



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LARISSA MACELLE DE PAULO BARBOSA

EXTRAÇÃO OTIMIZADA DO ÓLEO DE NIM E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ALELOPÁTICO EM SEMENTES DE MATA-PASTO

CHAPADINHA-MARANHÃO

Dezembro de 2019

LARISSA MACELLE DE PAULO BARBOSA

EXTRAÇÃO OTIMIZADA DO ÓLEO DE NIM E AVALIAÇÃO DO EFEITO
ALELOPÁTICO EM SEMENTES DE MATA-PASTO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à banca examinadora do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Msc. Daiane Fossatti Dall'Oglio

CHAPADINHA-MARANHÃO

Dezembro de 2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Barbosa, Larissa Macelle de Paulo.

Extração otimizada do óleo de nim e avaliação do efeito alelopático em sementes de mata-pasto / Larissa Macelle de Paulo Barbosa. - 2019.

40 p.

Orientador(a): Daiane Fossatti Dall'Oglio.

Curso de Agronomia, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha-MA, 2019.

1. Azadirachta indica. 2. Bioherbicida. 3. Óleo vegetal. 4. Planta daninha. 5. Senna occidentalis. I. Dall'Oglio, Daiane Fossatti. II. Título.

LARISSA MACELLE DE PAULO BARBOSA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à banca examinadora do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Agronomia.

Aprovada em: _____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Msc. Daiane Fossatti Dall'Oglio
Professora / CCAA – Engenharia Agrícola – UFMA

Prof. Dr. Jomar Livramento Barros Furtado
Professor / CCAA – Zootecnia – UFMA

Profa. Dra. Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos
Professora / CCAA – Agronomia – UFMA

AGRADECIMENTOS

À Deus, toda a minha gratidão, pelo zelo, amor e sustentação, nos dias calmos e escuros, os quais não sabia que me ajudariam no alicerce da caminhada;

À minha mãe Ana, minha irmã Aninha, avó Raimunda, avô Vicente (*in memoriam*) e prima Thamara Stefannie, pela inspiração, motivação e exemplo de perseverança;

À minha estrela Ana Dalva (*in memoriam*), Ana Rita e Maria da Conceição, por me considerarem filha e sempre estarem de braços abertos quando precisei;

Às minhas melhores amigas Rayssa Mouzinho e Sâmia Matos, pelo suporte em todas as áreas da minha vida, sem contar dos conselhos, chamadas de atenção e risadas que me fazem querer tê-las sempre por perto;

Às minhas preciosidades Joyce Silva, Flávia Pantoja, Dayna Senna, Jaynara Senna e Millena Sousa, flores as quais para sempre quero regar;

Aos meus amigos Jorge Oliveira, Romário Martins, Ivo Aguiar e João Pedro, por todo apoio durante o experimento, emocional, e pela tolerância, principalmente por não terem desistido de mim em meio as dificuldades deste trabalho;

Ao Isaías Viana pelo companheirismo, paciência, compreensão e palavras de carinho e incentivo;

Aos meus excelentes e queridos professores Daiane Fossatti e Jomar Furtado, não só pela fundamental orientação para concretização deste trabalho, como por todos os anos de convivência, conhecimento compartilhado, ideias geniais, exemplo de pulso firme e por terem acreditado no meu potencial;

À minha amiga e professora Raissa Matos, pelo ensino, exemplo de caráter e dedicação, por cada vez em que me estendeu a mão, pelo incentivo, transparência, cuidado e por tamanha gentileza e sinceridade, o que me fez não só querer retribuir com gratidão (o que é pouco), mas tê-la como inspiração;

À Maya Sousa, Larissa Carvalho e Lohana Torquato, por todo empenho e ajuda nas inacabáveis análises e momentos de descontrações;

Aos demais profissionais docentes, servidores e administrativos da UFMA que direta ou indiretamente colaboraram durante todo o período acadêmico. Muito obrigada!

Mas aqueles que esperam no SENHOR renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.

Isaías 40:31

RESUMO

Os produtos naturais têm surgido como alternativa para minimizar os impactos ambientais causados pelo uso inadequado dos agroquímicos e o óleo de nim (*Azadirachta indica*) tem demonstrado potencial efeito bioherbicida por meio da alelopatia. Na obtenção de óleos vegetais, a extração por solventes orgânicos é a mais utilizada, devido ao bom desempenho na retirada do material lipídico. Diante disso, objetivou-se otimizar o processo de extração, caracterizar o óleo da semente de nim, e avaliar o seu efeito alelopático em sementes de mata-pasto. Foi avaliados parâmetros úteis que determinam o estado do óleo, análise do seu perfil graxo e da aplicação em sementes de mata-pasto (*Senna occidentalis*) a fim de analisar o efeito alelopático na porcentagem de germinação (%G), no índice de velocidade de germinação (IVG), porcentagem de inibição na germinação (%IG), comprimento radicular (CR) e hipocótilo (CH). O experimento foi conduzido no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais - CCAA, da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, em Chapadinha- MA, com delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial para as duas etapas experimentais. O experimento I consistiu em 6x4, sendo seis tempos de extração (2, 4, 6, 8, 10 e 12h) e quatro solventes (H=hexano, HM=hexano+metanol, Et=etanol e HEt=hexano+etanol), totalizando 24 tratamentos e 3 repetições. O experimento II consistiu em 4x4, referente ao óleo de nim extraído pelos quatro solventes citados acima e quatro concentrações de extratos de óleo (0, 2, 3 e 4%), totalizando 16 tratamentos e 4 repetições. Através dos resultados observou-se que o solvente H apresentou maior rendimento, com destaque para 43,4% de óleo em apenas 4 horas de extração, em comparação com as médias dos demais solventes. Os solventes não alteraram as propriedades físico-químicas do óleo, que é rico em ácido palmítico e oléico. Houve efeito significativo somente para o CR e CH das plântulas. Conclui-se que o hexano é um solvente eficiente para extração do óleo de nim, o qual apresenta potencial efeito alelopático, sendo uma alternativa de herbicida natural no controle de mata-pasto.

PALAVRAS-CHAVE: *Azadirachta indica*, óleo vegetal, bioherbicida, planta daninha, *Senna occidentalis*.

ABSTRACT

Natural products have emerged as an alternative to minimize environmental impacts caused by improper use of agrochemicals and neem oil (*Azadirachta indica*) has shown potential bioherbicidal effect through allelopathy. In obtaining vegetable oils, extraction by organic solvents is the most used, due to the good performance in the removal of lipid material. Thus, the objective was to optimize the extraction process, to characterize neem seed oil, and to evaluate its allelopathic effect on pasture seeds. Useful parameters that determine the state of the oil, the analysis of its fatty profile and application to seeds of pasture (*Senna occidentalis*) were evaluated in order to analyze the allelopathic effect on germination percentage (% G), on the speed index of germination (IVG), percentage of germination inhibition (% GI), root length (CR) and hypocotyl (CH). The experiment was conducted at the Center for Agricultural and Environmental Sciences - CCAA, Federal University of Maranhão-UFMA, Chapadinhama, with a completely randomized experimental design in factorial scheme for the two experimental steps. Experiment I consisted of 6x4, six extraction times (2, 4, 6, 8, 10 and 12h) and four solvents (H = hexane, HM = hexane + methanol, Et = ethanol and HEt = hexane + ethanol), totaling 24 treatments and 3 repetitions. Experiment II consisted of 4x4, referring to neem oil extracted by the four solvents mentioned above and four concentrations of oil extracts (0, 2, 3 and 4%), totaling 16 treatments and 4 repetitions. Through the results it was observed that the solvent H presented higher yield, highlighting 43.4% of oil in only 4 hours of extraction, compared to the average of the other solvents. The solvents did not alter the physicochemical properties of the oil, which is rich in palmitic and oleic acid. There was significant effect only for seedling CR and CH. It is concluded that hexane is an efficient solvent for neem oil extraction, which has potential allelopathic effect, being a natural herbicide alternative in the control of pasture.

KEYWORDS: *Azadirachta indica*, vegetable oil, bioherbicide, weed, *Senna occidentalis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios do rendimento do óleo de Nim indiano extraído via Soxhlet em diferentes tempos e solventes.	26
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos do óleo de Nim indiano extraído por diferentes solventes.	28
Tabela 3. Composição dos ácidos graxos do óleo de Nim indiano extraído por diferentes solventes.	30
Tabela 4. Valores médios do comprimento da radícula das plântulas de mata-pasto sob aplicação dos diferentes extratos de óleo de Nim indiano.....	33
Tabela 5. Valores médios do comprimento do hipocótilo das plântulas de mata-pasto sob aplicação dos diferentes extratos de óleo de Nim indiano.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de mata-pasto. A: solventes utilizados na extração do óleo de Nim indiano; B: Concentrações dos extratos do óleo aplicado nos bioensaios..... 31
- Figura 2.** Porcentagem de germinação (G%) das sementes de mata-pasto. A: solventes utilizados na extração do óleo de Nim indiano; B: Concentrações dos extratos do óleo aplicado nos bioensaios..... 32
- Figura 3.** Porcentagem de inibição na germinação (IG%) das sementes de mata-pasto. A: solventes utilizados na extração do óleo de Nim indiano; B: Concentrações dos extratos do óleo aplicado nos bioensaios. 33

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do rendimento do óleo de nim.....	19
Equação 2. Cálculo da densidade	20
Equação 3. Cálculo do índice de acidez	21
Equação 4. Cálculo do índice de iodo	21
Equação 5. Cálculo do índice de saponificação	22
Equação 6. Cálculo do índice de éster.....	23
Equação 7. Cálculo do peso médio molecular.....	23
Equação 8. Cálculo da porcentagem de germinação	25
Equação 9. Cálculo de índice de velocidade de germinação.....	25
Equação 10. Cálculo do percentual de inibição de germinação	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Aspectos gerais do Nim indiano	15
3.2. Otimização de parâmetros na extração	15
3.3. Efeito alelopático do óleo de Nim indiano.....	16
3.4. Planta daninha	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Localização do experimento	18
4.2. Delineamento experimental	18
4.3. Coleta e beneficiamento do material vegetativo para extração do óleo e bioensaios	18
4.4. Extração do óleo de nim	19
4.5. Caracterização físico-química do óleo de nim.....	20
4.5.1. Densidade (D)	20
4.5.2. Índice de Acidez (IA).....	20
4.5.3. Índice de iodo pelo método de Wijs (II)	21
4.5.4. Índice de saponificação (IS).....	22
4.5.5. Porcentagem de ácido graxos livres (%AGL).....	22
4.5.6. Índice de éster (IE)	22
4.5.7. Peso molecular (PM).....	23
4.6. Caracterização do perfil de ácidos graxos	23
4.7. Bioensaio de germinação e desenvolvimento de plântulas.....	24
4.8. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Rendimento do óleo	26
5.2. Análises físico-química do óleo de nim.....	27
5.3. Caracterização do perfil dos ácidos graxos.....	29
5.4. Bioensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas	31
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

O principal meio para a proteção das lavouras no controle de pragas, doenças e plantas invasoras são os agroquímicos, sendo o Brasil uma das maiores potências agrícolas do mundo que mais faz uso desses produtos, destacando mais de 50% do consumo ao emprego de herbicidas. No entanto, a eficiência desses defensores é limitada quando é retratado a degradação ambiental. Devido a capacidade de dispersão no ambiente, a ação desses produtos afeta não somente os solos, a água, os animais como compromete também a saúde do homem (MOSSINI et al., 2005; TREVISAN et al., 2011; MASCARENHA et al., 2013).

Diante desses impactos ocorre a busca de rotas alternativas que sejam seguras à saúde humana e ao meio ambiente. Uma das mais eficientes estratégias consiste no uso de compostos bioativos encontrados nas plantas. Esses metabólitos secundários, denominados aleloquímicos, quando liberados pelos vegetais para o meio ambiente, possuem a capacidade de causar efeito fitotóxico, causando estímulo ou inibição no desenvolvimento de outras plantas, mecanismo este conhecido como alelopatia (DAYAN et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2015).

Os produtos extraídos de plantas têm ganhado lugar no mercado por serem considerados ecologicamente corretos, uma vez que seu uso apresenta como vantagem a minimização dos impactos ambientais quando comparados aos agroquímicos sintéticos.

Rica em vários compostos químicos com atividade biológica e fonte promissora de produtos orgânicos, a espécie Nim indiano (*Azadirachta indica*), é conhecida popularmente como “árvore da vida” devido aos seus múltiplos usos. Na agricultura, por exemplo, os seus extratos são utilizados em maior ênfase como bioinseticida, devido a presença de azadiractina, composto que causa repelência nos insetos (SOARES et al., 1996). Além disso, o óleo dessa planta tem demonstrado seu potencial efeito como herbicida natural. Souza Filho et al. (2009) e Garcia Neto (2013) comprovaram, que o nim impediu o desenvolvimento das espécies malícia (*Mimosa pudica*) e mata-pasto (*Senna obtusifolia*) nas mais baixas concentrações de aplicação.

Apesar do efeito positivo de inibição proveniente do nim, poucos são os trabalhos visto na literatura que visam a aplicação, mais precisamente do óleo como bioherbicida.

Para a obtenção de óleos vegetais são utilizados inúmeros métodos de extração que geralmente consistem em procedimentos extensos, porém com baixo rendimento e degradação dos compostos do óleo. Desta forma, é necessário a realização de estudos que possam otimizar os parâmetros do processo, visando uma extração viável e eficiente, obtendo qualidade e quantidade máxima de óleo.

O método de extração por solventes orgânicos tem tido um destaque por ser o mais utilizado, pois apresenta como vantagem o bom rendimento do material lipídico. Além disso, esse procedimento é recomendado devido a sua metodologia simples, podendo ser utilizado tanto em amostras de origem vegetal como de origem animal, fornecendo os vários compostos bioativos no produto extraído (FILIPPIS, 2001; BRUM et al., 2009; PEREIRA et al., 2015; MONTEIRO et al., 2017).

Tendo em vista a eficiência do seu uso, os bioherbicidas tem grande potencial para ser utilizado no Brasil, pois são uma alternativa para que ocorra a minimização dos prejuízos causados ao ambiente ao uso de agroquímicos. Além disso, o controle de plantas daninhas por meio da alelopatia são altamente biodegradáveis, evitando qualquer resíduo tóxico, nos sistemas de cultivos agrícolas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar o processo de extração, caracterizar o óleo da semente de nim e avaliar o seu efeito alelopático sob diferentes concentrações em sementes de mata-pasto.

2.2. Objetivos específicos

Determinar o melhor solvente e o menor tempo de extração visando a eficiência no rendimento do óleo de nim;

Verificar os parâmetros físico-químicos do óleo e sua composição de ácidos graxos;

Avaliar o efeito alelopático de diferentes concentrações do óleo de nim sobre a germinação e crescimento inicial do mata-pasto em condições de laboratório.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais do Nim indiano

Introduzida no Brasil em 1986 pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), o nim (*Azadirachta indica* A. Juss) ou amargosa, pode ser encontrado em todo o país. Pertence à família *Meliaceae* e originária do sul da Índia, onde é bastante cultivada. É atrativa e de crescimento rápido, podendo atingir 20 metros de altura. Possui raiz pivotante, tronco marrom-avermelhado, resistente e de alta qualidade. Apresenta bastante ramificações, com folhas compostas de cor verde escuro e flores brancas, reunidas em inflorescências. O fruto é tipo baga ovalada de cor amarelada quando apresenta maturação e apresenta potencial oleaginoso rico em vários compostos bioativos (NEVES et al., 2003; VILELA, 2008).

De clima tropical, essa espécie é de grande ocorrência no nordeste brasileiro. A produção de fruto pode chegar a 10 kg de sementes/planta. Cada kg equivale aproximadamente 3000 sementes, produção estimada para 2 anos após o plantio. Após 10 anos torna-se altamente produtiva, podendo produzir 50 kg de frutos/ano (MARTINEZ, 2002; NEVES et al., 2003).

Os subprodutos do nim, como folhas e frutos, podem ser utilizados para diversos fins, a saber, para a medicina humana, veterinária e na indústria de cosméticos. Na agricultura podem ser utilizados como fertilizante, inseticida, na produção de biomassa, em reflorestamento e sistemas agroflorestais. Na região Nordeste, a árvore do nim faz parte do bioma caatinga, onde fornece madeira e frutos em escala industrial. O óleo das sementes é o principal produto comercializado, o que pode estar atribuído à variedade dos compostos químicos existentes no material. Alguns autores comprovam a presença de mais de 10 tetranotriterpenóides, compostos de princípios ativos presentes no óleo (SOARES et al., 1996; MOZINI, 2008).

3.2. Otimização de parâmetros na extração

Há uma crescente busca por métodos viáveis para a obtenção de óleo vegetal, visando bom rendimento de óleo. O método de extração por meio de solventes orgânicos é recomendado para uso em amostras de origem vegetal e animal, devido ao bom rendimento, metodologia simples e extração de vários compostos bioativos. Estudos avaliando alguns parâmetros, demonstram respostas significativas no desempenho do processo extrativo (ROMERO et al., 2005; BRUM et al., 2009; PEREIRA et al., 2015; AWOLU et al., 2013).

Durante a extração ocorre um gradiente de concentração entre o solvente e o soluto. O período em que o material é exposto ao solvente ocorre a transferência do óleo até que haja um equilíbrio no gradiente e todo o material lipídico capaz de ser arrastado pelo solvente já se encontra nele (FIGUEIREDO et al., 2015; RODRIGUES, 2017). Isso mostra que o tempo e o solvente são fatores preponderantes que estão ligados à eficiência da extração.

Os solventes orgânicos hexano e etanol utilizados por Tesfaye et al. (2017), na extração do óleo de nim, proporcionaram 60% de óleo extraído, uma boa quantidade quando comparado a outros métodos, como por exemplo a extração por prensagem mecânica. Os mesmos autores relatam que a mistura de solventes e sua consorciação com o período de extração ocasionou valores iguais ao uso de apenas um solvente, o que torna uma alternativa eficaz quanto a custos na extração de óleo. Além disso, através dos resultados de Ayoola et al (2014), é comprovado que a eficiência de alguns solventes muitas vezes encontra-se limitado pelo período que o mesmo é submetido.

3.3. Efeito alelopático do óleo de Nim indiano

Por meio da produção dos aleloquímicos liberados de algumas partes de plantas é possível realizar o controle de plantas daninhas. Este fenômeno é conhecido como alelopatia. Este termo vem de origem grega das palavras “allélon” que significa mútuos e “pathos” que significa prejuízo. Molisch pesquisador alemão que criou essa expressão definiu como o mecanismo de substâncias químicas dos vegetais liberadas para o meio ambiente, que inibe ou estabelece o desenvolvimento de outras plantas ou até mesmo seu próprio desenvolvimento (SANTOS, 2012; CHON et al., 2006).

Este mecanismo por meio do uso dos produtos orgânicos visa menor toxicidade e rápida degradação, tornando eficiente para a agricultura, não desenvolvendo riscos à saúde humana e animal e que tragam resultados promissores no controle de plantas daninhas.

De acordo com o trabalho realizado por Souza Filho et al. (2009), foi comprovado que as substâncias aleloquímicas presentes no óleo de nim impediram o desenvolvimento das sementes da espécie malícia (*Mimosa pudica*) e de mata-pasto (*Senna obtusifolia*), sob aplicação de diferentes concentrações do óleo. Os mesmos autores relatam o efeito inibitório foi maior principalmente nas raízes e parte aérea das plântulas. Este efeito também foi observado nos resultados de Garcia Neto (2013) que apresentou a eficiência do nim no controle de cinco espécies de plantas daninhas: capim-carrapicho (*Cenchrus echinatus* L.), picão-preto

(*Bidens pilosa*), fedegoso (*Senna occidentalis* L.), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e Muçambê (*Cleome spinosa*), inibindo potencialmente o crescimento delas nas mais baixas concentrações de aplicação.

3.4. Planta daninha

Segundo Silva et al. (2007), é considerado planta daninha, toda espécie que direta ou indiretamente interfira no desempenho de culturas de interesse econômico, dificultando no seu manejo, podem ser alojamento de patógenos, além da competitividade por água, luz e nutrientes do solo. Esses problemas afetam a qualidade do produto e conseqüentemente na produção. O mesmo autor relata que de todo gasto que um produtor possa ter em sua propriedade 30% é somente na compra de agroquímicos para o controle de plantas daninhas.

Estas plantas são resistentes a pragas e doenças, atingem rapidamente a maturação, possuem grande dispersão e alta capacidade de adaptação em diversos lugares. Garantem sua perpetuação por meio da dormência e germinação escalonada de grande número de sementes, o que dificulta no controle. Outras, no entanto, possuem sua multiplicação por enraizamento ou por outras partes vegetativas, como tubérculos, rizomas e bulbos (EMBRAPA, 2017).

A espécie *Senna occidentalis* conhecida como mata-pasto e fedegoso, é uma planta daninha de ciclo anual, arbustiva, ramificada que pode chegar aproximadamente 2 metros de altura. Seu meio de propagação é exclusivamente por sementes. Está entre as 10 espécies de maior preocupação agrônômica, devido a sua fácil dispersão, resistência e alta toxidez das sementes aos animais. É encontrada com frequência no Brasil, em grande ocorrência nas áreas de culturas anuais e perenes e principalmente em pastagens, com difícil controle de forma tradicional (LORENZI, 2008; LOMBARDO et al., 2009; TAKEUTI et al., 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização do experimento

O trabalho foi realizado em duas etapas experimentais. O experimento I (Exp. I) constituiu-se do processo de extração do óleo e o experimento II (Exp. II) na aplicação dos extratos do óleo em sementes de mata-pasto. Foram conduzidos respectivamente no Laboratório de Análises Químicas (LAQ) e no Laboratório de Ecologia, ambos situados no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário de Chapadinha – MA, que está localizado na Br 222 – KM 06, S/N – Boa Vista – CEP 65500 00, com coordenadas 03°44'28,7"S e 43°18'46"W e altitude de 107 m. Foram realizados entre outubro de 2018 e julho de 2019.

4.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial para as duas etapas experimentais. O Exp. I consistiu em 6x4, sendo seis tempos (2, 4, 6, 8, 10, 12h) e quatro solventes (hexano, hexano+metanol, etanol, hexano+etanol), totalizando 24 tratamentos e 3 repetições. Já o Exp. II consistiu em 4x4, referente ao óleo de nim extraído pelos quatro solventes citados acima e quatro concentrações de extratos de óleo (0, 2, 3 e 4%), totalizando 16 tratamentos e 4 repetições.

4.3. Coleta e beneficiamento do material vegetativo para extração do óleo e bioensaios

O material vegetativo utilizado para a obtenção do óleo foram frutos maduros de matrizes de Nim indiano (*Azadirachta indica*), localizados próximo ao Campus da Universidade, com mais ou menos 5 metros de altura, que não apresentavam interferência em aplicação de fertilizantes, melhoramento genético ou qualquer outro manejo ou trato cultural que alterasse suas características originais.

Coletados manualmente, os frutos foram levados ao laboratório para a retirada de toda a impureza através da lavagem. Em seguida, os mesmos foram despulpados e suas sementes colocadas em sacos de papel para secagem por um período de 72 horas em estufa de circulação

de ar forçado na temperatura constante de 60° C. Após isso, as sementes foram trituradas e peneiradas com auxílio de um processador e peneira doméstica.

Já para o bioensaio de germinação e desenvolvimento de plântulas, foram utilizadas sementes de mata-pasto (*Senna occidentalis*). Estas também foram colhidas de forma manual quando maduras, apresentando boa qualidade. Após coletadas, as sementes foram levadas ao laboratório para a limpeza e classificação das melhores. Como método químico para superação de dormência as sementes foram imersas durante 2 minutos em ácido sulfúrico (SOUZA FILHO, 1996). Passado esse período as sementes foram lavadas em água corrente para retirar todo o excesso do ácido, foram secas e armazenadas para a montagem do bioensaio.

4.4. Extração do óleo de nim

Para extração do óleo foi utilizado o extrator tipo Soxhlet, que consiste na exposição da amostra com o solvente aquecido sob refluxo contínuo, transferindo o óleo para o solvente (WU, 2011). No processo, o solvente que inicialmente se encontra nos balões volumétricos, que estão alocados sob uma chapa aquecedora na parte inferior do aparelho, sobe na forma de vapor até os condensadores, onde se liquefaz. Em seguida é transferido, para o compartimento onde se encontra o material a ser extraído. Ao atingir o nível do tubo lateral desse reservatório, o solvente arrasta o óleo e é liberado novamente para o balão. Este processo se repete durante todo o período de funcionamento.

Para isso foram preparados cartuchos, feitos de papel filtro qualitativo contendo 5 g da amostra das sementes. Os cartuchos foram levados ao extrator e acoplado ao aparelho para dar início a extração. Nos balões volumétricos, previamente pesados que permaneceram sobre a chapa quente, foi colocado 150 ml de cada solvente.

Após a extração os balões com a mistura solvente/óleo foram levados ao evaporador rotativo de marca Fisatom e modelo 802 para a recuperação e separação do solvente e do óleo obtido, que foi quantificado por meio da pesagem, para o cálculo de rendimento (Equação 1). O óleo foi acondicionado em recipientes de vidro e armazenados sob temperatura de refrigeração até a sua utilização.

$$R(\%) = \frac{OE}{MA} \times 100$$

Equação 1. Cálculo do rendimento do óleo de nim

Onde:

R(%)= rendimento;

OE= óleo extraído (g)

MA= massa da amostra (g)

4.5. Caracterização físico-química do óleo de nim

Após a extração do óleo, foi realizada a caracterização físico-química para avaliação dos seguintes parâmetros: densidade (D), índice de acidez (IA), índice de iodo (II), índice de saponificação (IS) índice de éster (IE), peso molecular (PM) e porcentagem de ácidos graxos livres (%AGL). As análises foram realizadas baseadas nas metodologias descritas pelo Instituto Adolf Lutz (2008), Moretto e Alves (1986) e Almeida (2010).

4.5.1. Densidade (D)

A densidade do óleo foi determinada a temperatura ambiente (25° C) através da relação peso e volume. Em um balão volumétrico de 5 mL o óleo foi colocado até o menisco e em seguida pesado em balança analítica digital.

Cálculo:

$$D = \frac{p}{v}$$

Equação 2. Cálculo da densidade

Onde:

D= densidade;

P= peso da amostra no balão (g);

V= volume do balão (mL);

4.5.2. Índice de Acidez (IA)

O índice de acidez é definido como a quantidade em gramas de hidróxido de potássio necessário para a neutralização dos ácidos graxos presentes no óleo. O procedimento consiste em pesar 2 g da amostra do óleo em um erlenmeyer de 125 mL, adicionar 25 mL da solução preparada de éter-álcool (2:1) mais 2 gotas do indicador fenolftaleína a 1% e titular com a solução hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M previamente preparada e padronizada, até que ocorra

a mudança da coloração incolor para cor rósea, persistindo por 30 segundos. Com o volume gasto da titulação anotado foi determinado o cálculo do índice de acidez.

Cálculo:

$$IA = \frac{v * f * 5,61}{P}$$

Equação 3. Cálculo do índice de acidez

Onde:

IA= índice de acidez (mg KOH/g);

V= volume gasto da solução de NaOH 0,1 M na titulação (mL);

F= fator correção da solução de NaOH;

P= peso da amostra (g).

4.5.3. Índice de iodo pelo método de Wijs (II)

Essa análise consiste na determinação do grau de insaturação do óleo, considerando que o iodo reage diretamente com as duplas ligações presentes nele. Verifica-se então que quanto maior a quantidade de dupla ligação no óleo, maior será o valor do índice de iodo.

Para isso foi pesado 0,25 g de óleo em um frasco de erlenmeyer de 250 mL e adicionado 10 mL de tetracloreto de carbono (CCl₄) e 25 mL de solução de Wijs. Essa solução foi mantida em repouso e ao abrigo da luz por 30 minutos. Passado esse período foi adicionado 10 mL de iodeto de potássio (KI) e 100 mL de água destilada na amostra e em seguida foi titulada com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,1 N até a solução apresentar uma coloração amarelada. Logo após adicionou-se 2 mL da solução indicadora de amido (1%) e prosseguiu-se com a titulação até o desaparecimento da coloração azul da solução.

Cálculo:

$$II = \frac{(V' - V) * f * 1,27}{P}$$

Equação 4. Cálculo do índice de iodo

Onde:

II= Índice de iodo (I₂/100g)

V'=volume do tiosulfato de sódio (0,1 N) gasto na titulação do branco (mL);

V=volume do tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

F= fator da solução do tiosulfato de sódio (0,1 N);

P= peso da amostra (g);

4.5.4. Índice de saponificação (IS)

Através do índice de saponificação é determinada a quantidade de ácidos graxos de alto e baixo peso molecular que compõem o óleo. Cerca de 2 gramas do óleo foram colocados em um erlenmeyer de 250 mL e acrescentado 20 mL da solução de hidróxido de potássio (KOH) a 4%. A amostra foi levada ao refluxo adaptada em banho-maria, aquecida a 80° C por um período de 30 minutos. Após esperar a amostra resfriar esta foi titulada com ácido clorídrico (HCl) a 0,5N, utilizando-se como indicador a fenolftaleína a 1%.

Cálculo:

$$IS = \frac{(Eq - q) * V * C * F}{m}$$

Equação 5. Cálculo do índice de saponificação

Onde:

IS= índice de saponificação (g KOH/100 g);

Eq – q= peso molecular do KOH;

V= volume do HCl gasto na titulação do branco menos o volume gasto do HCl na titulação da amostra;

C= concentração do HCl;

F= fator de correção do HCl;

M= massa da amostra.

4.5.5. Porcentagem de ácido graxos livres (%AGL)

A determinação da porcentagem de ácidos graxos livres presente no óleo é expressa em ácido oleico e para isso foi dividido o valor do índice de acidez encontrado por 1,99.

4.5.6. Índice de éster (IE)

Obtida através dos valores do índice de acidez e índice de saponificação, o índice de éster é definido como a quantidade de KOH em miligramas requeridos na saponificação de um grama da amostra, menos o valor gasto utilizado para a neutralização dos ácidos graxos. Para o cálculo desse índice foi utilizado a seguinte equação:

Cálculo:

$$IE = IS - IA$$

Equação 6. Cálculo do índice de éster

Onde:

IE= índice de éster;

IS= índice de saponificação;

IA= índice de acidez;

4.5.7. Peso molecular (PM)

O peso médio molecular do óleo de nim foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Almeida (2010). Após a obtenção do valor do índice de saponificação no óleo, foi determinado o peso molecular pela seguinte equação:

Cálculo:

$$PM = \frac{168000}{IS}$$

Equação 7. Cálculo do peso médio molecular

Onde:

PM= peso médio molecular;

IS= Índice de saponificação;

168000= valor constante para peso molecular de óleos.

4.6. Caracterização do perfil de ácidos graxos

A análise do perfil de ácidos graxos do óleo foi realizada por cromatografia gasosa (CG). Para isso, foi realizado a esterificação das amostras antes da leitura no cromatógrafo. A esterificação foi realizada por um processo adaptado da metodologia de Hartman e Lago (1973).

Inicialmente foi pesada uma amostra de 500 mg de óleo de nim em um balão volumétrico de 50 mL, onde foram adicionados 5 mL de solução metanólica de NaOH 0,5 mol.L⁻¹. A solução foi conduzida para um sistema de refluxo, permanecendo por 5 minutos. Após este período, foi adicionado 15 mL do reagente esterificante previamente preparado (2g de cloreto de amônio + 60 mL de metanol + 3 mL de ácido sulfúrico refluxados por 15 minutos), mantendo a amostra sob refluxo por mais 10 minutos. Em seguida, a amostra foi transferida para um funil de separação e lavada com uma solução contendo 50 mL de água destilada e 25

mL de hexano. Do funil foi descartada a fase aquosa e da fase orgânica foi retirada uma alíquota de 1 μ L para ser injetado no CG.

O material foi analisado em um Cromatógrafo a Gás (CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-ms QP2010 Ultra), ambos da marca Shimadzu. A separação cromatográfica foi alcançada utilizando uma coluna capilar ZB-5HT (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). O gás portador foi o hélio, com o fluxo de arraste numa velocidade linear de 30 cm/seg e fluxo da coluna 1,0 mL/min. A programação do forno foi de 90 °C por 3 min com rampa de aquecimento de 5 °C/min até 180 °C e permaneceu por 8 min, sendo aquecido novamente com uma taxa de 10 °C/min até 230 °C, permanecendo até 14 min. A temperatura do injetor e da fonte de íons de 250 °C e 200 °C, respectivamente. O modo de injeção Split com razão de 1/10. Tempo de Corrida 48 min.

4.7. Bioensaio de germinação e desenvolvimento de plântulas

O bioensaio de germinação e desenvolvimento de plantas foi realizado em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, em câmara de germinação da marca Eletrolab modelo EL 202, com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 10 dias. As placas e o papel de filtro qualitativo utilizado para forrar as placas foram previamente esterilizados em estufa de secagem e esterilização a 150° C durante 2 horas.

Em cada placa de Petri foi adicionado 3 mL da solução teste, que foram preparadas diluindo o óleo de nim extraído no solvente éter etílico nas concentrações de 2,0; 3,0 e 4,0 % m/v, constituindo assim os tratamentos. O tratamento testemunha consistiu somente em aplicação de água destilada. Após a evaporação do solvente, foi adicionado 6 sementes em cada placa e um volume equivalente de água destilada, mantendo-se, dessa forma, a concentração original. Cada solução foi adicionada nas placas apenas uma única vez, no início da montagem do bioensaio.

A germinação das sementes foi monitorada todos os dias de experimento, sendo que a primeira contagem foi realizada 24 horas após a montagem do bioensaio, e posteriormente com contagens diárias, considerando como germinadas aquelas que apresentavam extensão radicular de aproximadamente 0,2 cm. Ao final do período experimental as plântulas foram retiradas com cuidado das placas e submetidas a medição do comprimento da radícula e do hipocótilo com auxílio de uma régua milimétrica e a determinação da massa fresca (MF) pela pesagem das

plântulas em balança analítica. Em seguida as plântulas foram colocadas para secar em estufa de ar forçado a 60 °C por 48 horas e pesadas novamente para obtenção da massa seca (MS).

Para análise do efeito inibitório do óleo na germinação foi utilizado a Equação 8 para a determinação da porcentagem de germinação G (%), a Equação 9 para o índice de velocidade de germinação (IVG) e a Equação 10 para o percentual da inibição de germinação IG (%). Equações descritas por Maguire (1962).

Cálculo:

$$G(\%) = \frac{SG \times 100}{6}$$

Equação 8. Cálculo da porcentagem de germinação

Onde:

$G(\%)$ = Porcentagem de germinação;

SG= Sementes germinadas.

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$$

Equação 9. Cálculo de índice de velocidade de germinação

Onde:

IVG= Índice de velocidade de germinação

G1, G2, Gn= Número de sementes germinadas até o enésimo dia;

N1, N2 e Nn= Número de dias para a germinação.

$$IG(\%) = \left[1 - \left(\frac{SG_{amostra}}{SG_{controle}} \right) \right] \times 100$$

Equação 10. Cálculo do percentual de inibição de germinação

Onde:

SG_{amostra}= sementes germinadas nas placas aplicadas as soluções testes;

SG_{controle}= sementes germinadas no tratamento testemunha.

4.8. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Normalidade (Shapiro-Wilk, $p < 0,05$) e Homocedasticidade (Levene, $p < 0,05$). Atendidas essas pressuposições fez-se à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ao nível de 5% de significância, considerando os efeitos dos fatores e suas interações, por meio do software Infostat[®] versão 2015.1 (DI RIENZO et al., 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento do óleo

Por meio dos resultados obtidos no experimento I, foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) para a variável rendimento em relação a interação dos fatores tempo e solvente. Nos valores que estão descritos na Tabela 1 é verificado que de uma forma geral, a combinação dos solventes H e M desempenhou maior rendimento de óleo quando comparado ao uso HEt. Isoladamente o H obteve os melhores resultados em um curto período de extração e o etanol necessita de um maior tempo para apresentar sua eficiência.

Tabela 1. Valores médios do rendimento do óleo de Nim indiano extraído via Soxhlet em diferentes tempos e solventes.

Variável	T (h)	Solvente				CV (%)	Valor de P		
		H	HM	Et	HEt		T	S	T*S
R(%)	2	31,9 Ba	22,7 Cb	22,1B Cb	25,2 Bb	2,10	<0,01	<0,01	<0,01
	4	43,4 Aa	29,5B Cb	29,9 Ab	26,6 ABb				
	6	39,0 ABa	33,0 ABab	22,5 BCc	26,6 ABbc				
	8	39,8 ABa	35,9 Aa	19,9 Cc	25,5 ABb				
	10	43,7 Aa	39,0 Aa	24,7 ABCc	31,0 Ab				
	12	44,4 Aa	39,6 Aa	27,6 ABb	26,5 ABb				

H = hexano; HM = hexano+metanol; Et = etanol; HEt = hexano+etanol; R= rendimento; CV = coeficiente de variação; T= tempo; S= solvente. Médias transformadas para Ln seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Para o solvente hexano (H), o período de 2 horas apresentou o menor rendimento do óleo, distinto dos períodos de 4, 6, 8, 10 e 12 horas de extração, os quais obtiveram as maiores médias, com destaque para o rendimento obtido nos períodos de 4, 10 e 12 horas. Esses valores (Tabela 1) encontram-se na faixa de média dos valores descritos na literatura, pois Mozini (2008) e Drummond et al. (2008), extraíram respectivamente 47,37 e 41% de óleo de nim ao utilizarem o mesmo solvente em 8 horas de extração.

Para a mistura do solvente hexano e metanol (HM), 2 e 4 horas de extração não foram tempos suficientes para a extração eficaz do óleo, pois apresentaram os menores valores. Em contrapartida os demais períodos de extração obtiveram os melhores rendimentos, não diferindo significativamente entre si, sendo 39,6% o maior valor de óleo obtido. Vale ressaltar que a quantidade de óleo era maior à medida que o tempo de extração aumentava.

Bonfim et al. (2018), ao utilizarem a mesma mistura de solventes na extração do óleo de nim encontraram um rendimento de 38%. Os mesmos autores relatam que esse rendimento foi superior quando comparada com o rendimento obtido pela mistura de hexano e etanol (35%), destacando a eficiência do solvente metanol na extração de óleo. Isso pode ter ocorrido devido ao uso da mistura de um solvente apolar (hexano) e outro polar (metanol), o que resultou no arraste de substâncias de ambas polaridades contidas no óleo.

Na extração com o uso do solvente Et o melhor rendimento foi no período de 4 horas (29,9%). Este solvente apresentou as menores médias e maior variação nos valores, o que pode ter ocorrido devido a faixa de temperatura que foi submetida aos solventes, a qual não foi o suficiente para um bom desempenho do etanol, pois o mesmo possui o ponto de ebulição maior que os demais solventes. A alta taxa de evaporação e difusividade e a baixa viscosidade do solvente que ocorre em faixa ótima de temperatura, mantém o material e o solvente em contato por mais tempo, o que aumenta a taxa de rendimento do óleo.

Na mistura do solvente HEt, o tempo de 2 horas de extração obteve o menor rendimento, diferindo dos demais tempos. No entanto, a extração com este solvente a partir de 4 horas, ocasionou os melhores valores no rendimento de óleo, apresentando 31% como a maior média. Ao ser confrontado com a literatura, esse valor encontra-se próximo ao obtido por Bonfim et al. (2018), que apresentaram em seus resultados 35% de rendimento utilizando a mesma mistura de solvente.

Durante o período de 2 e 4 horas de extração os maiores rendimentos de óleo de nim se deram com o uso do solvente H, apresentando 31,9 e 43,4% respectivamente, diferindo dos rendimentos obtidos pelos demais solventes nesses períodos de extração. Para os demais períodos, não houve diferença entre os solventes H e HM, os quais demonstraram melhor desempenho com os maiores valores médios de óleo extraído.

Esses resultados corroboram com o que foi apresentado por Ayoola et al. (2014), pois ao utilizarem o mesmo solvente como meio de extração do óleo de nim, puderam perceber que ocorre uma estabilização no teor de óleo extraído a partir de 5 horas de extração, não havendo diferença nos rendimentos obtidos a partir daquele período.

5.2. Análises físico-química do óleo de nim

O conhecimento característico das propriedades físicas e químicas de um óleo ou gordura é de extrema importância, pois são parâmetros que permitem a análise da composição

lipídica por meio de vários índices específicos do material avaliado, além de poder identificar possível alteração nos compostos do óleo que possa ter sido causado pelo meio que foi extraído (EMERENCIANO, 2013; FIGUEIREDO et al., 2015). O óleo de nim após a extração, foi submetido a caracterização físico-química e os valores de suas propriedades estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos do óleo de Nim indiano extraído por diferentes solventes.

Propriedades	Valores			
	H	HM	Et	HEt
Densidade (g/cm ³)	0,87	0,80	0,92	0,83
Índice de acidez (mg KOH/g)	6,73	7,93	6,24	8,48
Índice de iodo (g I ₂ /100g)	74,9	131,92	75	150
Índice de saponificação (g KOH/100 g)	159,68	194,60	184,78	186,35
Índice de éster	152,95	186,67	178,54	177,87
Peso molecular (g/mol)	1052,10	863,30	909,18	901,52
Porcentagem de ácidos graxos livres	3,38	3,98	3,13	4,26

H= Hexano; HM=Hexano e metanol; Et= Etanol; HEt=Hexano e etanol.

Os valores na densidade não mostraram grande variação. Contudo o óleo extraído por H e Et estão mais próximos à densidade do óleo comercial (0,92 g/cm³). Já o óleo obtido pela mistura de solventes HM e HEt se mostraram menos densos. Quando comparados à literatura, esses valores estão em conformidade, principalmente os obtidos pelos solventes H e Et, pois Paes et al. (2015) e Awolu et al. (2013), após a extração e caracterização do mesmo óleo, determinaram valores de 0,88 e 0,90 g/cm³ na densidade do óleo.

Verificou-se que o óleo demonstrou leve teor de acidez quando comparado ao óleo comercial (6,15 mg KOH/g), principalmente o que foi extraído com a mistura dos solventes. Segundo Pereira et al. (2015), a alteração nos triacilglicerídeos de um óleo geralmente é proveniente da oxidação, hidrólise ou fermentação que podem ser ocasionados por alguns fatores, como a exposição do óleo a luz ou a altas temperaturas. Na ocorrência desses processos, essa estrutura é quebrada, ocorrendo a liberação de ácidos graxos livres. Os valores da porcentagem desses compostos estão contidos na Tabela 2, expressos em ácido oleico.

O índice de iodo do óleo de nim extraído com H e Et está em conformidade com a média de valores do óleo comercial (65-80 g I₂/100g) e próximos ao encontrado por Benício et

al. (2010) que determinaram 72,8 g I₂/100g para o óleo de nim extraído. No entanto, um alto valor desse índice pode ser observado nas amostras de óleo HM e HEt, o que indica um grande número de insaturações, justificado pela presença de compostos de dupla ligação no óleo.

Nos resultados de Kumar et al. (1996), a caracterização do óleo de nim apresentou grandes variações. O índice de iodo, por exemplo, variou entre 33,8 e 192 g I₂/100g nos valores das amostras do óleo das sementes coletadas em diferentes áreas da Ásia. Os mesmos autores relatam que essa variação pode ser justificada pela ampla ocorrência de ecótipos da espécie.

Quanto mais alto o grau da insaturação presente nos ácidos graxos de um óleo menor será sua densidade e conseqüentemente o seu peso molecular (MORETTO e FETT, 1998). Esta correlação pode ser comprovada nos valores dos parâmetros apresentados neste trabalho.

O índice de saponificação quantifica os ácidos graxos de alto e baixo peso molecular que compõem os óleos e gorduras. Quanto menor o peso molecular dos ácidos graxos de um óleo maior será o seu índice de saponificação (CARVALHO, 2017).

Dos valores encontrados a amostra com menor índice de saponificação foi a do óleo extraído por H (159,68g KOH/g), diferentemente do óleo obtido pelos demais solventes que apresentaram valores dentro da média estimada para o comercial (175-205 g KOH/g), além de serem semelhantes às médias encontradas por Romero e Varga (2005) e Benício et al. (2010), os quais realizaram o mesmo processo de extração do óleo e ao determinar este índice encontraram respectivamente 195 e 168,38 g KOH/g.

Em relação ao índice de éster não foram encontrados na literatura valores definidos desse parâmetro para o óleo de nim. Porém este índice condiz com os valores determinados por Vasconcelos e Godinho (2002), para o óleo da copaíba (170,3 KOH/g), que além de possuir características físico-químicas semelhantes ao óleo de nim é também potencialmente utilizado na medicina popular do país e na indústria de cosméticos.

5.3. Caracterização do perfil dos ácidos graxos

A composição em ácidos graxos do óleo das sementes de Nim indiano está representada na Tabela 3. De uma forma geral, independente de qual solvente utilizado na extração, o óleo apresentou uma grande variedade em ácidos graxos saturados. No entanto são os ácidos insaturados, que apresentam maior porcentagem, com exceção do óleo extraído com HM.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos do óleo de Nim indiano extraído por diferentes solventes.

NOMENCLATURA	SIMBOLOGIA	ÁREA (%)			
		H	HM	Et	HEt
Saturados					
Ácido palmítico	C16:0	18,10	13,55	18,85	15,12
Ácido behênico	C22:0	0,14	5,42	0,21	-
Ácido esteárico	C18:0	14,97	11,47	14,99	14,88
Ácido araquídico	C20:0	0,78	1,87	-	1,03
Ácido lignocérico	C24:0	-	4,74	-	-
1,1,2,2-tetrametilciclopropano		-	13,74	0,72	3,74
Insaturados					
Ácido oléico	C18:1	41,33	16,86	41,08	39,48
Ácido linoléico	C18:2	18,60	5,04	20,22	12,41
Área total (%)		93,92	72,69	96,07	86,66
Outros		6,08	27,31	3,93	13,34

H= Hexano; HM=Hexano e metanol; Et= Etanol; HEt=Hexano e etanol.

Para todos os solventes estudados o ácido palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) são os principais constituintes dentre os saturados, compondo grande área do óleo extraído. Estes resultados corroboram com o obtido por Benício et al. (2010) e Awolu et al. (2013) que ao determinarem o perfil graxo do óleo de nim quantificaram teores semelhantes dos ácidos mencionados.

Quanto aos ácidos insaturados, o ácido oléico apresentou maior porcentagem de área para todos os solventes utilizados, destacando 41,33% com o uso de H e 41,08% com o uso de Et, sendo assim o principal composto dos insaturados. Estes valores estão em concordância ao encontrado por Pinto e Lanças (2010) que determinaram 41,09 % de ácido oleico. As demais porcentagens de áreas podem ser atribuídas a hidrocarbonetos que compõem apenas pequenas frações do óleo.

5.4. Bioensaios de germinação e desenvolvimento de plântulas

No experimento II, o óleo de Nim indiano demonstrou respostas promissoras, visto que por meio da aplicação houve inibição da germinação das sementes, bem como danos nos parâmetros avaliados. Os tratamentos avaliados não causaram efeito significativo ($p > 0,05$) para a porcentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de inibição na germinação (IG%). No entanto, esses fatores apresentaram efeito de significância ($p < 0,05$) para o comprimento da radícula (CR) e para o comprimento do hipocótilo (CH) das plântulas de mata-pasto.

Vale ressaltar, que somente o percentual de inibição na germinação representa o efeito alelopático, o que pode ser verificado nas maiores médias. Nas demais variáveis (G%, IVG, CR e do CH), as menores médias indicam maior resposta à inibição causada pelo óleo.

Houve redução no IVG (Figura 1) quando utilizado o óleo extraído pelos solventes Et e HEt, apresentando as menores médias para esta variável. Este efeito não teve correlação com as diferentes concentrações do óleo aplicado, pois as mesmas não diferiram estatisticamente do tratamento controle (água).

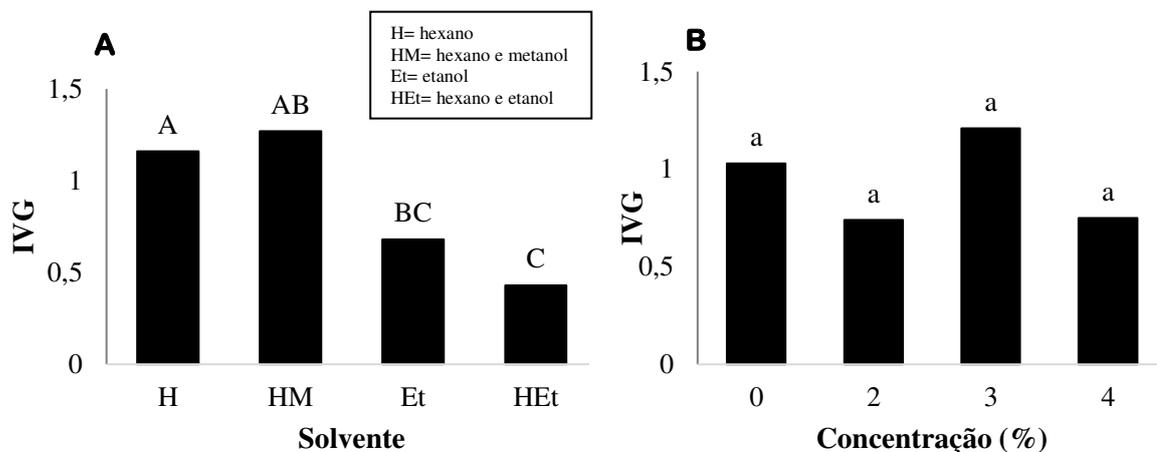


Figura 1. Índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de mata-pasto. A: solventes utilizados na extração do óleo de Nim indiano; B: Concentrações dos extratos do óleo aplicado nos bioensaios.

No trabalho realizado por Garcia Neto (2013), o IVG das sementes de mata-pasto, apresentou sensibilidade e resposta rápida quando submetido às baixas concentrações dos extratos de nim. No entanto o autor relata que o efeito de inibição é visto com maior eficiência nas variáveis que representam o desenvolvimento das plântulas (comprimento radicular e hipocótilo).

Já a G% das sementes que está apresentada na Figura 2, sofreu efeito de inibição nos tratamentos H, HM e HEt, os quais não diferiram estatisticamente entre si. O efeito desses tratamentos foi observado a partir das menores concentrações de aplicação, sendo gradativa à medida que aumentava a concentrações dos extratos, o que indica que sua ação poderá ser de grande magnitude quanto maior for a quantidade do óleo aplicado.

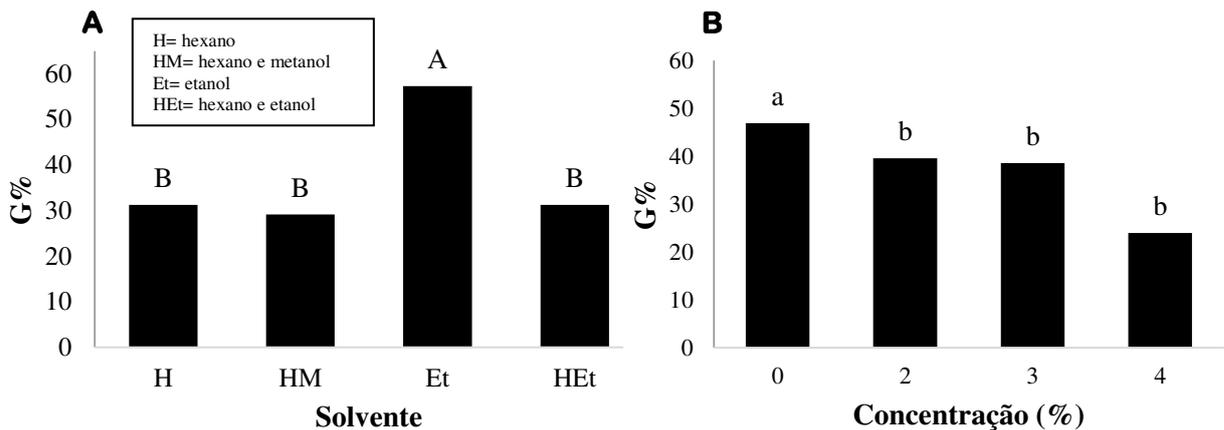


Figura 2. Porcentagem de germinação (G%) das sementes de mata-pasto. A: solventes utilizados na extração do óleo de Nim indiano; B: Concentrações dos extratos do óleo aplicado nos bioensaios.

Estes resultados diferiram apenas do tratamento que foi aplicado o extrato do óleo Et, o mesmo obteve o melhor desempenho e não respondeu ao efeito de inibição do óleo, apresentando 57,29% de sementes germinadas, sendo a melhor média para esta variável.

Resultados similares foram encontrados por Souza Filho et al. (2009). Os autores avaliaram o desempenho de malícia (*Mimosa pudica*) e de mata-pasto (*Senna occidentalis*) sobre efeito alelopático do óleo de nim e identificaram que a melhor inibição na germinação ocorreu para as concentrações de 1,5%, interferindo principalmente a espécie mata-pasto, o que equivalia ao efeito da dosagem de 3% na malícia, confirmando assim uma maior sensibilidade aos efeitos inibitórios do nim da planta receptora que foi utilizada neste estudo.

Em relação a IG% das sementes (Figura 3), o efeito do óleo de nim não apresentou diferença estatística entre os diferentes solventes.

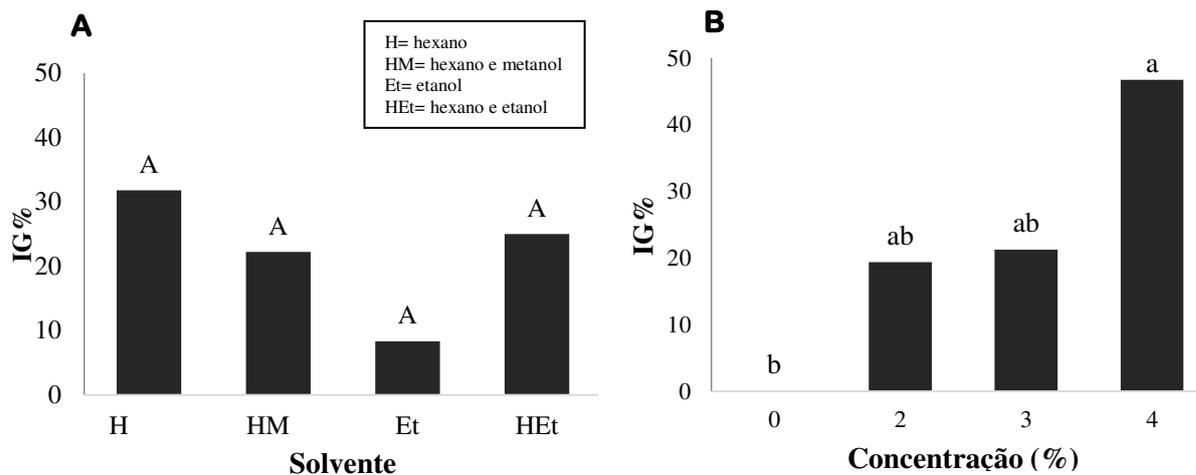


Figura 3. Porcentagem de inibição na germinação (IG%) das sementes de mata-pasto. A: solventes utilizados na extração do óleo de Nim indiano; B: Concentrações dos extratos do óleo aplicado nos bioensaios.

As concentrações também apresentaram efeito significativo semelhante, porém superiores ao tratamento testemunha. Dentre as concentrações o extrato do óleo de 4% consistiu em 46,74% de inibição.

Quanto ao CR das plântulas de mata-pasto, o óleo H não demonstrou diferença significativa entre os extratos na concentração de 2 e 3% (Tabela 4). Somente o extrato de 4% diferiu das demais concentrações, o que indica que o maior efeito de inibição ocorreu nele. Para o óleo HM, as plântulas tiveram suas raízes pouco desenvolvidas ao receberem os extratos de 2% e 4%, com destaque para este último que apresentou valor médio de apenas 0,45 de CR, quando comparado com controle (1,88). O extrato na concentração de 3% obteve valor próximo à testemunha e não inibiu significativamente no desempenho das raízes.

Tabela 4. Valores médios do comprimento da radícula das plântulas de mata-pasto sob aplicação dos diferentes extratos de óleo de Nim indiano.

Variável (cm)	Concentração (%)	Solvente				CV (%)	Valor de P		
		H	HM	Et	HEt		S	C	S*C
CR	0	1,42 Aab	1,88 Aa	1,48 Aab	0,68 Ab	54,91	0,0027	<0,0001	0,0386
	2	1,58 Aa	0,63 Bab	0,70 Aab	0,41 Ab				
	3	0,72 ABa	1,00 ABa	0,60 Aa	0,45 Aa				
	4	0,21 Ba	0,45 Ba	0,46 Aa	0,21 Aa				

H = hexano; HM = hexano+metanol; Et = etanol; HEt = hexano+etanol; CV = coeficiente de variação
Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Já as plântulas que receberam as diferentes doses do óleo Et e HEt não diferiram do tratamento controle e, portanto, não tiveram suas raízes afetadas de maneira significativa pela aplicação, demonstrando que a ação do óleo não foi o suficiente para interromper o seu desenvolvimento.

Quanto aos solventes, houve diferença estatística somente na concentração 2%, com maior redução do comprimento radicular quando utilizado o solvente HEt, porém, diferindo apenas do H. Comparando aos resultados de Souza Filho et al. (2009) que avaliaram o desenvolvimento da mesma espécie em resposta à aplicação do óleo, vemos uma semelhança ao considerar um efeito significativo com o aumento das proporções dos extratos. Os mesmos autores revelam que dentre as variáveis analisadas, a radícula das sementes respondeu com mais intensidade à inibição. Este efeito era bastante perceptível nas sementes deste trabalho, pois ao atingirem certo período experimental, as radículas tinham seu crescimento impedido, apresentando aparência secas e escuras.

Estudos comprovam que os efeitos dos aleloquímicos afetam diretamente a raiz primária das plântulas, contribuindo para uma acentuada sensibilidade quando em contato com as substâncias inibidoras (SINDHU et al., 2005; MARASCHIN-SILVA e AQUILA 2006; ASHRAFI et al., 2006; NOVAES et al., 2013).

Quanto aos valores CH das plântulas que estão na tabela 5, podemos observar que as doses aplicadas do óleo H, HM e HEt em todas as concentrações foram iguais estatisticamente e que os dois primeiros mencionados apresentaram considerável efeito inibitório ao serem aplicados nas maiores concentrações utilizadas.

Tabela 5. Valores médios do comprimento do hipocótilo das plântulas de mata-pasto sob aplicação dos diferentes extratos de óleo de Nim indiano.

Variável (cm)	Concentração (%)	Solvente				CV (%)	Valor de P		
		H	HM	Et	HEt		S	C	S*C
CH	0	2,23 Aa	2,23 Aa	2,81 Aa	2,15 Aa	27,14	0,0016	0,0010	0,0021
	2	2,93 Aa	2,58 Aab	1,06 Bb	2,20 Aab				
	3	2,68 Aa	2,10 Aa	1,45 ABa	1,20 Aa				
	4	1,53 Aa	1,50 Aa	0,80 Ba	1,80 Aa				

H = hexano; HM = hexano+metanol; Et = etanol; HEt = hexano+etanol; CV = coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Já o resultado do óleo Et foi semelhante ao efeito ocasionado pelo extrato HM no comprimento radicular, onde os extratos 2% e 4%, afetaram em maior proporção e o CH das plântulas desses tratamentos desenvolveram menos.

Quanto às concentrações dos extratos do óleo, somente o extrato de 2% desse óleo diferiu das demais concentrações e solventes, apresentando a menor média (1,06), consistindo no maior efeito de inibição ocasionado no CH das plântulas.

No trabalho realizado por Souza Filho et al. (2009), dentre as espécies avaliadas o mata-pasto foi o que demonstrou maior sensibilidade de forma gradativa ao aumento das dosagens dos extratos do óleo de nim, principalmente nas raízes e parte aérea. Isso comprova os resultados de Ferreira e Aquila. (2000), ao confirmar que as substâncias alelopáticas tendem a inibir mais essas partes da planta do que a germinação. As sementes podem até germinar, porém não se desenvolvem, as quais apresentam aspecto de necrose ou anormalidade devido ao efeito da substância aplicada. Esse aspecto foi possível observar neste presente estudo.

A resposta apresentada por uma espécie submetida à ação dos aleloquímicos depende não só da concentração aplicada como também da espécie atingida. Algumas tendem a ser atingidas com maior intensidade (MARASCHIN-SILVA e AQUILA, 2006).

A ação que ocorre por meio do nim indiano ainda é pouco conhecida. Sabe-se que seus extratos consistem numa mistura de diversos componentes, encontrados em baixa e grandes quantidades e quando há a interação entre eles ocorre o efeito sobre outros organismos (SOUZA FILHO et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

O óleo de nim possui potencialidade como herbicida natural por ser uma alternativa no controle de mata-pasto. O uso do solvente orgânico hexano por 4 horas mostra-se eficiente na extração deste material, além de não interferir nos componentes existentes no óleo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P. **Etanólise do óleo de coco: estudo das variáveis de processo**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –Centro de tecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2010.
- ASHRAFI, Z.Y; RAHNAVARD, A; SADEGHI, S; ALIZADE, H.M; MASHHADI, H.R. Study of the Allelopathic Potential of Extracts of *Azadirachta indica* (Neem). **Journal of Biological Sciences**, v.8, n.3, p.57-61,2006.
- AWOLU O. O.; OBAFAYE R. O.; AYODELE, B. S. Optimization of Solvent Extraction of Oil from Neem (*Azadirachta indica*) and Its Characterizations. **Journal of Scientific Research & Reports**, v. 2, n. 1, p. 304-314, 2013.
- AYOOLA A.A; EFEOVBOKHAN V.C; BAFUWA O.T; DAVID O.T. A search for alternative Solvent to hexane during Neem Oil extraction. **International Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 4, 2014.
- BENÍCIO, D. A; QUEIROGA NETO, V; SOUSA, J.G. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de Nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado no município de Patos - Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.4, n. 2, p. 22-32, 2010.
- BRUM, A. A.S; ARRUDA, L. F; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p.849-854, 2009.
- BONFIM, R. S.; SILVA, A. da.; NASCIMENTO, L. A.; 1; COSTA, D. M. A. da. Análise de rendimento e características do óleo do nim (*Azadirachta indica* A.Juss) extraído a partir de diferentes solventes. In: III CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS, Campina Grande, PB, **Anais...**, 2018.
- CARVALHO, A. C. O. **Características físico-químicas de óleos vegetais puros e adulterados**. Centro de Ciências, UENF, (Trabalho de Conclusão de Curso). 2017.
- CHON, S.U.; JENNINGS, J. A.; NELSON, C. J. Alfafa (*Medicago sativa* L.) autotoxicity: status. **Allelopathy Journal**, v.18, n.1, p.57-80, 2006.
- DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L; Duke, S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.17, p. 4022-4034. 2009.
- DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. **InfoStat versión 2011**. InfoStat Group, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponível em: <<http://www.infostat.com.ar>>.

DRUMMOND, A. R.F., GAZINEU, M. H. P., ALMEIDA, L., SILVA, R.C.L., SOUTO, A. M. Desenvolvimento de aparelho para extração de óleo de alta viscosidade. Disponível em: <[http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007 /caracterizacao/16.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/caracterizacao/16.pdf)>.2008. Acessado em 10 de agosto de 2019.

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. **Planta daninha**. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/tema-plantas-daninhas>>. Acessado em 08 de jan. de 2020.

EMERENCIANO, D. P. **Obtenção de novos sistemas nanoautoemulsificantes a partir do óleo das sementes de *Azadirachta indica* A. Juss e suas aplicações como inibidores de corrosão**. 2013, 100 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2013.

FILIPPIS, F. de M. **Extração com CO² supercrítico de óleos essencial de Hon-sho e Ho-sho-experimentos e modelagem**. 2001, 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

FERREIRA, A.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n.12, p.175-204, 2000.

FIGUEIREDO, E.O; PEREIRA, C.S.; FRAGA, I.M. ARRUDA, A.P.; MIRA, M.O. Avaliação da influência do solvente nas propriedades físico-químicas do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) após o processo de extração. **8º Simpósio Nacional de Biocombustíveis**. Cuiabá- MT, 2015.

GARCIA NETO, S. **Efeito de extrato aquoso das folhas de Nim indiano (*Azadirachta indica*) sobre o crescimento inicial de plantas daninhas**. Centro de Ciências Agrárias, UFPB, (Trabalho de Conclusão de Curso). 2013.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p.475-476, 1973.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4 ed., 1 ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

KUMAR, J; BALRA, J; PARMAR, S. Physicochemical and Chemical Variation in Neem Oils and Some Bioactivity Leads against *Spodoptera litura* F. **J. Agric. Food Chem**, v.44, p. 2137–2143, 1996.

LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KANEKO, T. M. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). **Revista de Ciências Básica e Aplicada**, São Paulo, v.30, n.1, p.9-17, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v.1. 368p.

MAGUIRE J.; D. Speed of germination in selecting and evaluating for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 1, n.1, p.176-177, 1962.

MARASCHIN-SILVA, F; AQUILA MEA. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore** v.30, p. 547-555, 2006.

MARTINEZ, S.S. O Nim - *Azadirachta indica* natureza, usos múltiplos, produção. IAPAR-Instituto Agronômico do Paraná – Londrina. 142p. 2002.

MASCARENHA, T. K. S. de F.; PESSOA, Y. S. R. Q. Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa. **Trabalho & Educação**, v. 22, n. 2, p. 87-103, 2013.

MONTEIRO, G.C.D.; CHAGAS, E.C.O.; MELLO, M.R.F.; Leite, T.C.C.; SENA, A.R. Influência do método de extração no rendimento da espécie *Miconia minutiflora*. In: III Simpósio Nordeste de Química. Campina Grande-PB, **Anais...** 2017.

MORETTO, E.; ALVES, R. F. **Óleos e gorduras vegetais processamento e análises**. Florianópolis. Ed. UFSC, 1986.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo, Ed. Varela, 149 p.1998.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p.139-148, 2005.

MOZINI, J.N.O. **Inativação de fungos e extração de azadiractina e óleo de sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) utilizando fluidos supercríticos**. 2008, 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, SP. 2008.

NEVES, B. P., OLIVEIRA, I. P., NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do Nim indiano**. Circular Técnica da Embrapa, 2003.

NOGUEIRA, P; SEGATTO, C.; BORTOLOTTI, F. L.; RESCHKE, L. C.; LUZ, L. G. Intervalos de pré-semeadura da cultura do milho (*Zea mays* L.) após o cultivo do azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), sobre a emergência e o crescimento inicial. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, São Paulo, n. 28, p. 59-70, 2015.

NOVAES, P; IMATOMI, M; MIRANDA, M. A. F. M; GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxicity of leaf aqueous extract of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) on weeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n.2, p.231-239, 2013.

PAES, J. B.; SOUZA, A. D.; LIMA, C. R.; SANTANA, G. M. Rendimento e Características Físicas dos Óleos de Nim (*Azadirachta indica*) e Mamona (*Ricinus communis*). **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 1, p. 134-139, 2015.

PEREIRA, C. S.; FIGUEIREDO, E. O.; ITOKAGI, D. M.; FRAGA, I. M.; PEREIRA, N. G. Avaliação do potencial do óleo extraído da semente de nim (*Azadirachta indica* a. Juss) como matéria-prima para produção de biodiesel. In: 8º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, **Anais...** 2015.

PINTO, J. S. S.; LANÇAS, F. M. Hidrólise do óleo de *azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

RODRIGUES, L. M. Análise do comportamento da difusividade durante extração por solventes de óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Engenharia**. Uberaba, n. 11, p. 8-12, 2017.

ROMERO, C.; VARGA, M. Extracción del aceite de la semilla de neem (*Azadirachta indica*). **Ciência**, Venezuela, v. 13 n.4, p. 464 - 474, 2005.

SANTOS, V. H. M. **Potencial alelopático de extratos e frações de *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa***. 2012, 251f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Ecofisiologia), Instituto de Biociências de Botucatu; Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2012.

SILVA, A. A.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, J.B. Biologia de plantas daninhas. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa/MG: UFV, 2007, cap.1, p.17-61.

SINDHU, A.; KUMAR, S.; SINDHU, G.; ALI, H.; ABDULLA, M.; K. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leachates on germination and seedling growth of weeds. **Allelopathy Journal**, v. 16, n. 2, p. 329-334, 2005.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA PAIVA, P.F.; SILVA, D. R. G. Cultivo e usos do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. 14 p. (Boletim Agropecuário, 68).

SOUZA FILHO, A. P. S.; CUNHA, R. L.; VASCONCELOS, M. A. M. Efeito inibitório do óleo de *Azadirachta indica* A. Juss. sobre plantas daninhas. **Rev. ciênc. agrár.** Belém, n. 52, p. 79-86, 2009.

SOUZA FILHO, A. P. S; DUTRA, S; SILVA, M. M. M. Métodos de superação da dormência de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas da Amazônia. **Planta Daninha**, v. 16, n. 1, 1996.

TAKEUTI, K. L.; RAYMUNDO, D. L.; BORBA, M. R.; BEZERRA JÚNIOR, P. S.; BANDARRA, P. M.; OLIVEIRA, L. G. S.; CORREIA, G. L. F.; DRIEMEIER, D. Surto de intoxicação por *Senna occidentalis* em bovinos em pastoreio. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 1, p. 954-957, 2011.

TESFAYE, B; TEFERA, T. Extraction of Essential Oil from Neem Seed by Using Soxhlet Extraction Methods. **International Journal of Advanced Engineering, Management and Scienc.** v. 3, n. 6, p. 646-650, 2017.

TREVISAN, E; LEWANDOWSKI, H; OLIVEIRA FILHO, P. C. Estudo sobre o consumo de defensivos agrícolas na região de Irati (PR). *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais.* v.7, n.2, p. 355 – 364, 2011.

VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Quim. Nova**, São Luís, v. 25, n. 6B, p. 1057-1060, 2002.

VILELA, J.A.R. **Efeito da utilização de Óleo de nim (*Azadirachta indica*) por via Dérmica e da Moxidectina por via Subcutânea na Prevenção de Infestação por *Dermatobia hominis* (LINNAEUS JR., 1781) (DIPTERA; CUTEREBRIDAE) em Bovinos.** 2008, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2008.53f.

WU, H. Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. **LWT- Food Science and Technology.** v. 44, p. 2032-2039, 2011.