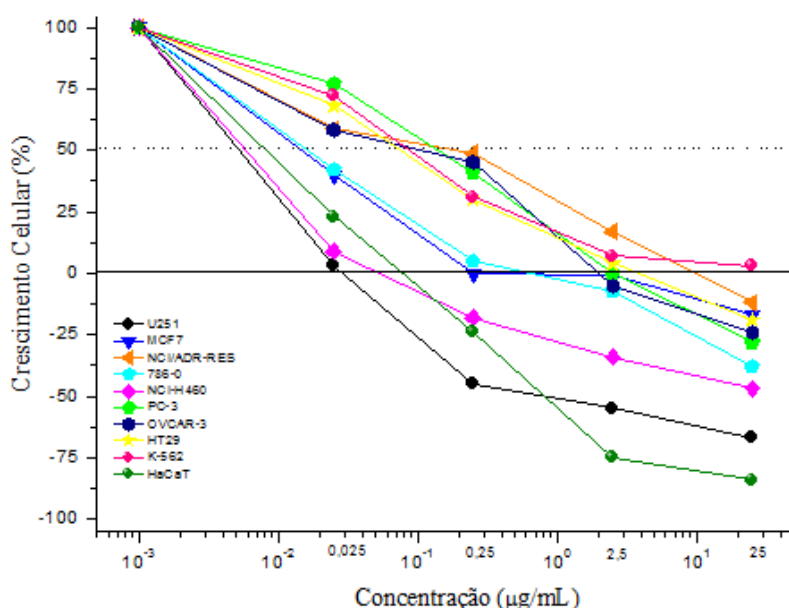
O perfil antiproliferativo do extrato de compostos fenólicos do girassol extraído com bissulfito de sódio 0,1% foi avaliado frente a linhagens tumorais humanas e uma linhagem não tumoral humana, nas concentrações de 0,25; 2,50; 25,00; e 250,00  $\mu\text{g/mL}$ . Nessas condições experimentais, o extrato não apresentou atividade

antiproliferativa (Figura 1B), pois mostra que a contagem permaneceu acima do ponto de morte celular delimitado pela linha (zero). A Figura 1A mostra a ação antiproliferativa do quimioterápico doxorrubicina empregado como controle positivo do experimento.

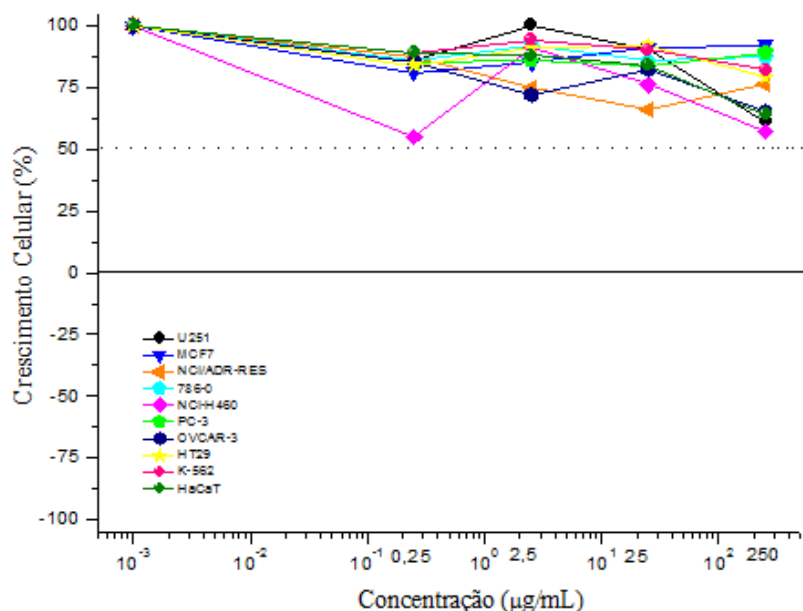
O câncer é uma patologia bastante complexa e seu desenvolvimento envolve várias etapas que são didaticamente divididas em etapas de iniciação, promoção e progressão. Por seus efeitos antioxidantes, os compostos fenólicos, de maneira geral, têm sido reportados como promissores agentes quimiopreventivos atuando principalmente na prevenção dos danos causados no DNA por agentes carcinogênicos como também no controle de processos inflamatórios crônicos que favorecem o desenvolvimento tumoral (Kotecha, Takami & Espinoza, 2016; Lewandowska, Kalinowska, Lewandowski, Stepkowski, & Brzóska, 2016; Ruiz & Hernández, 2016).

Desta forma, os resultados das atividades antioxidantes (Tabela 3) e antiproliferativo (Figura 1B) obtidos para o extrato fenólico de girassol sugerem que os compostos fenólicos presentes nesse extrato não inibiriam diretamente a proliferação celular, mas poderiam atuar na quimioprevenção tumoral. Estudos *in vivo* de carcinogênese poderão verificar essa hipótese.

(A)



(B)



**Fig. 1.** Atividade antiproliferativa *in vitro* de extrato de compostos fenólicos de girassol extraídos solução de bissulfito de sódio 0,1% em painel de células de linhagens humanas, tumorais e não tumoral, após 48 horas de tratamento. Linhagens: U251(glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de multirresistência), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT29 (côlon), K562 (leucemia) e HaCat (queratinócitos humanos não tumorais). **(A)** Quimioterápico Doxorubicina (controle positivo), **(B)** Extrato de compostos fenólicos de girassol.

#### 4. Conclusão

A caracterização dos extratos de compostos fenólicos mostrou que sua aplicação como aditivo alimentar pode ser realizada explorando sua capacidade antioxidante. A falta de atividade antiproliferativa demonstrou que os compostos não são citotóxicos e o extrato pode ser seguro para consumo, porém estudos complementares *in vivo* precisam ser realizados para evidenciar a não ocorrência de efeitos tóxicos. O extrato bruto de compostos fenólicos apresentou um efeito antimicrobiano quando na presença do bissulfito de sódio, conferindo a este efetividade em relação à inibição do crescimento de bactérias, principalmente *S. aureus* e *S. choleraesuis*. O presente trabalho contribuiu para futura aplicação de um

subproduto do girassol pouco explorado e dessa forma valorizar toda sua cadeia produtiva.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a empresa Giroil Agroindústria Ltda e suporte financeiro do CNPq (processo 402022/2014-9) e T. D. Alexandrino agradece ao CNPq pela bolsa concedida (processo 133901/2015-7).

## **Referências**

- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., & Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 119(1), 114–122.
- AOAC. (2012). *Official methods of analysis of AOAC International* (19th ed.). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Budryn, G., & Rachwal-Rosiak, D. (2013). Interactions of hydroxycinnamic acids with proteins and their technological and nutritional implications. *Food Reviews International*, 29(3), 217–230.
- CLSI. (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 9<sup>th</sup> ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 9<sup>th</sup> informational supplement, Document M07-A9. Wayne, PA, USA.

- Cheng, J. C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, *104*(1), 132–139.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, *43*(4), 348.
- Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, *57*(1), 51–55.
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., & Aeschbach, R. (1997). Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*(10), 1309–1315.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, *15*(6), 4324–4333.
- González-Pérez, S., Merck, K. B., Vereijken, J. M., Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., & Voragen, A. G. J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(6), 1713–1719.
- Gunduc, N., & El, S. N. (2003). Assessing Antioxidant Activities of Phenolic Compounds of Common Turkish Food and Drinks on In Vitro Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of food science*, *68*(8), 2591-2595.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(6), 453–464.
- Karamać, M., Kosińska, A., Estrella, I., Hernández, T., & Dueñas, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower



- seeds. *European Food Research and Technology*, 235(2), 221–230.
- Kim, D., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321–326.
- Kotecha, R., Takami, A., Espinoza J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, 7(32), 52517-52529.
- Lewandowska, H., Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stepkowski, T. M., & Brzóska, K. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 32, 1–19.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science*, 76(6), M398–M403.
- Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3444–3452.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., et al. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757–766.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., et al. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171.
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J. N., et al. (2006). Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3773-3778.

- Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., García-Vallejo, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Ayet, G., et al. (2000). Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(4), 459–464.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Bioactive berry compounds - Novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 8–18.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., et al. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494–507.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956.
- Ruiz, R. B., & Hernández, P. S. (2016). Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas*, 94, 13-19.
- Saeed, M., & Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. *Journal of Food Science*, 53(3), 1127–1131.
- Salgado, P. R., Drago, S. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., Andrich, O., González, R. J., & Mauri, A. N. (2012a). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 65–72.

- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., Montero, M. P. (2012b). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 374–381.
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24(5), 525–533.
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2011). Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 351–360.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- Senevirathne, M., Kim, S.-H., Siriwardhana, N., Ha, J.-H., Lee, K.-W., & Jeon, Y.-J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Science and Technology International*, 12(1), 27–38.
- Shahidi, F., Alasalvar, C., & Liyana-Pathirana, C. M. (2007). Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1212–1220.
- Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 813–823.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., & Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15(2), 137–149.

- Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., & Dias, A. C. P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, *90*(1–2), 157–167.
- Sodini, G., & Canella, M. (1977). Acidic butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *25*(4), 822–825.
- USDA. United States Department of Agriculture (2016). Oilseeds: world market and trade. Available at: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>  
Accessed 02.10.16
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 4113–4117.
- Wanasundara, U., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (1994). Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 1285–1290.
- Weisz, G. M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS<sup>n</sup>. *Food Chemistry*, *115*(2), 758–765.
- Wildermuth, S. R., Young, E. E., & Were, L. M. (2016). Chlorogenic acid oxidation and its reaction with sunflower proteins to form green-colored complexes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *0*, 1–15.

## CONCLUSÕES

O presente estudo reportou a viabilidade tecnológica da obtenção concomitante de diferentes frações provenientes da farinha desengordurada de girassol e sua potencialidade para aplicação na indústria de alimentos. A extração dos compostos fenólicos precedeu a obtenção das demais frações e dentre as soluções extratoras aplicadas, não houve diferença significativa nos teores residuais dos compostos. Nenhuma delas foi capaz de extrair completamente os compostos fenólicos. As soluções de bissulfito de sódio 0,1% e de mistura de etanol 70% com bissulfito de sódio 0,1% (70:30) foram consideradas as mais eficientes no que se refere ao rendimento de extração proteica, e no elevado conteúdo proteico em base seca de 94,81 g/100 g e 95,69 g/100 g dos isolados, respectivamente.

O concentrado fibroso mostrou um conteúdo majoritário de fibras alimentares (60,81 g/100 g em base seca) e considerável teor proteico (35,67 em base seca), para o resíduo do tratamento do bissulfito de sódio 0,1%. Por suas características de composição parece ser um produto atrativo como ingrediente em formulações alimentícias de produtos saudáveis e dietéticos, como por exemplo, em barras de nutrição.

Os extratos brutos rico em compostos fenólicos liofilizados dentre as atividades avaliadas mostrou relevante ação antioxidante, tanto os extraídos com solução bissulfito de sódio 0,1% como de etanol 70%. Caso purificado, este extrato ainda poderia ter essa ação aumentada. Aplicações tecnológicas podem ser realizadas com seu uso como antioxidante em alimentos ou em embalagens ativas.

A metodologia utilizada tanto na produção da farinha como obtenção dos de isolados proteicos permitiu a manutenção de seu valor nutricional e solubilidade. Perante aplicações que vem sendo testadas sugere-se que os isolados proteicos possam ser aplicados principalmente em panificação, e não só para aumentar valor nutricional aos produtos, mas utilizando-se das propriedades das proteínas como a capacidade emulsificante, em substituição de ingredientes de origem animal. Substituição essa muito requerida em produtos veganos.

Concluindo a metodologia proposta permitiu a obtenção de frações diferenciadas em composição e o aproveitamento integral dos grãos sem casca. Através dos resultados apresentados os produtos obtidos mostraram potencial para

uso em formulações na área de alimentos, sugerindo assim a possibilidade de suas aplicações serem exploradas através de outros estudos.

## **ANEXOS**



Figura 1 - Farinha desengordurada de girassol.

Fonte: Autora



Figura 2 - Extrato de compostos fenólicos liofilizados de girassol obtido com a solução extratora de etanol 70%.

Fonte: Autora



Figura 3 - Concentrados fibrosos de girassol liofilizados (pH 7) obtidos sem extração de compostos fenólicos (SFC) e com extração prévia de compostos fenólicos utilizando etanol 70% (FCE), bissulfito de sódio 0,1% (FCB) e uma mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% na proporção 70:30 (FCM).

Fonte: Autora





Figura 4 - Isolados proteicos de girassol liofilizados (pH 7) obtidos sem extração de compostos fenólicos (SI) e com extração prévia de compostos fenólicos utilizando etanol 70% (SIE), bissulfito de sódio 0,1% (SIB) e uma mistura de etanol 70% e bissulfito de sódio 0,1% na proporção 70:30 (SIM).

Fonte: Autora