



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTU SENSU” EM
BIOENERGIA – NÍVEL MESTRADO

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL (B100)
COMERCIAL NA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES NATURAIS
DA CASCA DE ROMÃ

ELAINE DE PAULA WITT

TOLEDO-PR

2018

ELAINE DE PAULA WITT

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL (B100)
COMERCIAL NA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES NATURAIS
DA CASCA DE ROMÃ

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

TOLEDO-PR

2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Witt, Elaine de Paula

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL (B100) COMERCIAL NA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES NATURAIS DA CASCA DE ROMÃ / Elaine de Paula Witt; orientador(a), Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner; coorientador(a), Edson Antonio da Silva, 2018.

139 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2018.

1. Antioxidante natural. 2. Biodiesel. 3. Estabilidade Oxidativa. I. Baumgartner, Tatiana Rodrigues da Silva. II. Silva, Edson Antonio da . III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por ELAINE DE
PAULA WITT perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia
em 11 de setembro de 2018

COMISSÃO JULGADORA



Prof.ª. Dr.ª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgarnter
Orientadora



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva
Coorientador



Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba

Membro



Prof. Dr. Vilmar Steffen

Membro

Dedico este trabalho aos meus queridos irmãos e aos meus amados pais pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela força concedida para vencer mais uma etapa na minha vida.

Aos meus pais, Valdevino de Paula Witt e Marlene Missio Dalpont Witt, que dedicaram parte de suas vidas para me ensinar a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir diante dos obstáculos, por todo amor e carinho que me oferecem e pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos Edivan e Eduardo e minha cunhada Marlene, que sempre me incentivaram. À meus sobrinhos Gustavo, Marina e Julia pelos momentos de alegria e diversão.

Ao meu namorado pelos momentos de alegrias, pelo apoio nas minhas decisões e incentivo para continuar buscando ser melhor de forma pessoal e profissional.

A minha orientadora Profa. Dra. Tatiana Rodrigues da Silva pela orientação, pelos ensinamentos e auxílio nos trabalhos e por contribuir para meu crescimento profissional.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Edson da Silva pela disponibilidade em me auxiliar sempre que preciso, pelos ensinamentos e extrema dedicação, por contribuir de no desenvolvimento dessa pesquisa e no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato e seus alunos do Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LPAC) da Universidade Estadual de Londrina pelo auxílio no desenvolvimento dos testes de estabilidade oxidativa no equipamento Rancimat.

Ao estagiário Leandro Couto da Central Analítica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo auxílio nas análises de Calorimetria Diferencial Exploratória-DSC.

Aos meus colegas de Laboratório, Paula Alessandra Palsikowski, Cleuciane Tilvitz Nascimento, Matheus Romeiro e Elissandro Klein que sempre estiveram dispostos a me auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE pela oportunidade em realizar o Mestrado em Bioenergia.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos meus amigos e familiares que de alguma maneira, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS NOMENCLATURA	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Energia.....	19
3.2 História do Biodiesel	19
3.3 Conceito do Biodiesel.....	21
3.3.1 Matérias primas para Produção do Biodiesel	21
3.3.2 Produção do Biodiesel.....	24
3.4 Estabilidade Oxidativa.....	27
3.4.1 Método Rancimat	28
3.4.1.1 Parâmetros Cinéticos da oxidação do Biodiesel	29
3.4.1.2 Parâmetros Termodinâmicos da oxidação do Biodiesel	31
3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	32
3.5 Antioxidantes.....	33
3.5.1 Classificação dos antioxidantes	33
3.5.2 Antioxidantes Sintéticos e Naturais.....	34
3.5.3 Compostos Fenólicos como antioxidantes	36
3.6 Extração de antioxidantes.....	39
3.6.1 Extração convencional.....	39
3.6.1.1 Extração Soxhlet.....	40

3.6.1.2 Extrator de óleos e gorduras - Goldfish	41
3.7 Extração Supercrítica (ESC).....	42
3.7.1 CO ₂ como fluido supercrítico	43
3.7.2 Solubilidade do fluido Supercrítico	45
3.8 Modificador cossolvente.....	45
3.9 Estudo da Cinética de extração.....	46
3.10 Modelo Matemático da Extração Supercrítica	48
3.10.1 Modelo de Sovová (1994)	50
3.11 Plantas antioxidantes	54
10.12 Casca de Romã	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 Preparo da Matéria Prima – Casca de Romã	58
4.2 Análises da Matéria-Prima	58
4.2.1 Determinação do diâmetro médio das partículas (ds)	58
4.3.2 Umidade da Casca de Romã.....	59
4.4 Obtenção de extratos convencionais.....	59
4.4.1 Extração Soxhlet.....	60
4.4.2 Extrator de óleos de gorduras - Goldfish.....	61
4.5 Extração com dióxido de carbono supercrítico (ESC)	63
4.6 Rendimento das extrações	65
4.7 Modelagem Matemática da Extração Supercrítica.....	65
4.7.1 Densidade do CO ₂	65
4.7.2 Solubilidade do extrato de Casca de Romã no CO ₂ Supercrítico.....	66
4.7.3 Densidade real da casca de romã.....	66
4.7.4 Densidade do leito de extração	67
4.7.5 Porosidade do leito de extração	67
4.8 Obtenção do biodiesel	68

4.9 Caracterização dos Extratos.....	68
4.9.1 Determinação da composição química dos extratos.....	68
4.10 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TFT) pelo método FolinCiocalteau.....	69
4.11 Determinação da atividade antioxidante pelo Método DPPH•.....	70
4.12 Aditivação do Biodiesel.....	71
4.13 Testes de Estabilidade Oxidativa do biodiesel	72
4.13.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	72
4.13.2 Rancimat.....	73
4.13.3 Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Caracterização da casca de Romã.....	74
5.1.1 Diâmetro médio	74
5.1.2 Umidade	74
5.2 Rendimento Global das Extrações.....	75
5.2.1 Extração convencional – Soxhlet e Goldfish.....	75
5.3 Extração Supercrítica.....	76
5.3.1 Rendimento Global.....	76
5.3.2 Análise estatística para o rendimento da extração supercrítica	80
5.4 Modelagem Matemática da Extração Supercrítica.....	85
5.4.1 Solubilidade	85
5.5 Modelo cinético de Sovová (1994).....	86
5.6 Composição química dos Extratos	90
5.6.1 Cromatografia gasosa	90
5.6.2 Determinação do Teor de Compostos fenólicos totais (TFT) método FolinCiocalteau.....	93
5.6.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•	96
5.7 Estabilidade oxidativa do Biodiesel – Determinação do Período de indução.	99

5.7.1 Rancimat.....	99
5.7.1.1 Parâmetros Cinéticos	105
5.7.1.2 Parâmetros Termodinâmicos	113
5.8 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	114
6. CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Algumas espécies oleaginosas estudadas para produção de biodiesel. (a) Soja (<i>Glycinemax</i> L.) (b) Dendê (<i>Elaeisguineensis</i> L.) (c) Girassol (<i>Helianthusannuus</i> L.).	22
Figura 2 - Culturas oleaginosas não comestíveis para produção de biodiesel. (a) Algodão (<i>Gossypiumhirsutum</i> L.) (b) Pinhão Manso (<i>Jatropha</i> curcas L.) (c) Mamona (<i>Ricinuscommunis</i> L.) (d) Tiririca (<i>Cyperusesculentus</i> L.).	23
Figura 3 - Reação geral para transesterificação de triglicerídeos.	24
Figura 4 - Mecanismo de transesterificação alcalina de óleos vegetais.	26
Figura 5 - Mecanismo de transesterificação ácida de óleos vegetais.	27
Figura 6 - Princípio de funcionamento de equipamento rancimat e seus componentes.	29
Figura 7 - Estrutura Química dos principais antioxidantes sintéticos.	35
Figura 8 - Estrutura dos Compostos Fenólicos.	37
Figura 9 - Estrutura geral de um Flavonóide.	38
Figura 10 - Estrutura Química dos ácidos fenólicos. (a) Ácido p -cumárico (b) Ácido Caféico (c) Ácido Felúrico (d) Ácido Sinápico (e) Ácido Gálico.	38
Figura 11 - Ilustração do equipamento para extração de óleos e gorduras – Goldfish.	42
Figura 12 - Diagrama de fases (P_c – Pressão Crítica e T_c – Temperatura crítica).	44
Figura 13 - Curva de extrato obtido por ESC em função do tempo de extração (I-CER) Período de taxa constante de extração, (II-FER) Período de taxa decrescente de extração e (III -DCP) Período de difusão controlada.	47
Figura 14 - Romãzeira e fruto.	56
Figura 15 - Ilustração do extrator Soxhlet.	60
Figura 16 - Aparelho extrator de gordura - Goldfish.	62
Figura 17 - Fluxograma da extração convencional.	62
Figura 18 - Fluxograma extração supercrítica.	63
Figura 19 - Esquematização do módulo de extração com fluido supercrítico.	64
Figura 20 - Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH•.	70
Figura 21 - Rendimento da extração supercrítica da casca de romã.	79
Figura 22 - Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da ESC.	81
Figura 23 - Gráfico dos valores observados x valores preditos pelo modelo referente ao rendimento das extrações.	83
Figura 24 - Superfície de resposta e Curvas de níveis para o rendimento da ESC.	84
Figura 25 - Curva cinética experimental e modelo de Sovová (1994) das extrações supercrítica da casca de romã (Temperatura de 35 °C e variação do volume de etanol (1) 0 mL; (2) 2,5 mL e (3) 5 mL).	88
Figura 26 - Curva cinética experimental e modelo de Sovová (1994) das extrações supercrítica da casca de romã (Temperatura de 45 °C e variação do volume de etanol (4) 0 mL; (5) 2,5 mL e (6) 5 mL).	89
Figura 27 - Curva cinética experimental e modelo de Sovová (1994) das extrações supercrítica da casca de romã (Temperatura de 55 °C e variação do volume de etanol (7) 0 mL; (8) 2,5 mL e (9) 5 mL).	89
Figura 28 - Curva padrão Ácido Gálico.	94
Figura 29 - Gráfico da condutividade em função do tempo, da avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel comercial (controle) sem adição de antioxidantes.	100
Figura 30 - Gráfico que indica o tempo de indução do biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT.	101

Figura 31 – Gráfico referente ao tempo de indução do biodiesel com adição dos extratos obtidos pelo método de extração supercrítica com e sem adição de etanol, conforme item 4.9.	104
Figura 32 - Gráfico referente ao tempo de indução do biodiesel para os extratos obtidos pela extração Soxhlet (Sox) e Extrator de Gordura (Ext) com variação de solventes Etanol (Et), Acetato de etila (Acet) e Hexano (Hex).	105
Figura 33 - Gráfico da Equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel comercial puro (Controle).	109
Figura 34 - Gráfico da Equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com BHA.	109
Figura 35 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com BHT.	110
Figura 36 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato C. Condição de extração Supercrítica na temperatura de 35 °C, com 5 mL de etanol e Pressão de 200 bar.	110
Figura 37 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato I. Condição de extração Supercrítica na temperatura de 55 °C, com 5 mL de etanol e Pressão de 200 bar.	111
Figura 38 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato K. Condição de extração com equipamento Soxhlet e solvente Acetato de Etila.	111
Figura 39 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato K. Condição de extração com equipamento Extrator de Gordura e solvente Acetato de Etila	112
Figura 40 - Curva referente à análise DSC para o biodiesel comercial puro e aditivado com os antioxidantes BHA e BHT.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos do óleo de soja.	22
Tabela 2 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração convencional.....	60
Tabela 3 - Extratos obtidos com CO ₂ Supercrítico.....	64
Tabela 4 - Condições utilizadas para determinar a densidade real das sementes por picnometria de gás hélio.	67
Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação da composição química dos extratos.	68
Tabela 6 - Amostras submetidas ao teste de estabilidade oxidativa rancimat/ Extratos da casca de romã aditivadas ao biodiesel.	71
Tabela 7 - Distribuição granulométrica das cascas de romã após secagem e moagem.	74
Tabela 8 - Rendimento global das extrações convencionais com extrator Soxhlet e extrator de gordura Goldfish.....	75
Tabela 9 - Condições operacionais e rendimentos globais da extração supercrítica da casca de romã.....	77
Tabela 10 - Planejamento experimental utilizado para realizar a análise estatística dos dados de extração.....	80
Tabela 11 - Tabela de efeitos principais pressão e temperatura e de interação no rendimento da ESC.....	80
Tabela 12 - Tabela ANOVA a 95% de confiança.	83
Tabela 13 - Parâmetros utilizados para a modelagem matemática da cinética de extração.	85
Tabela 14 - Solubilidade do soluto no solvente CO ₂	86
Tabela 15 - Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações da casca de romã com CO ₂ supercrítico.....	87
Tabela 16 - Indicadores estatísticos da modelagem matemática.	90
Tabela 17 - Principais compostos presentes nos extratos supercríticos da casca de romã.	93
Tabela 18 - Principais compostos presentes nos extratos convencionais da casca de romã nos solventes etanol, acetato de etila e hexano.....	93
Tabela 19 - Teor de fenólicos totais para os extratos de casca de romã.	95
Tabela 20 – Atividade antioxidante dos extratos de casca de romã na concentração de 1000 µg.mL ⁻¹ e a capacidade de redução de 50% do radical DPPH• (EC ₅₀).	97
Tabela 21 - Tempo de indução obtido na análise Rancimat para as amostras de biodiesel aditivadas com os extratos da casca de romã.	102
Tabela 22 – Período de Indução do biodiesel com e sem adição de antioxidantes nas temperaturas 110, 115, 120 e 125 °C.....	106
Tabela 23 - Constante de velocidade (k) para as temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C para as amostras.....	106
Tabela 24 - Energia de ativação para as amostras de biodiesel comercial com e sem adição de antioxidante.....	108
Tabela 25 - Valores de Entalpia (ΔH^\ddagger), Entropia (ΔS^\ddagger) e Energia Livre de Gibbs (ΔG^\ddagger) para as amostras analisadas.	113
Tabela 26 – Resultados encontrados para as análises DSC no biodiesel aditivado com os extratos de casca de romã.	116

LISTA DE ABREVIATURAS NOMENCLATURA

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
PG	Galato de Propila
PA	Pirogallol
BHT	Butilhidroxitolueno
BHA	Butilhidroxianisol
TBQH	Terc-Butilhidroxiquinona
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
IAE	International Energy Agency
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ProÓleo	Programa Nacional de Óleos Vegetais
PNPB	Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel
ASTM	Society for Testing and Materials
EN	Comittee for Standardization
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
AA	Atividade Antioxidante
TFT	Teor de fenólicos totais
Ea	Energia de Ativação
Eaa	Energia de Ativação Aparente
ΔH^\ddagger	Entalpia no estado ativado
ΔS^\ddagger	Entropia no estado ativado
ΔG^\ddagger	Energia Livre de Gibbs média no estado ativado
P-DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória Pressurizada
OT	Tempo de oxidação
TI	Tempo de indução
Pc	Pressão Crítica
Tc	Temperatura Crítica
ESC	Extração Supercrítica
FER	Falling extraction rate Período de taxa constante de extração
CER	Constant extraction rate Período de taxa decrescente de extração
DCP	Diffusion controlled period Período de difusão controlada

RESUMO

WITT, Elaine P. **Avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel (B100) comercial na presença de antioxidantes naturais da casca de romã.** Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo – Pr. 2018. Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

Biodiesel é um combustível sensível a oxidação devido a sua composição química. Para elevar sua estabilidade termo oxidativa é necessário acrescentar antioxidantes sintéticos ou naturais. Dentre os antioxidantes naturais existe uma variedade de plantas que podem ser utilizadas com a finalidade de evitar ou retardar reações de oxidação. Estes são capazes de promover ou inativar os radicais livres interrompendo a reação em cadeia de oxidação do biocombustível. Na casca de romã é possível encontrar compostos fenólicos, compostos antioxidantes além de diversos compostos bioativos, com mecanismo de ação semelhante ao da vitamina C, Vitamina E e betacaroteno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa do Biodiesel na presença de antioxidantes naturais extraídos da casca da romã pelo método de extração convencional (Soxhlet e extrator de óleos e gorduras-Goldfish) e pela extração Supercrítica com CO₂ supercrítico em condições de pressão constante (200 bar) e variação de temperatura (35, 45 e 55 °C) e cossolvente etanol (0 mL, 2,5 mL e 5 mL). Os extratos foram avaliados quanto à atividade antioxidante pela inibição do radical DPPH•, sendo o extrato obtido pelo método Soxhlet com acetato de etila o que apresentou 94,16% de inibição na concentração de 1000 µg.mL⁻¹. O Teor de Compostos Fenólicos utilizando o reagente FolinCiocalteu foi avaliado para os extratos e a amostra obtida pelo equipamento extrator de óleos e gorduras-Goldfish com solvente etanol apresentou uma concentração de 98,62 mg de EAG/g de extrato. O biodiesel comercial foi aditivado com os extratos de casca de romã e com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT e submetidos ao teste de estabilidade oxidativa em Rancimat e teste para indicar o tempo de oxidação em equipamento de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). Foram avaliados os efeitos da temperatura e da adição de cossolvente etanol no rendimento do extrato. Os melhores tempos de indução obtidos foram para o Biodiesel aditivado com os extratos obtidos pelo método convencional, ambos com solvente acetato de etila, sendo 11,13 horas para o extrato obtido no extrator de óleos e gorduras (ExtAcet) e 11,01 horas para o SoxAcet. Ainda verificou-se que esses valores são superiores aos encontrados para o biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA (6,91 h) e BHT (7,86 h). Entre os extratos supercríticos destacou-se a condição de 35 °C com 5 mL de etanol (8,01 h) e 55 °C com 5 mL de etanol (7,77 h). Com exceção do extrato supercrítico na temperatura de 35 °C sem adição de etanol, todos os extratos apresentaram um tempo de indução superior ao obtido no controle (4,38 h), no entanto apenas três extratos aditivados ao biodiesel apresentaram valor superior ao exigido pela Resolução 45/2014 a qual prevê estabilidade oxidativa de 8 horas para o teste em Rancimat. Para o teste DSC, as amostras que apresentaram maior tempo de oxidação foi para o ExtAcet (31,42 min) e extração supercrítica na condição de 35 °C com 5 mL de etanol (31,25 min). A estabilidade oxidativa do biodiesel foi, em sua maioria, superior quando acrescido dos extratos de casca de romã, em comparação ao biodiesel puro, mostrando eficiência na sua utilização como antioxidante natural.

Palavras-chave: Biodiesel, Extração Supercrítica, Soxhlet, Casca de romã (*Punica granatum* L.), α -Tocoferol. .

ABSTRACT

WITT, Elaine P. **Estimate of oxidative stability of commercial biodiesel (B100) in the presence of natural antioxidants from pomegranate peel.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioenergia - Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo – Pr. 2018. Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner.

Biodiesel is a sensible fuel to the oxidation, because it presents in its chemical composition some free radicals. To raise its oxidative stability it is necessary to add synthetic or natural antioxidants. Among the natural antioxidants there is a variety of plants that may be used with the function to avoid or to detain the chain reactions of oxidation, which are capable to promote or inactivate the free radicals interrupting the reaction in the biofuel chain. In the pomegranate peel is possible to detect some phenolic compounds and antioxidants compounds beyond several bioactive compounds with some mechanisms of action that are similar to the vitamin C, vitamin E and beta-carotene. The aim of this study was to evaluate the biodiesel oxidative stability in the presence of some natural oxidants which were extracted from the pomegranate peel by the conventional method of extraction (Soxhlet and the grease and oils extractor – Goldfish) and by the supercritical extraction with CO₂ in a condition of constant pressure (200 bar), some variation in the temperature (35, 45 and 55 °C) and in the presence of the cosolvent ethanol (0, 2,5 and 5 mL). The extracts were measured in relation to the antioxidant activity by the DPPH• radical inhibition. The extract obtained by the Soxhlet method with ethyl acetate presented 94,16% of inhibition in the 1000 µg.mL⁻¹ concentration. The phenolic compound content was used with the FolinCiocalteu reagent, which was evaluated for the extracts. The sample obtained by the grease and oils extractor – Goldfish with an ethanol solvent, showed a density of 98,62mg of EAG/g of the extract. The commercial biodiesel was additive with some extract of the pomegranate peel and with the synthetic antioxidants BHA and BHT and submitted to the oxidative stability test in the Rancimat. A test that indicates the time of the oxidation in the Exploratory Differential Calorimetry (DSC) equipment. It was analyzed the effects in the temperature and the addition of the ethanol cosolvent in the extract yield. The best tenses of induction obtained were for the additive biodiesel with some extracts obtained by the conventional method, both with the ethyl acetate solvent, which took 11,13 hours for the extract obtained in the grease and oils extractor (ExtAcet) and 11,01 hours for the extract obtained in the Soxhlet (SoxAcet). It was checked that these values are higher than the other ones which were found for the additive biodiesel with the synthetic antioxidants BHA (6,91h) and BHT (7,86). Among the extracts obtained by the supercritical extraction, it was highlighted the condition of 35 °C with 5 mL of ethanol (8,01 h) and 55 °C with 5 mL of ethanol (7,77 h). Except the supercritical extract in the temperature of 35 °C without the addition of ethanol, all the extracts presented a time of induction higher than the obtained in the control (4,38 h), however only three extracts that were added to the biodiesel showed a higher value which is demanded in the Resolution n°45/2014 and it predicts oxidative stability of 8h for the test in Rancimat. For the DSC test, the samples that presented a higher time of oxidation were for the ExtAcet (31,42 min) and the supercritical extraction in the condition of 35 °C with 5mL of ethanol (31,25 min). The biodiesel oxidative stability was in the most part higher when it was added to the pomegranate peel in comparison to the pure biodiesel showing efficiency in its utilization as a natural antioxidant.

KEYWORDS: Biodiesel. Supercritical extraction. Soxhlet. Pomegranate peel. Alpha-tocopherol.

1. INTRODUÇÃO

A importância de biocombustíveis vem ganhando reconhecimento tanto no setor econômico quanto no ambiental, por poluir menos o meio ambiente quando comparado aos combustíveis de origem fósseis, pois além de ser biodegradável é de origem renovável, obtido a partir de plantas oleaginosas ou gordura animal. Dentro os biocombustíveis, o biodiesel vem sendo amplamente estudado.

Segundo o Art. 2º da resolução da ANP nº 207 de 19 de março de 2008, quimicamente o biodiesel é definido como: “*Um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou gorduras animais*”. É obtido principalmente a partir da reação de transesterificação, que converte um triacilglicerídeo em éster de ácido graxo (LOMANOCO *et al.*, 2012). No Brasil, a principal fonte de produção de biodiesel é da *Glycine max L* (soja) (BORSATO *et al.*, 2017).

Os ácidos graxos insaturados presentes na matéria-prima para o biodiesel, favorecem o processo de oxidação, que ocorrem, seja pela ação do ar, da luz, da temperatura e/ou da umidade (FOCKE *et al.*, 2012). O óleo extraído dos grãos da *Glycine max L* apresentam cerca de 76% de triacilglicerol formados por ácidos graxos insaturados, o que acarretam em um biocombustível com baixa estabilidade oxidativa (BORSATO *et al.*, 2010).

Com o intuito de melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, estudos vêm sendo feitos, em que a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais é utilizada com a finalidade de aumentar a estabilidade do mesmo, retardando a formação de compostos como aldeídos, cetonas, dímeros e polímeros que prejudicam as propriedades dos combustíveis, além de retardar a deterioração por rancificação (REGINATO NETO *et al.*, 2013). Plantas que possuem antioxidantes naturais apresentam atividade antioxidante, e podem ser extraídos por diferentes técnicas e serem utilizados para controlar o processo de oxidação do biodiesel.

Segundo a resolução ANP nº45/2014 a estabilidade à oxidação do biodiesel a 110 °C é de 8 horas (ANP, 2014). Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos que avaliam a eficiência dos antioxidantes sintéticos, entre eles os autores Karavalakis e Stournas (2011) avaliaram o PG (propilgalato), PA (pirogallol), BHT (butil-hidroxi-

tolueno), BHA (butil-hidroxi-anisol) e o TBHQ (terc-butil-hidroquinona) demonstrando aumento no tempo de indução a oxidação, além de obter o melhor desempenho entre os antioxidantes analisados.

Quanto aos antioxidantes naturais, encontra-se na literatura estudos relacionados às propriedades antioxidantes do chá verde, chá preto, plantas medicinais, vitaminas, temperos e hortaliças, frente a uma variedade de espécies reativas (WETTASINGHE, SHAHIDI; 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SHYU *et al.*, 2009; NIVETHA; ROY, 2013; NAJARAN *et al.*, 2016). Algumas especiarias como alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e orégano (*Origanum vulgare*) foram estudados por Spacino, *et al.*, 2015). Frutos como a romã, segundo Werkman *et al.*, 2008 apresentam compostos fenólicos como antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos e compostos antioxidantes que captam facilmente radicais livres, no entanto não há estudos que a utilizem como antioxidante em biodiesel.

Este projeto visa desenvolver estudos que possam melhorar o comportamento dos biocombustíveis perante agentes como umidade, temperatura e oxigênio, que causam a degradação do mesmo, bem como buscar melhoria no comportamento dos biocombustíveis. Extratos da casca de romã foram utilizados para melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, levando em consideração sua boa atuação perante testes preliminares além do reaproveitamento desse resíduo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como principal objetivo estudar a estabilidade termo oxidativa do biodiesel comercial, na presença de antioxidante natural extraídos por método convencional em solvente líquido e por extração supercrítica, utilizando o teste de Oxidação Acelerada Rancimat e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) na análise do biodiesel.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair antioxidantes da casca da romã utilizando métodos convencionais, Soxhlet e equipamento extrator de óleos e gorduras - Goldfish, variando os solventes conforme sua polaridade (Etanol, Acetato de Etila e Hexano) bem como, extrair antioxidantes da casca da romã pelo método de extração supercrítica utilizando CO₂ como fluido supercrítico;
- Avaliar o efeito dos extratos obtidos pela técnica convencional e supercrítica na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de soja, pelas técnicas Rancimat e DSC;
- Caracterizar todos os extratos obtidos pelo método GC-MS quanto a sua composição química;
- Comparar métodos de extração quanto à composição dos extratos, rendimentos e efeito na estabilidade termo oxidativa;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energia

Com o aumento da demanda e consumo de energia pela população nota-se que o meio ambiente vindo sendo afetado de forma negativa, tendo em vista o uso contínuo de Fontes de energia não renováveis, que podem causar os mais diferentes tipos de poluição ambiental (KANNAN; VAKEESAN, 2016) como a poluição atmosférica podendo causar mudança climática, por sua vez acarretar desastres naturais que danificam o ecossistema, entre outros.

Preocupação com meio ambiente, reservas de petróleo limitado e aumento da demanda por combustíveis são alguns, dos diversos, motivos que levaram à busca de alternativas para Fontes de energias renováveis (SALUJA *et al.*; 2016). A energia solar, eólica, hídrica e geotérmica, são exemplos de energias renováveis (KANNAN; VAKEESAN, 2016).

No que diz respeito à substituição de combustíveis fósseis, os biocombustíveis vem sendo amplamente estudados, nas últimas três décadas o uso de óleos vegetais para produção de biodiesel como substituto do diesel tem sido foco de interesse dos pesquisadores (KANNAN; VAKEESAN, 2016). O Biodiesel é considerado promissor devido ao seu menor impacto ambiental sendo um bicomcombustível de Fonte renovável e biodegradável com baixa taxa de poluentes em comparação com o diesel de origem do petróleo (GUILLÉN; CABO, 2001; BUOSI *et al.*, 2016; KANNAN; VAKEESAN, 2016).

3.2 História do Biodiesel

No século XX havia um grande incentivo pela pesquisa e exploração de combustíveis fósseis como, petróleo, carvão e gás natural (NAIK *et al.*, 2010). Segundo a Agência Internacional de Energia (IAE), ainda hoje, aproximadamente 80% da energia

primária consumida em todo mundo provém dos combustíveis fósseis. Atualmente, os combustíveis fósseis são questionados quanto ao seu valor de mercado e seus danos ao meio ambiente (ESCOBAR *et al.*, 2009; NAIK *et al.*, 2010). Com isso países da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) passaram a incentivar o uso dos biocombustíveis com o intuito de colaborar com a matriz energética, reduzir gases de efeito estufa e criar demanda adicional de produtos agrícolas (KEYZER *et al.*, 2008).

No Brasil a trajetória do Biodiesel começou na década de 1920, com iniciativas do Instituto Nacional de Tecnologia, porém apenas no final da década de 1970, foi criado o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Proóleo), em meio à crise energética internacional. Somente em 1980 o Proóleo passou a ser chamado de Programa Nacional de Óleos Vegetais para Fins Energéticos, que tinha como objetivo promover a substituição em até 30% de óleo diesel com óleos vegetais produzidos a partir da soja, amendoim, colza e girassol (TÁVORA, 2012).

A Medida Provisória nº. 214/2004, convertida na Lei nº. 11.097/05 determinou a produção e o consumo de biodiesel no Brasil. Desta forma, houve o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e o Estado passou a ter metas de uso de biodiesel na matriz energética nacional, sendo este considerado um marco na história do biodiesel no Brasil (TAPANES *et al.*, 2013; TÁVORA, 2012).

O biodiesel, o etanol e o biogás são chamados de biocombustíveis de primeira geração (NAIK *et al.*, 2010), pois são aqueles produzidos principalmente a partir de culturas utilizadas para alimentação, tais como cana-de-açúcar, grãos e óleos de vegetais, o que causa questionamento do ponto de vista ambiental, econômico, social e ético, por sua vez os biocombustíveis de segunda geração, são aqueles produzidos por culturas não alimentares tais como resíduos florestais e/ou agrícolas e co-produtos (MOHR; RAMAM, 2013).

No Brasil a principal Fonte vegetal de produção de biodiesel é a partir da soja (*Glycynemax L*) (BORSATO *et al.*, 2010). A matéria prima utilizada é fundamental para a decisão de qual rota utilizada na produção do biodiesel sendo considerado de primeira geração, no entanto estudos são desenvolvidos com o intuito de utilizar matéria-prima de segunda geração. Uma das vantagens do biocombustível de origem vegetal é a de possuir, desde a produção da matéria prima até o seu consumo, um ciclo parcialmente fechado do carbono (GERHARD *et al.*, 2006). O biodiesel ao ser consumido tem o potencial de

reduzir a quantidade de dióxido de carbono (CO₂) que é emitido, pois as plantas utilizam o CO₂ no processo de fotossíntese à medida que crescem, dessa forma o ciclo de carbono é completado (NAIK *et al.*, 2010).

3.3 Conceito do Biodiesel

Segundo ANP, quimicamente o biodiesel é um combustível proveniente de ácidos graxos de cadeia longa, podendo ser derivados de óleos vegetais e/ou gorduras animais (ANP, 2008). O principal componente da matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel é composta em sua maior parte por triglicerídeos e por componentes em menor proporção tais como, água, esteróis, ácidos graxos livres, fosfolípidios e impurezas, quando trata-se de óleo residual (RAMOS *et al.*, 2011).

3.3.1 Matérias primas para Produção do Biodiesel

A matéria-prima para a produção do biodiesel pode ter origem vegetal ou animal, sendo que a primeira é mais utilizada e estudada. Dentro dos óleos vegetais temos as mais diversas espécies que são estudadas para utilização na produção de biodiesel tais como: soja (*Glycine max* L.), dendê (*Elaeisguineensis*L.), girassol (*Helianthusannuus* L.) entre outras, ilustradas na Figura 1 (GALLINA, 2011; SALUJA *et al.*; 2016; YAAKOB *et al.*, 2014).

A soja possui um teor de óleo de 18-25% no grão (PERES; BELTRÃO, 2006; KHALIL, 2012). O óleo extraído dos grãos da soja apresentam cerca de 76% de triglicerídeos formados por ácidos graxos insaturados que acarretam em um biocombustível com baixa estabilidade oxidativa (BORSATO *et al.*, 2010), pois os mesmos favorecem o processo de oxidação, que ocorrem, seja pela ação do ar, da luz, temperatura e/ou umidade (FOCKE *et al.*, 2012).

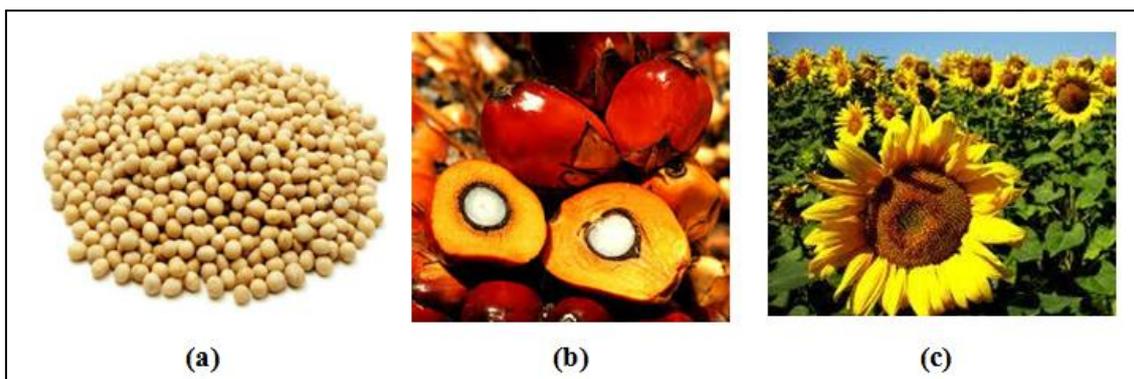


Figura 1- Algumas espécies oleaginosas estudadas para produção de biodiesel. (a) Soja (*Glycinemax* L.) (b) Dendê (*Elaeisguineensis* L.) (c) Girassol (*Helianthusannuus* L.).
(Fonte: Montagem com Figuras da internet).

A composição média do óleo da soja é centrada por cinco ácidos graxos principais: palmítico (15:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3) (Tabela 1). Estes ácidos graxos, cuja proporção relativa é mantida constante após a reação de transesterificação, compõem mais de 95% do teor de ácidos graxos do óleo (COSTA NETO *et al.*, 2000).

Tabela 1- Composição de ácidos graxos do óleo de soja.

Número de Carbonos	Ácidos Graxos	Concentração (%)
C12:0	Láurico	0,1 (máx.)
C14:0	Mirístico	0,2 (máx.)
C16:0	Palmítico	9,9 - 12,2
C16:0 (9)	Palmitoléico	traços-0,2
C18:0	Esteárico	3 - 5,4
C18:1(9)	Oléico	17,7 – 26
C18:2 (9,12)	Linoléico	49,7 - 56,9
C18:3 (9,12,15)	Linolênico	5,5 - 9,5
C20:0	Araquídico	0,2 - 0,5
C20:1 (5)	Gadolêico	0,1 - 0,3
C22:0	Behênico	0,3 - 0,7
C22:1	Erúcico	0,3 (máx.)
C24:0	Ligocérico	0,4 (máx.)

(Fonte: adaptada Costa Neto *et al.*, 2000).

Um dos maiores problemas quanto ao uso de algumas oleaginosas é a sua competição com a cadeia alimentar humana, impulsionando, desta forma novos estudos que buscam a produção de biodiesel com culturas não comestíveis, tais como, algodão (*Gossypium hirsutum* L.), pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), tiririca (*Cyperus esculentus* L.) entre outras, ilustradas na Figura 2 (GALLINA, 2011; YAAKOB *et al.*, 2014). Ainda, o óleo de cozinha vem sendo amplamente estudado como possível matéria-prima, no entanto o mesmo possui grande quantidade de ácido graxo livre o que pode ocasionar maiores problemas quanto à oxidação do biodiesel (YAAKOB *et al.*, 2014).

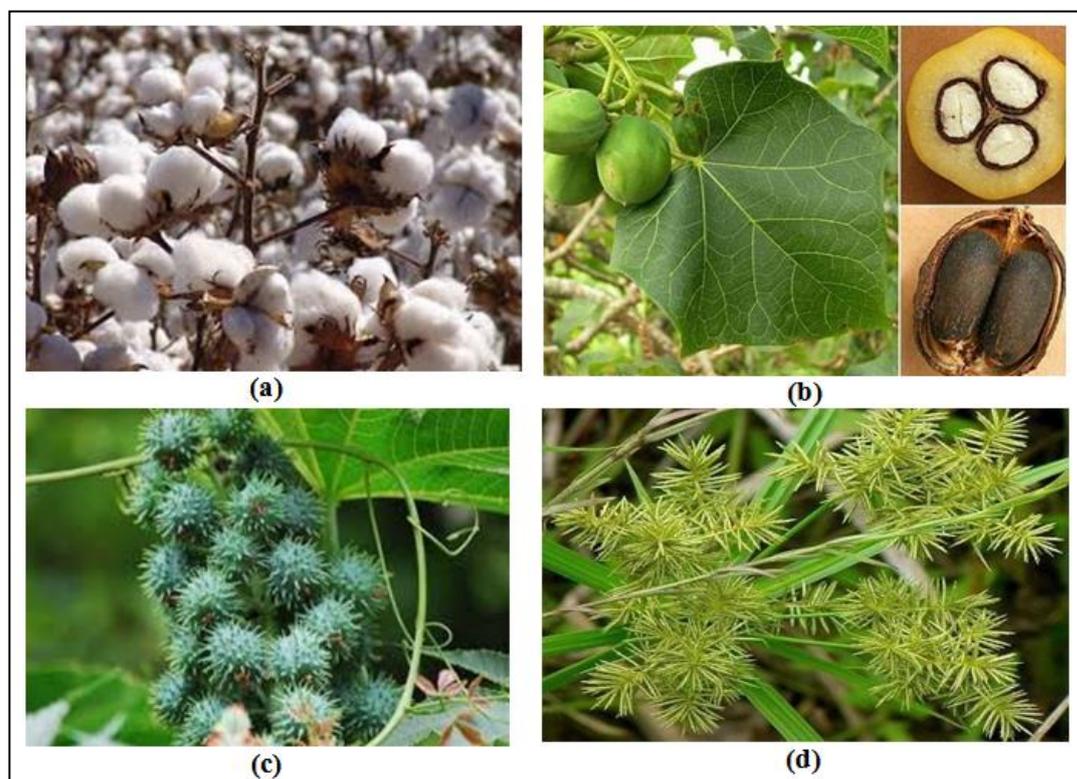


Figura 2 - Culturas oleaginosas não comestíveis para produção de biodiesel. (a) Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (b) Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) (c) Mamona (*Ricinus communis* L.) (d) Tiririca (*Cyperus esculentus* L.).

(Fonte: Montagem com Figuras da internet).

3.3.2 Produção do Biodiesel

O biodiesel é obtido principalmente pelo método de transesterificação, como mostra a Figura 3 (OROZCO *et al.*, 2013 e DEGIRMEMBASI *et al.*, 2014), que quimicamente consiste no ataque nucleófilo (álcool) ao carbono da carboxila do éster (eletrófilo), na presença de um catalisador, tendo como produto um álcool pesado (glicerol) e um éster (biodiesel), (GERHARD *et al.*, 2006; GAMA *et al.*, 2010; LOMANOCO *et al.*, 2012).

Existem alguns fatores que condicionam a reação de produção de biodiesel, ou seja, alterando alguns fatores como a proporção molar, o tipo de álcool, tempo de reação, temperatura do sistema e o tipo e a quantidade de catalisador, podendo causar um aumento no rendimento da produção do biodiesel (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

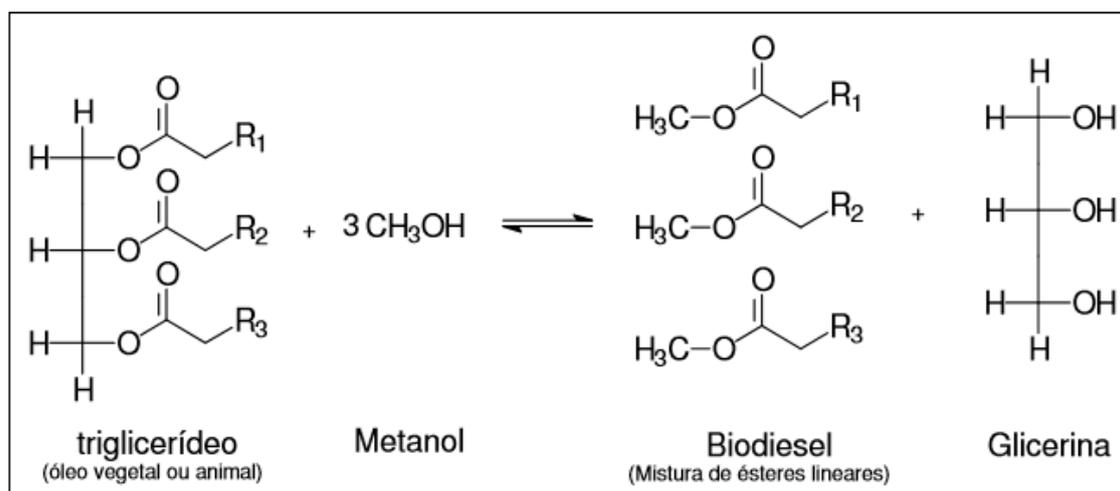


Figura 3 - Reação geral para transesterificação de triglicerídeos.
(Fonte: GERPEN, 2005).

Os alcoóis metanol e etanol são utilizados com maior frequência, para o processo de transesterificação. O metanol é o mais utilizado na obtenção do biodiesel por possuir qualidades como, baixo custo, ser mais reativo, isento de água, possuir cadeia curta e maior polaridade, sendo mais solúvel na fase éster facilitando o processo de

separação do glicerol a partir do éster (SCHUCHARDT, SERCHELLI E VARGAS 1998).

A utilização do etanol no processo de produção do biodiesel possui vantagens como maior dissolução do óleo, além de número de cetano mais alto no biodiesel, melhorando a combustão nos motores de ciclo diesel (ENCINAR *et al.*, 2002) Do ponto de vista ambiental, a utilização do etanol pode ser atrativa, pois o mesmo é produzido a partir de fontes renováveis (SCHUCHARDT, SERCHELLI E VARGAS 1998).

A reação do triglicerídeo com o etanol, também chamada de etanólise, não sofre muita influência da temperatura, tendo maior dependência do tempo de reação. Um excesso de etanol pode colaborar para o deslocamento do equilíbrio, no entanto autores notaram que proporções molar superiores a 1:12 de óleo:etanol aumentam a solubilidade da glicerina, dificultando a separação de fases (KUCEK *et al.*, 2007 ; ENCINAR *et al.*, 2002). Já a metanólise, reação do triglicerídeo com o metanol, depende da temperatura para o aumento da produção de ésteres, sendo que estudos mostram que 60 °C é a temperatura ótima e altos rendimentos são encontrados em uma proporção molar de 1:6 de óleo:álcool.

O processo mais utilizado pela indústria para obtenção do biodiesel é a transesterificação metálica com catalisador alcalino homogêneo, isso se deve a sua rápida velocidade de reação, quando comparado, com catalisador ácido (BHANGU *et al.*, 2017). Este por sua vez, possui vários inconvenientes, tais como reação de saponificação, devido à presença de ácidos graxos livres, desta forma diminuindo o rendimento ou inibindo a transesterificação, além da difícil recuperação do glicerol (CORDEIRO *et al.*, 2011, RAMOS *et al.*, 2011 e BHANGU *et al.*, 2017).

A transesterificação com catalisador em meio ácido homogêneo, representada na Figura 5, quando comparado com catalisador em meio alcalino, tem vantagem no que diz respeito à possibilidade de ácidos graxos livres no meio, tornando possível a utilização de uma matéria prima de baixo custo. A desvantagem, no entanto é a necessidade de condições como, elevada razão molar e temperatura (RAMOS *et al.*, 2011).

Segundo Schuchardt, Serchelli e Vargas (1998), a catálise ácida possui um rendimento, em torno de 4.000 vezes menor quando comparado com a catálise básica, isso ocorre devido à força do ataque nucleofílico do íon alcóxido ser muito maior que a do álcool propriamente dito, necessitando de temperaturas elevadas e maiores tempos de reação.

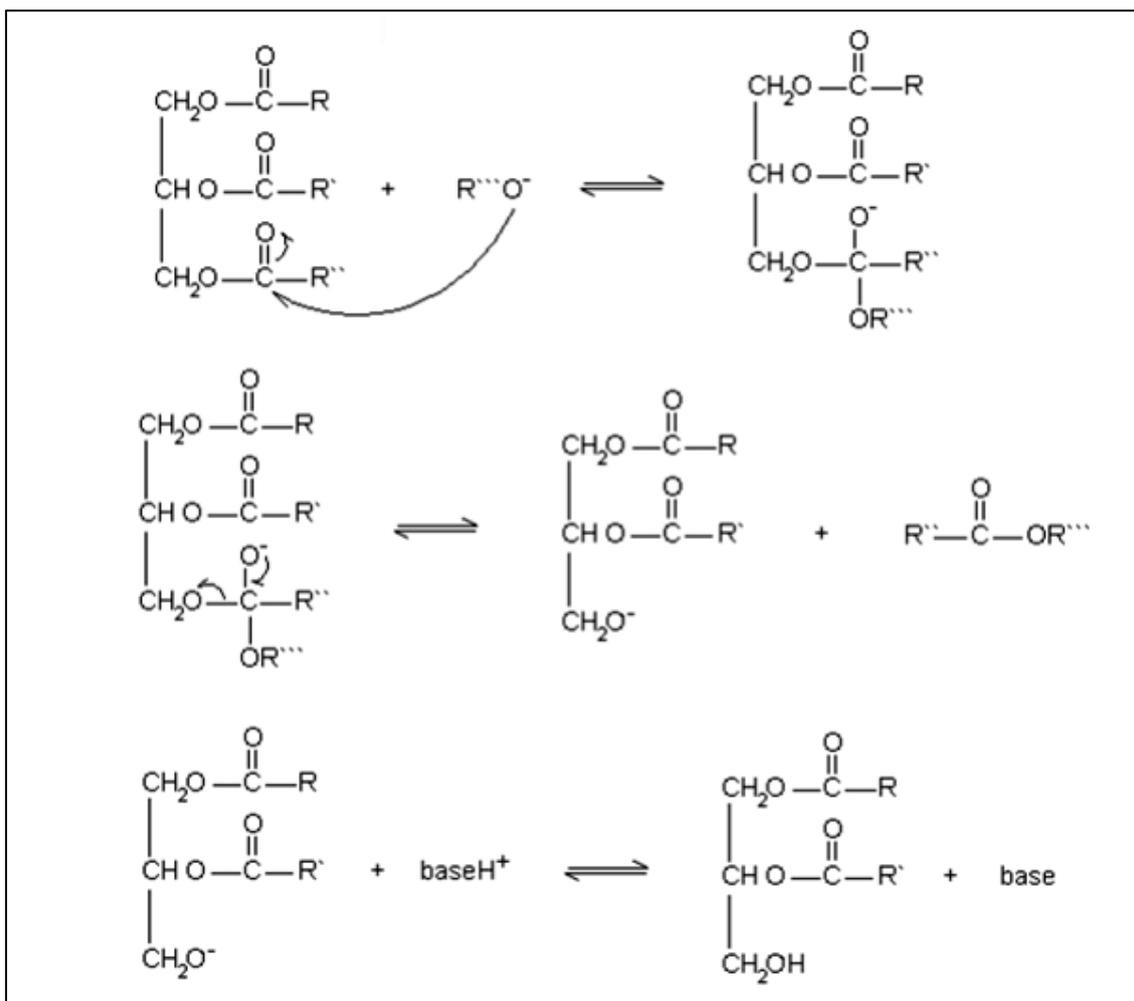


Figura 4 - Mecanismo de transesterificação alcalina de óleos vegetais.
(Fonte: Adaptado de SOLOMONS e FRYHLE, 2000; RAMOS et al., 2011).

Catalisadores heterogêneos estão sendo estudados por possuírem vantagens tais como simplificação na recuperação do glicerol, facilidade na purificação dos monoésteres, reutilização do catalisador no processo além de serem ambientalmente menos poluidores, pois geram menos resíduos (RAMOS *et al.*, 2011).

Existe ainda a transesterificação por catálise enzimática, que é uma forma de reação para obtenção do biodiesel que vem sendo amplamente estudada e tem vantagens tais como, transesterificação com elevado teor de ácidos graxos livres, fácil recuperação do glicerol devido a maior qualidade, utilização de baixas temperaturas (30 °C a 50 °C) e menor geração de efluentes quando comparada com outros procedimentos, como catalise alcalina e ácida (BHANGU *et al.*, 2017 e CHOONG *et al.*, 2016).

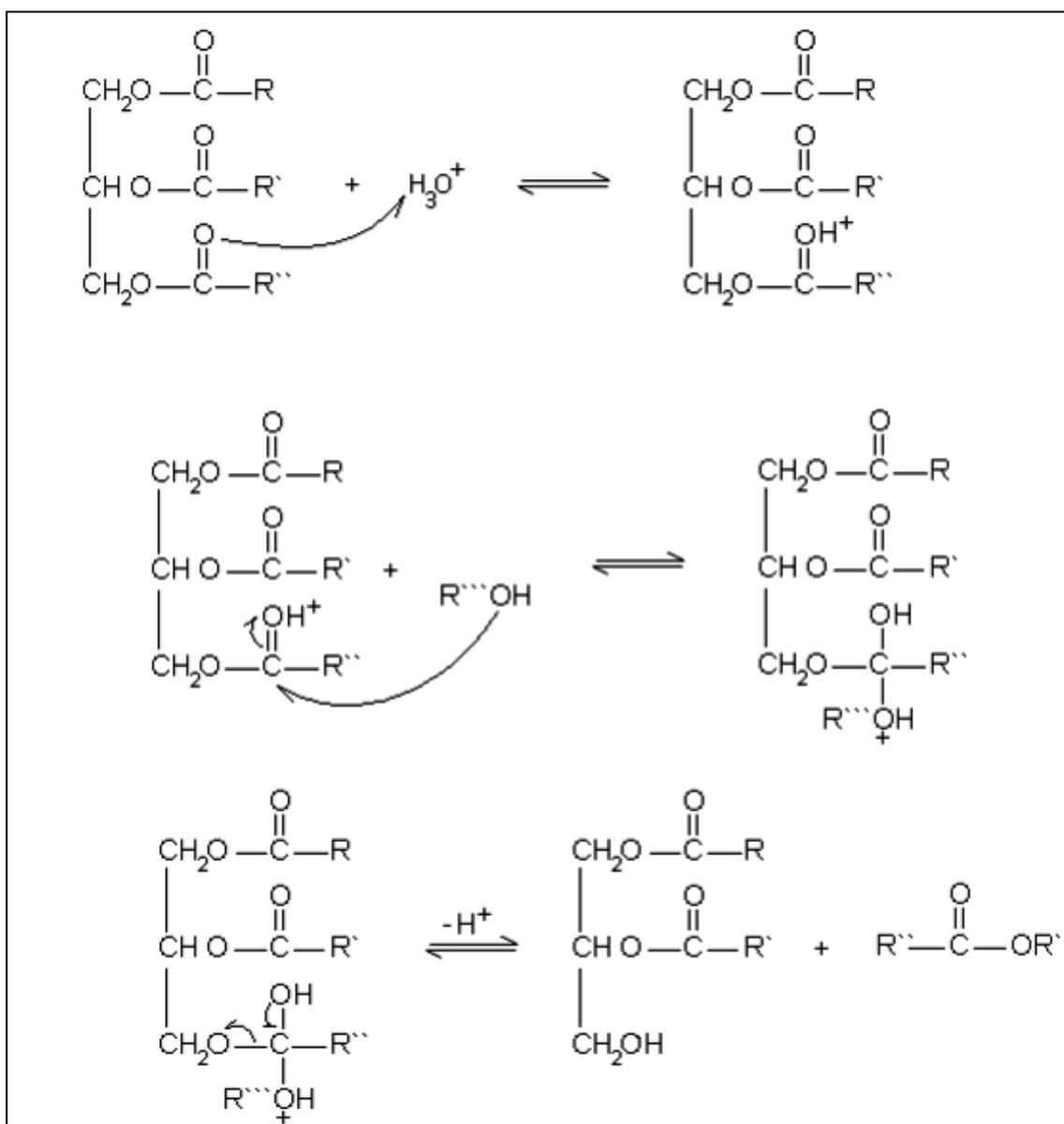


Figura 5 - Mecanismo de transesterificação ácida de óleos vegetais.
(Fonte: SOLOMONS e FRYHLE, 2000; RAMOS *et al.*, 2011).

3.4 Estabilidade Oxidativa

O processo de transesterificação, como dito anteriormente, transforma a matéria-prima, tais como óleos vegetais e/ou animais em biodiesel, este é composto por ésteres monoalquílicos de ácidos graxos os quais possuem insaturações (YAAKOB *et al.*, 2014), e quanto maior o nível de insaturações em um éster alquílico, mais susceptível será à oxidação (BOTELLA *et al.*, 2014), pois as ligações duplas presentes ali possuem alta

reatividade com o oxigênio (YAAKOB *et al.*, 2014; SUPRIYONO *et al.*, 2015). No entanto a estabilidade do biodiesel não depende apenas da composição de ácidos graxos, mas também de fatores externos tais como o processo de produção e as condições de armazenamento (ZHOU *et al.*, 2016, DANTAS *et al.*, 2011; KNOTHE, 2005).

Durante a oxidação no biodiesel, ocorrem quebras dos compostos ali presentes em compostos indesejáveis, entre eles estão os aldeídos e ésteres de cadeia curta, que diminuem a qualidade do biocombustível, podendo causar danos aos motores dos veículos (SALUJA *et al.*; 2016).

A instabilidade pode ocorrer pela oxidação dos ácidos graxos na presença de oxigênio, decomposição térmica, hidrólise, entre outros (YAAKOB *et al.*, 2014). A resistência do biodiesel a oxidação é uma preocupação tanto para quem produz quanto para quem distribuiu e utiliza o mesmo (ZHOU *et al.*, 2016). Por isso há necessidade de novos estudos que busquem melhorar tais fatores que inibam a oxidação (SUPRIYONO *et al.*, 2015).

A completa inibição da oxidação do biodiesel não pode ser revertida ou evitada, no entanto existem métodos que superam o problema da oxidação, pois retardam de forma significativa as reações de oxidação, com a utilização de inibidores dos produtos oxidativos. Tais inibidores são chamados de antioxidantes (SUPRIYONO *et al.*; 2015).

3.4.1 Método Rancimat

A norma europeia EN 14112 propõe o método Rancimat para determinação da estabilidade oxidativa do biodiesel, óleos e gorduras de origem animal e vegetal. (FOCKE; WESTHUIZEN; OOSTHUYSEN, 2016). Este método é um teste de oxidação acelerado que estabelece um limite inferior a 6 horas como o período mínimo de indução Rancimat (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Neste procedimento, a autooxidação é acelerada passando um fluxo constante de ar através da amostra de biodiesel enquanto controla a temperatura a um nível elevado (100 a 140 °C), em seguida borbulha em água deionizada, arrastando os ácidos carboxílicos voláteis (principalmente ácido fórmico), gerados do processo de oxidação, que se solubilizam, aumentando a condutividade elétrica da água (JAIN; SHARMA,

2010; FOCKE; WESTHUIZEN; OOSTHUYSEN, 2016). A formação de produtos provenientes do processo oxidativo gera um aumento súbito na condutividade, que é detectada por um eletrodo ligado a um dispositivo de medição, sendo o tempo de indução da amostra diretamente proporcional ao aumento da sua condutividade (JAIN; SHARMA, 2010; FOCKE; WESTHUIZEN; OOSTHUYSEN, 2016). A Figura 6 mostra o princípio da determinação do tempo de indução utilizando este método e os seus componentes.

Quando a condutividade da solução é registrada continuamente, uma curva de oxidação é obtida, cujo ponto de inflexão, conhecido como IP, pode ser calculado através do ponto de intersecção de duas tangentes (JAIN; SHARMA, 2010).

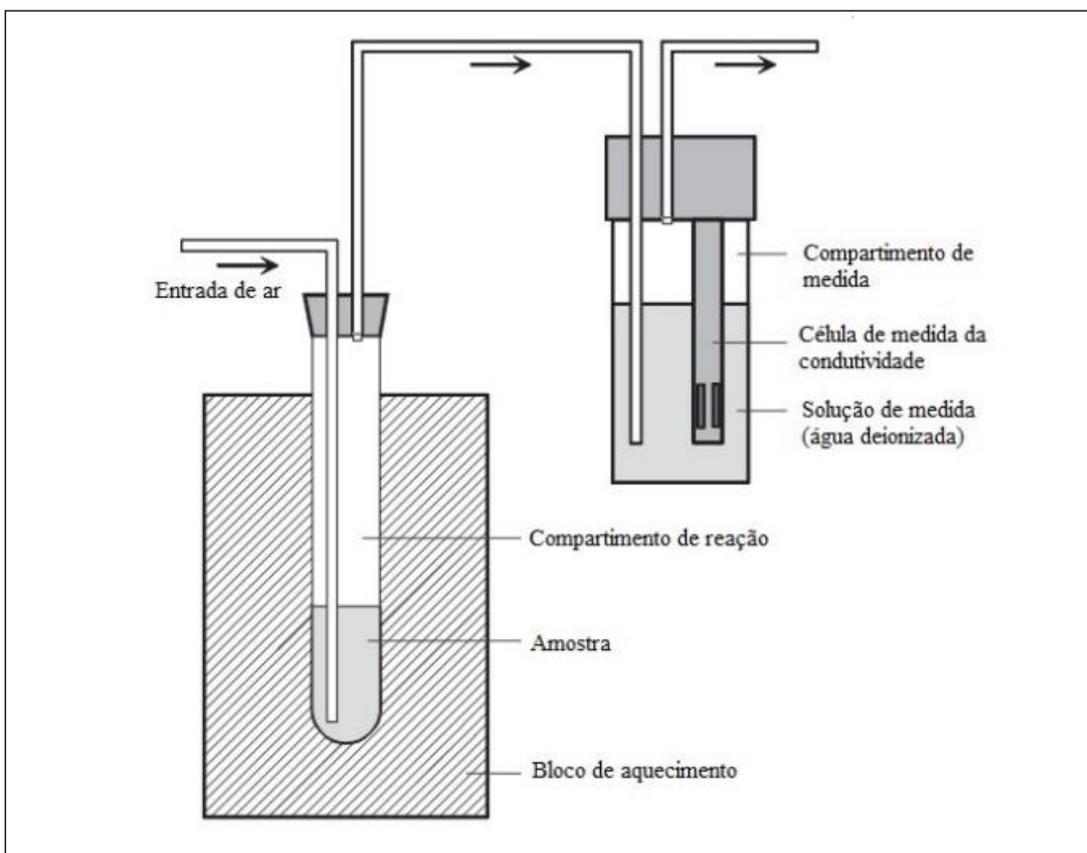


Figura 6 - Princípio de funcionamento de equipamento rancimat e seus componentes.

(Fonte: JAIN; SHARMA, 2010).

3.4.1.1 Parâmetros Cinéticos da oxidação do Biodiesel

A cinética de reação estuda a velocidade de reação, os fatores que influenciam, e seus mecanismos. A velocidade de uma reação pode ser descrita pelo aumento da concentração molar do produto (ou decréscimo dos reagentes) em um determinado período de tempo (dt), conforme Equação 1:



Onde:

A e B = Reagentes e C = Produto

Assim:

$$Velocidade = - \frac{d[R]}{dt} \text{ ou } \frac{d[P]}{dt} \quad (1)$$

Onde:

[R] = Concentração de Reagentes;

[P] = Concentração de Produtos;

A partir dos dados obtidos do ponto de indução PI nas diferentes temperaturas, é possível determinar os valores das constantes de velocidade (k), utilizando o coeficiente angular da reta dos dados ajustados do tempo em horas (t) *versus* o logaritmo neperiano da condutividade elétrica ($\ln \Lambda$) (Equação 2). A condutividade elétrica é considerada até o ponto de inflexão para cada ensaio nas diferentes temperaturas, observando uma cinética de primeira ordem (BALL, 2006; GALVAN *et al.*, 2014).

$$\ln \Lambda = \ln \Lambda_0 - k \cdot t \quad (2)$$

A energia de ativação (E_a) é determinada pela Equação (3), a partir dos dados ajustados do inverso da temperatura (1/T) em Kelvin *versus* o logaritmo neperiano da constante de velocidade ($\ln k$), no qual k é a constante de velocidade, A representa o fator pré-exponencial, R representa a constante dos gases ideais com valor de 8,314510 J K⁻¹ mol⁻¹, T representa a temperatura em Kelvin e E_a representa a Energia de ativação em kJ mol⁻¹ (BALL 2006; GALVAN *et al.*, 2014).

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

Porém, há reações que apresentam desvios da equação de Arrhenius, em que o melhor ajuste dos dados é obtido utilizando um modelo polinomial de segunda ordem. Para os casos que foram observados desvios da equação de Arrhenius os cálculos da energia de ativação aparente (E_{aa}) são realizados utilizando as equações 4 e 5 (CHENDYNSKI *et al.*, 2017; AQUILANTI *et al.*, 2017).

$$\ln k(T) = \ln A + \frac{B}{RT} + \frac{C}{(RT)^2} \quad (4)$$

$$E_{aa} = \delta \ln k / \delta \left(\frac{1}{RT} \right) = -B - \frac{2C}{RT} \quad (5)$$

3.4.1.2 Parâmetros Termodinâmicos da oxidação do Biodiesel

A determinação da estabilidade oxidativa pelo método Rancimat, permite avaliar os parâmetros termodinâmicos como entalpia (ΔH^\ddagger), entropia (ΔS^\ddagger) e energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger) no estado ativado para a reação de oxidação do biodiesel (CHENDYNSKI *et al.*, 2017). Esses parâmetros podem ser utilizados para entender a maneira de forma mais precisa os fatores que interferem na reação de oxidação além de avaliar a eficiência de antioxidantes (SPACINO *et al.*, 2015).

Os valores de Entalpia (ΔH^\ddagger) e Entropia (ΔS^\ddagger) do Estado Ativado foram determinados utilizando a Equação de Eyring (Equação 6) por meio do ajuste não-linear dos dados de $\ln k/T$ vs $1/T$ (ANGILELLI *et al.*, 2017a).

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{\ln K_B}{h} + \left(\frac{S^\ddagger}{R} \right) - \left(\frac{H^\ddagger}{R} \right) \frac{1}{T} \quad (6)$$

Na qual k_B é a constante de Boltzmann cujo valor é $1,380658 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ e h é a constante de Planck $6,6260755 \times 10^{-34} \text{ J.s}$.

O parâmetro termodinâmico Energia Livre de Gibbs média (ΔG^\ddagger) no estado ativado, é determinada pela Equação (7), que apresenta relação entre a Entalpia (ΔH^\ddagger), a temperatura em Kelvin (T) e a Entropia (ΔS^\ddagger).

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger \quad (7)$$

3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria exploratória diferencial (DSC), pertence à família de análise térmica, permite determinar, com precisão, as temperaturas e as energias absorvidas num processo físico ou químico. Avaliando os comportamentos de oxidação térmica por meio de gravação precisa do fluxo de calor para dentro e para fora de uma amostra. O fluxo de calor é relatado como uma função do tempo ou temperatura, representado graficamente nos termogramas de DSC, nos quais cada pico é associado com um processo físico ou químico específico (VECCHIO CIPRIOTI; CHIAVARO, 2014).

Raemy *et al.*, (1987) foi um dos primeiros a estudar a oxidação de ésteres metílicos de ácidos graxos utilizando DSC convencional, e relatou que o aumento da temperatura ou o grau de insaturação dos ésteres, diminuiu o período de indução medido. Desta forma, esta técnica é considerada muito eficiente para monitorar reações de oxidação dos biodieseis. A partir dos anos noventa, passou-se a utilizar a pressão no equipamento de DSC, sendo chamado de P-DSC, e verificou-se que o seu potencial pôde ser ainda mais explorado (TAVARES, 2011).

O Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC) é um equipamento que quantifica a energia envolvida nas reações entre a amostra e a referência, em função da temperatura, a partir de um sistema submetido a um programa de temperatura controlada. O gráfico gerado na análise DSC mostra as mudanças de temperatura na amostra, tais mudanças indicam mudanças de fase, reação de desidratação, reações de dissociação ou decomposição, reação de oxidação, redução ou outras reações químicas que ocorreram durante a análise (TAVARES, 2011).

O método de análise pode ser realizado de forma isotérmica, onde é possível detectar o tempo necessário (tempo de indução) para detectar uma reação exotérmica na amostra. Todavia, o método não-isotérmico, é possível verificar a temperatura em que ocorre um pico exotérmico, e detectar a temperatura de oxidação (OT). A variação dessa temperatura de oxidação pode ser usada para legitimar a estabilidade oxidativa do biodiesel (JAIN; SHARMA, 2010).

3.5 Antioxidantes

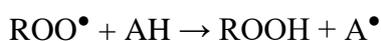
Antioxidantes são substâncias que impedem a oxidação de outros compostos, inibindo ou retardando o processo oxidativo (EMBUSCADO, 2015). Têm como função diminuir a taxa de oxidação (ZHOU *et al.*, 2016), melhorando a estabilidade oxidativa através da remoção de radicais livres formados durante a fase inicial da oxidação, parando a reação em cadeia (FOCKE *et al.*, 2012).

Os antioxidantes são utilizados nas mais diversas indústrias, tais como, petroquímicos, combustíveis, lubrificante, alimentos e produtos farmacêuticos (DANTAS *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2014). No Biodiesel, os antioxidantes são utilizados para alterar e prevenir a oxidação sem alterar as propriedades do combustível (RASHED *et al.*, 2016) e para satisfazer os requisitos de estabilidade à oxidação estabelecidos nas normas (ZHOU *et al.*, 2017), segundo a resolução ANP nº 45, de 2014, a estabilidade à oxidação a 110 °C deve ser de 8 horas (ANP, 2014). Ainda, estudos mostram que a adição de antioxidantes além de melhorar a estabilidade do biodiesel também reduz, na combustão, a emissão de NO_x (ZHOU *et al.*, 2016).

3.5.1 Classificação dos antioxidantes

Os antioxidantes, quimicamente, são compostos aromáticos com uma ou mais hidroxilas. Podem ser classificados em primários ou secundários, dependendo do mecanismo de ação (DEL RÉ; JORGE, 2012; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes **primários** são compostos fenólicos (ZULETA *et al.*, 2012; SALUJA *et al.*, 2016) que, por meio da doação de átomos de hidrogênio, são capazes de interromper a cadeia de radicais, promovendo a remoção ou a inativação dos radicais livres (ROO• e R•), formando um radical inerte (A•), espécie esta inativa na reação, encerrando a reação em cadeia, como representado a seguir (ADEGOKE *et al.*, 1998).



Dentre os antioxidantes primários, destacam-se os sintéticos, entre eles os mais conhecidos são butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG), e os tocoferóis, sendo estes classificados como naturais (RASHED *et al.*, 2016 e ZHOU *et al.*, 2016).

Os antioxidantes **secundários**, com função de formar espécies não radicais ou desativar o oxigênio, atuam na complexação com metais, no sequestro de oxigênio e na decomposição de hidroperóxidos. As quinonas, tais como ubiquinona e A-tocoferolquinona, são exemplos de antioxidantes secundários (DECKER, 2002; DEL RÉ; JORGE, 2010; ZULETA *et al.*, 2012).

Segundo Ramalho e Jorge (2006), os antioxidantes **sinergistas** são aqueles que possuem pouca atividade antioxidante, mas podem ser utilizados em combinação adequada para aumentar a atividade dos antioxidantes primários. O ácido ascórbico pode atuar como sinergista na regeneração de antioxidantes primários ou como antioxidantes removedores de oxigênio, sendo estas substâncias que atuam capturando o oxigênio que está presente no meio reacional, por meio de reações químicas tornando-as estáveis, e desta forma impedindo a auto oxidação.

Os antioxidantes **biológicos** nada mais são, do que enzimas que atuam removendo o oxigênio ou compostos altamente reativos dos sistemas alimentícios, entre essas enzimas estão a glucose oxidase e catalases (BAILEY, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006). Os **agentes quelantes**, também chamados de agentes sequestrantes, através de um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular complexam íons metálicos, que catalisam a oxidação lipídica. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (BAILEY, 1996).

Por fim, os **antioxidantes mistos** abrangem os compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico), além de extratos de plantas (BAILEY, 1996).

3.5.2 Antioxidantes Sintéticos e Naturais

Os antioxidantes podem ser classificados, quanto a sua origem, como sintéticos ou naturais, os primeiros são preferidos quando comparados com os naturais devido a sua maior eficiência (ZHOU *et al.*; 2016). No entanto hoje existem vários estudos que buscam a utilização de antioxidantes naturais como substitutos dos sintéticos.

A utilização dos antioxidantes sintéticos iniciou-se na década de 40. Entre os mais utilizados na indústria alimentícia estão obutil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), ambos derivados do petróleo, terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e o galato de propila (PG) (SOUZA *et al.*, 2007; RAMALHO; JORGE, 2006), representados na Figura 7. Estudos demonstram que estes antioxidantes possivelmente apresentam alguns efeitos tóxicos (SOUZA *et al.*, 2007).

A estrutura fenólica destes compostos antioxidantes permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando a molécula e interrompendo o mecanismo de oxidação.

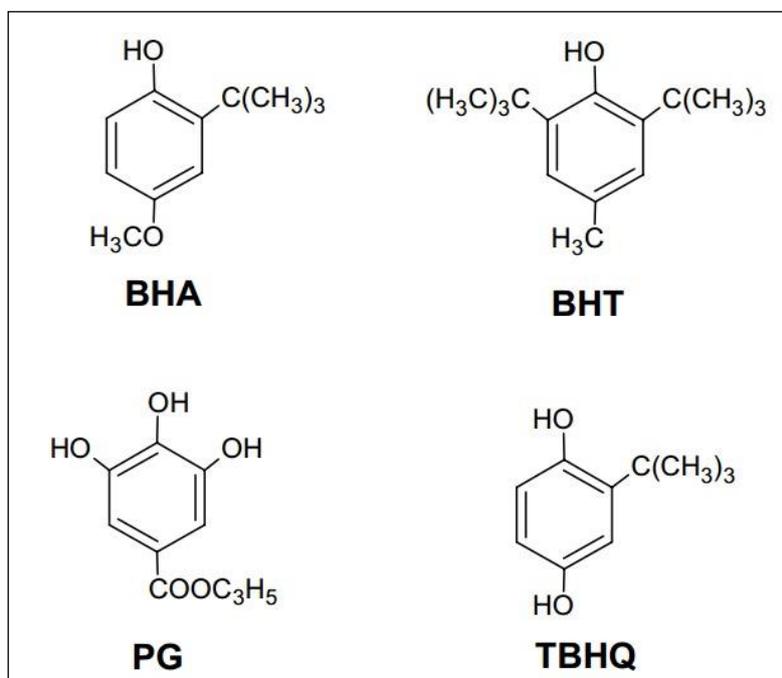


Figura 7 - Estrutura Química dos principais antioxidantes sintéticos.
(Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006).

O BHA e o BHT são os mais utilizados na indústria alimentícia o BHA age sequestrando radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista de radicais BHAOs antioxidantes TBHQ e o BHT são utilizados no biodiesel para retardar os efeitos da oxidação do mesmo nas propriedades como, viscosidade, acidez e índice de peróxido (DUNN, 2005). O BHA e o PG aumentam a resistência à oxidação de óleos vegetais.

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas. Ervas e especiarias como orégano, alecrim, coentro, salsa, sálvia, tomilho e manjeriço têm sido estudados por possuírem compostos fenólicos e poderes antioxidantes

(WETTASINGHE, SHAHIDI; 1999). Sendo alguns desses, utilizadas como conservantes naturais para alguns alimentos (ZHENG; WANG, 2001).

É possível encontrar na literatura propriedades antioxidantes em diversas plantas, Oliveira *et al.*, (2009) e Nivetha e Roy (2014) mostram que o chá verde é uma Fonte rica em polifenóis, e a romã possui teor significativo de flavonóides, tendo ambas com potencial antioxidante. Ainda Spacino, *et al.*, (2015) analisou o potencial de estabilidade oxidativa de extratos, livre de álcool, de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L), obtendo resultados positivos. O endro (*Anethum graveolens* L.), por sua vez, possui estudos que mostra seu potencial como antioxidante (NAJARAN *et al.*, 2016; SHYU *et al.*, 2009) no entanto não foi testado em biodiesel.

Apesar dos antioxidantes sintéticos serem frequentemente mais eficazes do que os naturais (KNOTHE, 2007; ZULETA, 2012). Muitos estudos são voltados à descoberta de novos compostos naturais que possam substituir os sintéticos em sua eficiência como antioxidantes.

3.5.3 Compostos Fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos são moléculas orgânicas que apresentam uma ou mais hidroxilas, ligadas em ao menos um anel aromático (Figura 8). As substâncias fenólicas que estão presentes nas plantas, como frutos do metabolismo secundário das mesmas, são uma das mais abundantes e importantes substâncias que contribuem para propriedades antioxidantes (MOURE, 2001; NACZK *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos, segundo Decker (1998) ocorre pela interação preferencial com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio.

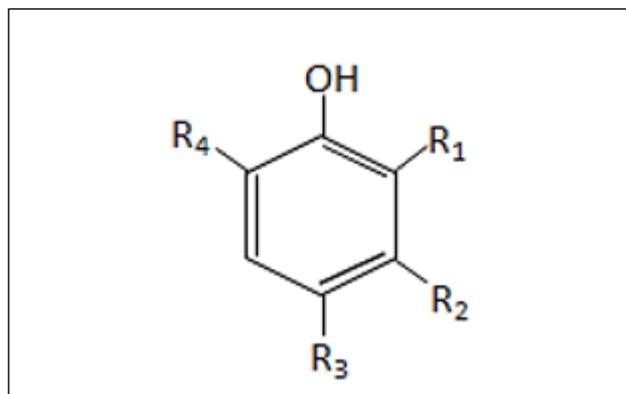


Figura 8 - Estrutura dos Compostos Fenólicos.
(Fonte: NACZK *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos podem ser encontradas na forma livre ou complexadas a açúcares e proteínas, podendo ser divididos em dois grandes grupos: os flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides, ou seja, os fenóis simples ou ácidos fenólicos (ácidos benzóicos, fenilacéticos, cinâmicos) e cumarinas (NACZK *et al.*, 2004).

Os flavonóides, representados na Figura 9, são potentes antioxidantes polifenólicos, que ocorrem na forma de glicídios, encontrados nas plantas, principalmente, nas folhas e flores (FERRERA *et al.*, 2016), nas frutas geralmente em menos concentrações (ANGELO; JORGE, 2007), sendo influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos. São compostos de baixa massa molecular, formada por 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆, sendo os compostos quimicamente mais diversificados do reino vegetal (SOARES, 2002; ANGELO; JORGE, 2007; FERRERA *et al.*, 2016),).

Os flavonóides, devido à presença de ligações duplas conjugadas na sua estrutura são responsáveis pela inibição de processos oxidativos, pois devido a presença de ligações duplas em suas estruturas permitem o deslocamento dos elétrons π e, em alguns flavonóides, o deslocamento também do grupo orto-hidroxi do anel β -catecol (RYAN *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2009).

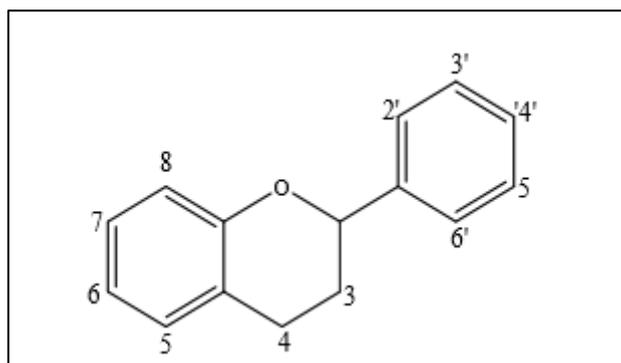


Figura 9 - Estrutura geral de um Flavonóide.
(Fonte: FERRARI, 2009).

Os compostos não-flavonóides, também chamado de fenóis simples, são classificados basicamente em ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos e cumarinas. Os ácidos hidroxibenzoicos são os compostos fenólicos mais representativos em termos de encontro e diversidade, possuem estruturas mais simples e seu representante mais comum é o ácido gálico. Os ácidos hidroxicinâmicos têm como seus maiores representantes os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (Figura 10) (ESCARPA, 2001).

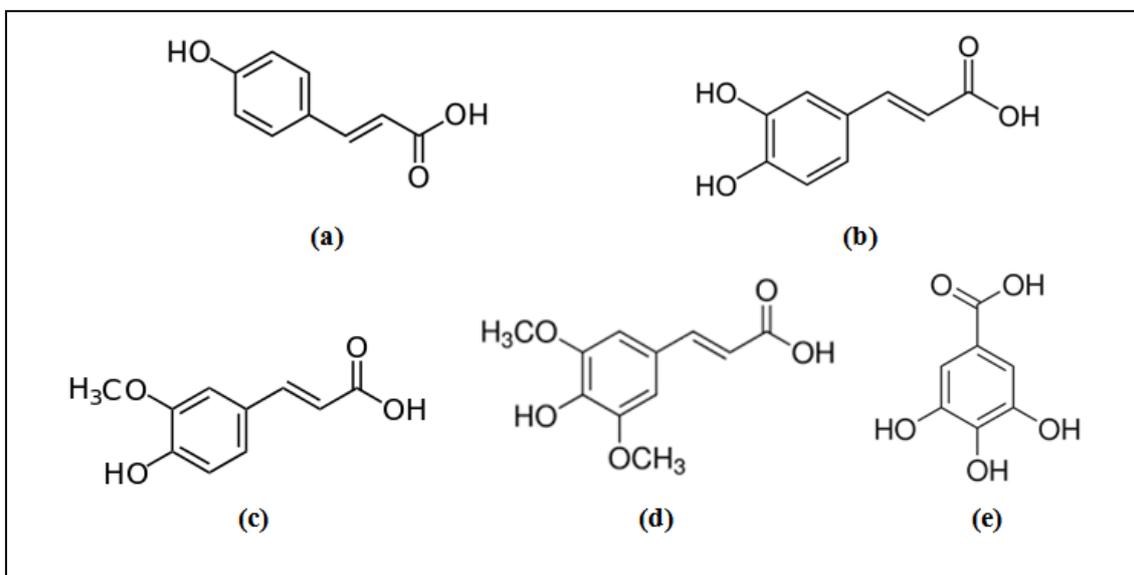


Figura 10 - Estrutura Química dos ácidos fenólicos. (a) Ácido *p*-cumárico (b) Ácido Caféico (c) Ácido Ferúlico (d) Ácido Sinápico (e) Ácido Gálico.
(Fonte: SOLOMONS e FRYHLE, 2000)

Estudos recentes vêm analisando os efeitos dos antioxidantes fenólicos na oxidação do biodiesel, pois apresentam como mecanismo de ação uma interação preferencial com o radical peróxido, pois este possui menor energia do que os outros radicais ali presentes, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio. Desta forma, nota-

se que este mecanismo de ação possui um papel importante na redução da oxidação lipídica (DECKER, 1998).

3.6 Extração de antioxidantes

Existem diversas metodologias para extração dos compostos antioxidantes, podendo ser classificados em métodos tradicionais de extração usando solventes orgânicos como etanol, metanol, hexano, acetona, éter e água, e o método de extração supercrítica em altas pressões e temperaturas o fluido entra no estado supercrítico e é utilizado como solvente na extração (REHMAN; HABIB; SHAH, 2004).

A extração desses compostos pode sofrer influência de diversos fatores, como a natureza da planta, o solvente a ser empregado, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (SHAHIDI; NACZK, 2003). No entanto, um processo de extração deve ser escolhido de acordo com o antioxidante que se deseja extrair, garantindo assim a eficiência do processo de extração. Polifenóis e outros antioxidantes podem ser extraídos com solventes, por extração fase sólida ou extração supercrítica (SCHWARZ *et al.*, 2001).

Os compostos encontrados em plantas possuem natureza química bastante heterogênea, pois os extratos são uma mistura de diferentes classes de fenóis (NACZK; SHAHIDI, 2004). Desta forma para um bom rendimento na extração é necessário compreender o tipo de interação que ocorre entre o solvente e o soluto, escolher de forma adequada o método de extração desses compostos e o solvente, para aumentar o rendimento da extração dos antioxidantes.

A solubilidade do composto em um determinado solvente é uma característica típica do fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento universal e aponta para a necessidade de seleção criteriosa do método de extração para cada fonte natural de antioxidante (CAETANO, 2009).

3.6.1 Extração convencional

A extração convencional é o método mais utilizados para extração de compostos de plantas. Baseia-se na extração com utilização de solvente orgânico e/ou água (PALLEROS, 1999). O procedimento a ser utilizado na extração convencional é determinado pela família de compostos a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo (TSAO; DENG, 2004). A solubilidade dos compostos a serem extraídos dependem diretamente da polaridade do solvente empregado na extração (CAETANO, 2009).

O método de extração convencional de forma contínua que, geralmente, é realizada em equipamento Soxhlet convencional demandando algumas horas para garantir completa extração (PALLEROS, 1999). Ou ainda, pelo método utilizando equipamento de extração de gordura, com temperatura relativamente elevada.

3.6.1.1 Extração Soxhlet

O extrator Soxhlet foi desenvolvido em 1879 e, por mais de um século, vem sendo considerada uma técnica padrão de extração (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). A extração por Soxhlet é um tipo de percolação cíclica, onde a amostra é submetida ao contato com solvente de extração, após a condensação, de forma que haja constante renovação do solvente durante toda a extração, o que facilita o equilíbrio da transferência (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

O sistema é mantido em uma temperatura superior a ambiente, e a mistura extrato solvente pode atingir uma temperatura superior à temperatura de ebulição do solvente, acarretando a perda de compostos termolábeis, no entanto extraindo compostos que se encontram nos poros da matriz sólida (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Podendo acarretar na formação de compostos chamados artefatos, envolvendo metabólitos secundários, durante reações químicas. Reações térmicas e as reações de solvólise são processos responsáveis pela formação de artefatos (PIZZOLATTI *et al.*, 2002).

Ainda, a elevada temperatura do solvente, a interação entre solvente/soluto e o ciclo do solvente passando pela amostra contribuem para a alta solubilização dos compostos da amostra vegetal, no entanto, levam o extrato a uma vasta variedade de compostos, sua seletividade depende do solvente utilizado (AGUIAR *et al.*, 2013).

A extração em Soxhlet possibilita extrair uma massa maior de amostra do que a maioria dos métodos mais recentes de extração, como extração com micro-ondas, ultrassom ou fluido supercrítico (LUQUE DE CASTRO; ARCA-AYUSO, 1998). No entanto se comparada a outras metodologias de extração de sólidos, a extração com Soxhlet possui desvantagens como longo tempo de extração (horas) e geração de resíduos de solventes no extrato, exigindo uma evaporação do mesmo (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

3.6.1.2 Extrator de óleos e gorduras - Goldfish

O método de extração com extrator de óleos e gorduras utiliza o equipamento chamado de Goldfish. Este equipamento permite que a amostra, envolvida em papel filtro, fique em contato com o solvente em um sistema de refluxo contínuo. É capaz de realizar a extração de várias amostras ao mesmo tempo, pois possui vários compartimentos acoplados. . A Figura 11 ilustra o equipamento Extrator de óleos e gorduras Goldfish.

O extrator de óleos e gorduras – Goldfish possui a vantagem de utilizar uma menor quantidade de solvente quando comparado ao método de Soxhlet além de ser mais rápido, pois a amostra fica em contato permanente com o solvente, ao passo que o contato direto pode ser uma desvantagem, tendo em vista que pode ocorrer a degradação de alguns compostos sensíveis a temperatura elevadas. O solvente após a evaporação passa pelo condensador e cai de forma contínua sobre a amostra

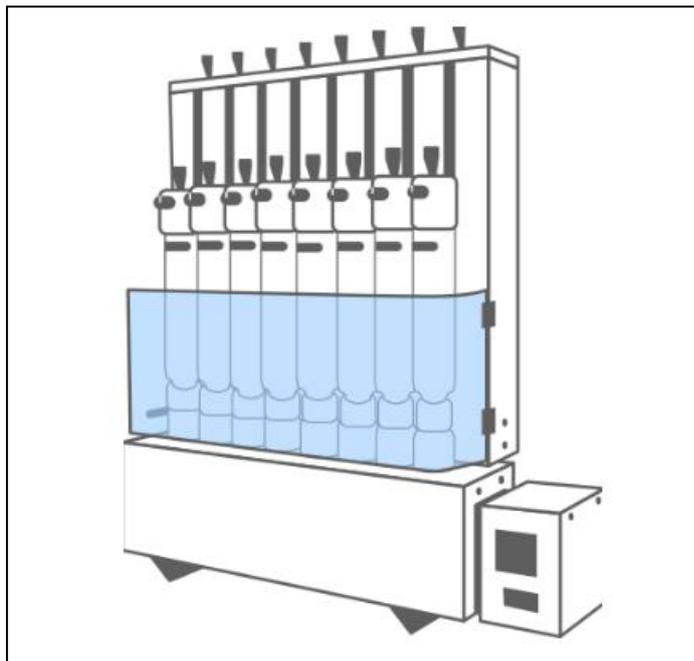


Figura 11- Ilustração do equipamento para extração de óleos e gorduras – Goldfish.
(Fonte: TECNAL)

3.7 Extração Supercrítica (ESC)

A extração supercrítica é uma tecnologia alternativa de extração e caracteriza-se por utilizar como solvente de extração um fluido em temperaturas e pressões próximas ao ponto crítico (DÍAZ-REINOSO, 2006). O ponto crítico é definido pela temperatura e pressão crítica e é único para cada substância. A temperatura crítica de um gás é aquela acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando o quanto se eleve a sua pressão. A pressão crítica é definida como a pressão de vapor correspondente a temperatura crítica (CALAME; STEINER, 1982; RIZVI, 1994; MUKHOPADHYAY, 2000).

Na extração supercrítica, o fluido supercrítico escoar por um leito fixo de partículas sólidas e dissolve os componentes que podem ser extraídos do sólido da matriz vegetal. O solvente é alimentado no extrator e difundido para o interior do leito fixo, de forma uniforme. Em seguida o solvente sai carregado do extrator, passa através de uma válvula de despressurização e devido à menor pressão, o extrato é liberado do meio gasoso e coletado (BRUNNER, 1994; REVERCHON; DE MARCO, 2006).

A extração com fluido supercrítico possui algumas características que favorecem o seu uso, pois é inerte, atóxico, e não inflamável, tornando-se uma alternativa interessante (POKORNY; KORCZAK, 2001; GANÁN; BRIGNOLE, 2011). Além de possuir vantagens sobre as técnicas convencionais de extração, pois, não utiliza solventes orgânicos poluentes eliminando a necessidade de evaporação do mesmo evitando a degradação térmica e decomposição de compostos voláteis (DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2011).

Segundo Recasens *et al.*, (1999) o processo de extração supercrítica depende da temperatura, pressão, densidade, tamanho de partícula, velocidade superficial do fluido e natureza do solvente. A seletividade pode ser controlada pela escolha do fluido e pelo controle dos parâmetros do processo (AGHEL *et al.*, 2004). A vazão do solvente, o tamanho da partícula do sólido e a duração do processo de extração, são os principais parâmetros da extração supercrítica (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Além disso, existem fatores determinantes do processo, como o poder de solubilização e seletividade do solvente com relação aos componentes de interesse e a capacidade de difusão destes no fluido (REVERCHON; ADAMI, CAPUTO, 2006). A solubilidade é propriedade muito importante no processo de extração, pois ela determina a quantidade máxima de soluto que pode ser solubilizada em determinadas condições (SANTOS, 2014)

A escolha do solvente para realização da extração supercrítica é fundamental para o bom desempenho do processo, pois o mesmo deve possuir características como, ser inerte e facilmente separado do produto, ter pressão e temperatura críticas amenas e não possuir custo muito elevado (REVERCHON; ADAMI, CAPUTO, 2006).

O fluido supercrítico é uma substância que foi pressurizada e aquecida de sua pressão e temperatura críticas (Figura 12), passando a ter propriedades entre um gás e um líquido (SANTOS, 2012), suas propriedades podem variar em ampla faixa através da mudança nas condições de temperatura e pressão. Os fluidos supercríticos têm as propriedades de difundir-se como um gás e dissolver outros materiais como líquidos (SANTOS, 2012).

3.7.1 CO₂ como fluido supercrítico

O dióxido de carbono (CO_2), por possuir características como baixo custo, abundância (VASAPOLLO *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2011) e por apresentar temperatura crítica de $31,10^\circ\text{C}$ e pressão crítica de $73,76$ bar, consideradas relativamente baixas (BRUNNER, 1994), é o solvente supercrítico mais empregado em ESC (VASAPOLLO *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2011).

Características como, baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão, miscibilidade com compostos orgânicos oxigenados e hidrocarbonetos de baixo peso molecular, boas propriedades de transporte, baixo gasto de energia para separação soluto-solvente e solubilização de grande número de compostos por possuir propriedades de solvatação no estado supercrítico melhores do que no estado líquido (FILIPPI, 1982).

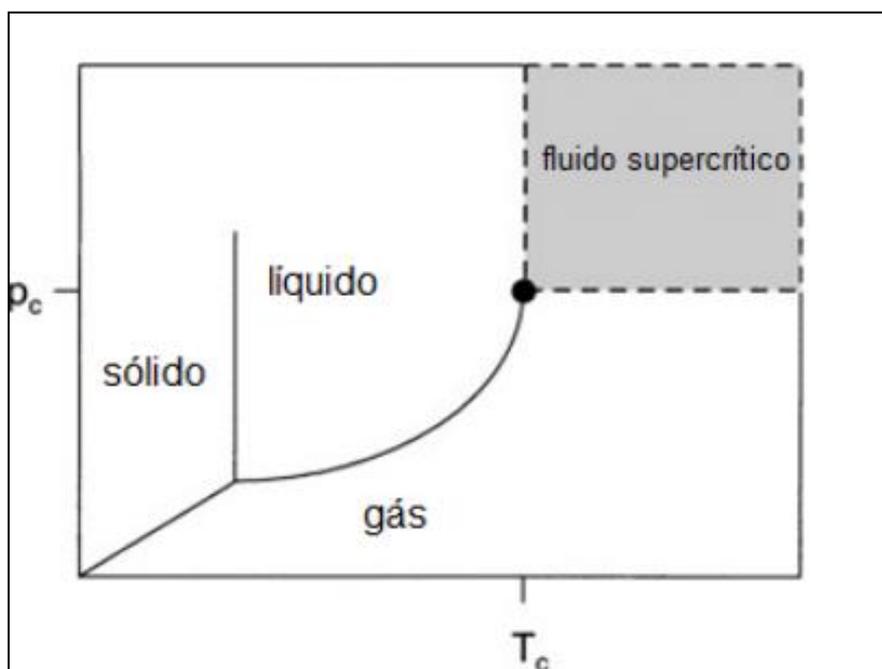


Figura 12 - Diagrama de fases (P_c – Pressão Crítica e T_c – Temperatura crítica)
(Fonte: KNEZ *et al.*, 2013).

Apesar de possuir grandes vantagens, o CO_2 , devido sua propriedade apolar, favorece a dissolução de compostos apolares como carotenóides e outros antioxidantes relativamente lipofílicos (TSAO; DENG, 2004), porém pode ser utilizado para extração de compostos polares desde que em altas pressões e/ou empregado cossolventes. (VASAPOLLO *et al.*, 2004 e SHI *et al.*, 2011).

3.7.2 Solubilidade do fluido Supercrítico

A solubilidade de um fluido supercrítico no equilíbrio apresenta a máxima concentração de soluto na fase solvente, é obtida experimentalmente a partir da inclinação da etapa de taxa constante de extração, sendo um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação (FERREIRA *et al.*, 1999). Como se trata de uma propriedade termodinâmica a solubilidade depende da pressão, temperatura, natureza e composição do solvente.

A seletividade na extração supercrítica pode ser determinada pelo ajuste de parâmetros com temperatura e pressão dentro da região supercrítica, desta forma, controlando a densidade do solvente e permitindo a obtenção de informações sobre qualidade e composição dos extratos (BRUNNER, 1994).

A solubilidade do soluto no fluido supercrítico pode ser controlada em função da densidade do solvente, pois a mesma pode ser alterada pela mudança de pressão ou temperatura de extração (AGHEL *et al.*, 2004). A densidade do CO₂ pode variar de aproximadamente 0,15 a 1,0 g/cm³ (ANGUS, 1976).

Desta forma, a uma temperatura constante, o aumento da pressão provoca um aumento na solubilidade do soluto, isso ocorre devido ao aumento da densidade do solvente e diminuição da pressão de vapor. Por outro lado, se aumentar a temperatura isobaricamente, ocorre diminuição da densidade do solvente e aumento da pressão de vapor do soluto. Esses efeitos resultam em inversão da isoterma de rendimento (CAMPOS *et al.*, 2005; MICHIELIN *et al.*, 2005; REVERCHON, DE MARCO, 2006;). A regra geral segundo Reverchon *et al.*, (2006) é “Quanto mais alta a pressão, maior é a solubilidade do soluto, conseqüentemente maior o rendimento da extração e menor é a seletividade”.

3.8 Modificador cossolvente

O uso de solventes modificadores na extração com fluido supercrítico vem sendo empregado para melhorar a eficiência da extração e modificando a seletividade do

processo. O solvente modificador pode alterar algumas características tais como polaridade, solubilidade e interações específicas com o soluto, formando ligações de hidrogênio ou interagindo com sítios ativos da matriz sólida (DALMOLIN *et al.*, 2010).

Segundo a literatura substâncias polares possuem baixa solubilidade em CO₂ supercrítico, desta forma o cossolvente pode ser selecionado de acordo com a força de interação do soluto-solvente, pois quanto maior a interação, maior a facilidade de extração (DALMOLIN *et al.*, 2010). A natureza do cossolvente depende da natureza do soluto a ser extraído (SOVOVÁ *et al.*, 1999)

Na escolha de um solvente para ser utilizado como modificador, deve-se levar em conta além de fatores referentes à eficiência do processo de extração, também características como a toxicidade, riscos a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade, o custo do solvente e suas propriedades físico-químicas (SAUCEAU *et al.*, 2004).

O etanol é um dos solventes mais utilizados como modificador na extração supercrítica, pois possuem características como as descritas acima, além de capacidade de interagir com compostos fenólicos afetando positivamente a extração (SERRA *et al.*, 2010). Alguns autores observaram que a solubilidade do extrato aumenta com a concentração de etanol, encontrando melhor rendimento da fração fenólica na extração (DALMOLIN *et al.*, 2010).

3.9 Estudo da Cinética de extração

A distribuição inicial do soluto no interior do substrato sólido é utilizada para descrever o modelo matemático apropriado no processo de extração supercrítica. Segundo Reverchon (1997), o soluto pode estar distribuído de diferentes formas, tais como, livres na superfície do material sólido, adsorvidas na superfície exterior, situadas dentro dos poros ou uniformemente distribuídas dentro das células vegetais.

Para definir o volume do extrator e a vazão do solvente, faz-se necessário o estudo das curvas de extração supercrítica e o conhecimento dos efeitos das variáveis operacionais (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

As curvas de extração expressas pela relação entre a massa acumulada de soluto obtido e massa de solvente, são obtidas através do método dinâmico de ESC, sendo

este, passagem contínua do solvente supercrítico (CO_2) pela matriz sólida. Segundo Ferreira *et al.* (1993), Sovová (1994), Ferreira *et al.* (1999) as curvas de extração são controlados por diferentes mecanismos de transferência de massa, são claramente divididas em três períodos ou etapas, representadas na Figura 13.

Vários modelos matemáticos são apresentados na literatura para descrever a extração com fluido supercrítico. Um modelo deve ser um instrumento matemático que reflete o comportamento físico da estrutura sólida e as observações experimentais (MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009).

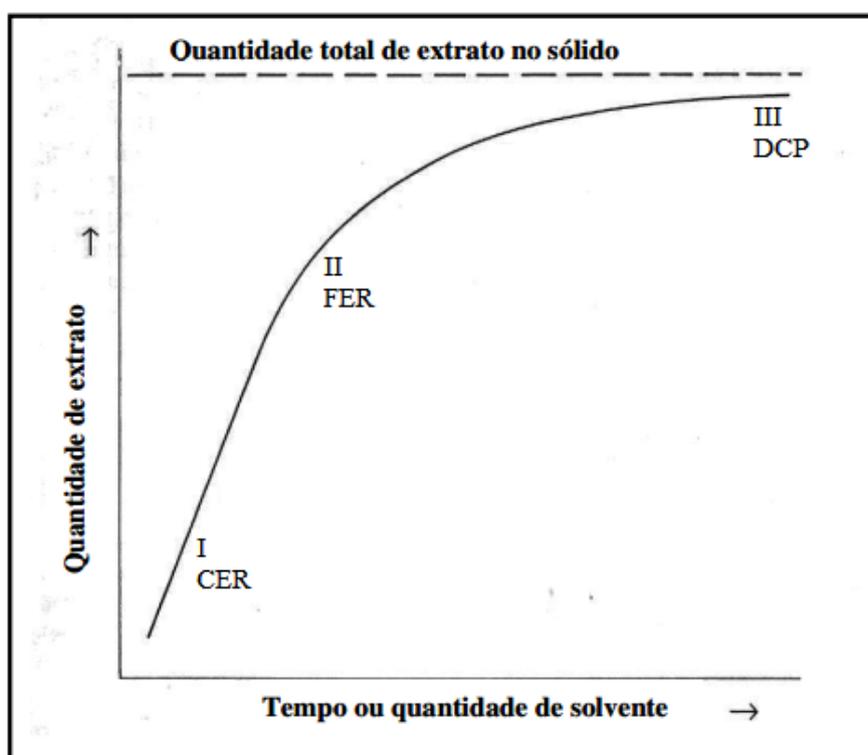


Figura 13 - Curva de extrato obtido por ESC em função do tempo de extração (I-CER) Período de taxa constante de extração, (II-FER) Período de taxa decrescente de extração e (III -DCP) Período de difusão controlada.
(Fonte: Adaptado BRUNNER, 1994).

Etapa I: A curva inicia-se com o período de taxa de extração constante (CER – Constant extraction rate): Devido à predominância de transferência de massa por convecção, a superfície externa das partículas está completamente coberta em óleo. Nessa fase há uma alta concentração inicial de extrato.

Etapa II: A taxa de extração começa a decrescer (FER – Falling extraction rate): As falhas do soluto na camada externa da superfície da matriz começam aparecer e então se inicia o processo de difusão combinado com a convecção. Nessa etapa, a concentração inicial de soluto na matriz sólida é baixa ou o soluto está inacessível ao solvente (BRUNNER, 1994).

Etapa III: Etapa difusional ou etapa de extração decrescente (DCP- Diffusion controlled period): Período de difusão controlada. Transferência de massa ocorre por difusão no interior das partículas da matriz sólida. Nessa etapa a taxa de extração é quase nula. A inclinação da curva diminui e o traçado se aproxima do valor que representa o conteúdo teórico de óleo extraível (SOVOVÁ, 1994).

3.10 Modelo Matemático da Extração Supercrítica

A modelagem matemática do processo de extração com fluido supercrítico envolve a análise das curvas de extração, permitindo que a determinação de alguns parâmetros cinéticos, experimentos em escala laboratorial, sejam aplicados no âmbito industrial (SANTOS, 2013). Assim, a principal vantagem da modelagem é a predição das curvas de extração (massa de soluto extraída *versus* tempo) num processo em larga escala, pois experimentos nesse nível são dispendiosos (MARTINEZ e MARTINEZ, 2008).

Existem três tipos de abordagem matemática utilizados para descrever processos de extração supercrítica, sendo: empírico, os baseados em analogia entre transferência de calor e o balanço de massa diferencial (REVERCHON; DE MARCO, 2006). Os modelos empíricos limitam as condições operacionais específicas, geralmente são construídos em função da concentração inicial de soluto na matriz e envolvem um parâmetro ajustável. Os resultados obtidos nesses modelos são descritos por expressões matemáticas simples, fornecendo soluções fáceis e rápidas (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014, MARTINEZ & MARTINEZ, 2008).

Modelos de balanço de massa consideram a existência de duas fases: uma sólida representada pela matriz vegetal e uma fluida representada pelo solvente supercrítico mais o extrato dissolvido nele (BRUNNER, 1994; SOUZA *et al.*, 2008). Nessa abordagem, o sistema de extração é considerado um leito cilíndrico formado por partículas de material vegetal dispostas de forma homogênea pelo qual o solvente flui

axialmente, solubilizando e arrastando compostos. Ocorrendo os fenômenos de transferência de massa por difusão na matriz sólida e na interface sólido-fluido, dispersão e convecção no fluido.

Considerando que o comprimento do cilindro é bem maior que o diâmetro e a velocidade do CO₂ flui na direção axial, desprezando transferências em direções radiais e tangenciais e a existência de reações química, o balanço de massa para as duas fases do sistema é dado pelas equações 8 e 9.

Para fase fluida:

$$\underbrace{\frac{\partial Y}{\partial t}}_{\text{Acúmulo}} + \underbrace{\frac{\partial Y}{\partial h}}_{\text{Convecção}} = \underbrace{\frac{\partial}{\partial h} \left(D_{AY} \frac{\partial Y}{\partial h} \right)}_{\text{Dispersão}} + \underbrace{\frac{J(X,Y)}{\rho_F}}_{\text{T.M. Interfacial}} \quad (8)$$

Para a fase sólida:

$$\underbrace{\frac{\partial X}{\partial t}}_{\text{Acúmulo}} = \underbrace{\frac{\partial}{\partial h} \left(D_{AX} \frac{\partial X}{\partial h} \right)}_{\text{Difusão}} - \underbrace{\frac{J(X,Y)}{(1-\varepsilon)\rho_s}}_{\text{T.M. Interfacial}} \quad (9)$$

Em que:

ε : Porosidade do leito (adimensional);

ρ_F : Densidade do fluido (Kg m⁻³);

ρ_s : Densidade do sólido (matéria-prima) (Kg m⁻³);

u : Velocidade superficial do fluido (m s⁻¹);

h : coordenada axial (m);

t : Tempo (s);

Y : Razão entre massa de soluto e massa de solvente (kg_{óleo} kg_{solvente}⁻¹);

X : Razão entre massa de soluto e massa de sólido (kg_{óleo} kg_{sólido}⁻¹);

$J(X,Y)$: Taxa de transferência de massa (Kg m⁻³ s⁻¹);

D_{AY} : Coeficiente de dispersão na fase fluida (m² s⁻¹);

D_{AX} : Coeficiente de dispersão na fase sólida (m² s⁻¹);

Essas equações servem como base para aplicação de modelos específicos que, a partir da sua resolução, juntamente com a Equação (10) fornecem curvas com perfis de massa de soluto extraído em função do tempo.

$$m(t) = \int_0^t T(h = H, t) m_F dt \quad (10)$$

Sendo:

m_F : Vazão mássica de fluído ($M T^{-1}$)

Na literatura, há diversos modelos matemáticos de extração supercrítica em leito fixo que se baseiam na resolução dos balanços de massa fase sólida e fluída (LEE *et al.*, 1986; REVERCHON *et al.*, 1997; SOVOVÁ, 1994). O modelo de SOVOVÁ (1994) é considerado um modelo geral para processos de extração supercrítica de óleos em matrizes vegetais, ambos serão descritos nesse trabalho.

3.10.1 Modelo de Sovová (1994)

O modelo de Sovová é utilizado por diversos autores para descrever o processo de extração supercrítica. Segundo Biscaia (2007), Brum (2010), Benelli (2010), Aguiar (2013) descreve-se abaixo o modelo de Sovová.

O modelo proposto baseia-se em balanços de massa no leito de extração, que considera o escoamento axial do solvente (CO_2) através do leito fixo de seção transversal cilíndrica. O solvente está livre de soluto na entrada do leito e com temperatura e pressão constantes. O leito é considerado homogêneo no que diz respeito ao tamanho das partículas e a distribuição do soluto no interior do sólido. O soluto é protegido pela parede celular, sendo essa quebrada pelo processo de moagem, aumentando a superfície de contato entre o soluto e solvente. O leito é considerado homogêneo em relação ao tamanho das partículas e à distribuição inicial de soluto. Assim pela Equação (11), temos a massa de soluto contida inicialmente na fase sólida (O) é a soma da massa de soluto de fácil acesso (P), que se concentra na superfície do sólido, com a massa de soluto de difícil acesso (K), localizada no interior do sólido (K).

$$O = P + K \quad (11)$$

A massa de inerte (m_s) não se altera durante a extração e a concentração de soluto na fase sólida é relacionada pela Equação (12):

$$\frac{O}{m_s} = \frac{P}{m_s} + \frac{K}{m_s} = X_O = X_P + X_K \quad (12)$$

O balanço material para o processo é representado pelas Equações 13 e 14 associadas às fases sólida e líquida, respectivamente.

Fase sólida:

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial X}{\partial t} = J(X, Y) \quad (13)$$

Fase fluída:

$$\rho_F \varepsilon \frac{\partial X}{\partial t} + \rho_F u \frac{\partial Y}{\partial h} = J(X, Y) \quad (14)$$

Nas Equações 13 e 14, Sovová (1994) negligencia os termos de transferência de massa por dispersão em ambas as fases, sólida e fluída, existentes nas Equações 8 e 9. Ainda, Sovová (1994) considera que o primeiro termo na Equação (8) pode ser desprezado, quando comparado à transferência de massa por convecção. Assim, as equações de balanço de massa para as fases sólida e líquida são dadas pelas equações (15) e (16).

Fase sólida:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = - \frac{J(X, Y)}{\rho_s(1 - \varepsilon)} \quad (15)$$

Fase fluída:

$$u \frac{\partial Y}{\partial h} = \frac{J(X, Y)}{\rho_F} \quad (16)$$

Dependendo da localização do soluto na matriz vegetal, a transferência de massa $J(X, Y)$ pode ser representada pela Equação (17), que representa a extração do soluto nas superfícies das células X_p , em que a resistência à transferência de massa é a

difusão no filme externo. A Equação (18) esta relacionada com a extração do soluto do interior das células X_K , onde a resistência predominante é a difusão do óleo no interior do sólido.

$$J(X > X_K, Y) = k_F a \rho_F (Y_S - Y) \quad (17)$$

$$J(X \leq X_K, Y) = k_S a \rho_S X \left(1 - \frac{Y}{Y_S}\right) \quad (18)$$

Onde:

Y_S : Solubilidade do soluto no solvente ($\text{kg}_{\text{óleo}} \text{kg}_{\text{solvente}}^{-1}$);

$k_F a$: Coeficiente de transferência de massa no filme externo (m s^{-1});

$k_S a$: Coeficiente de transferência de massa no sólido (m s^{-1});

As condições iniciais e de contorno para a resolução das equações de balanço (19 e 20) de massa são:

$$X(h, t = 0) = X_0 \quad (19)$$

$$Y(h = 0, t) = 0 \quad (20)$$

Onde:

X é a concentração na fase sólida ($\text{kg}_{\text{óleo}} \text{kg}_{\text{sólido}}^{-1}$);

Y é a concentração na fase solvente ($\text{kg}_{\text{óleo}} \text{kg}_{\text{solvente}}^{-1}$);

h é a posição do leito de sólidos (m);

t é o tempo de extração (s);

X_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida;

O processo de extração pode ser dividido em três etapas, que variam conforme os domínios dos diferentes mecanismos de transferência presentes no processo de extração: Convecção natural, forçada e difusão. Estes domínios são determinados a partir da determinação de X_P e X_K , possibilitando a obtenção de curvas de extração que descrevem as diferentes etapas do processo de extração.

A primeira etapa o soluto é de fácil acesso (X_P), acontece pela difusão no filme externo, com taxa constante de extração (CER); na última etapa, a taxa de extração depende da difusão na fase sólida, soluto de difícil acesso (X_K) e na etapa intermediária, ambos os mecanismos estão presentes (taxa decrescente de extração-FER).

Desta forma, com a resolução das Equações 15-20 em conjunto com as Equações 21, 22 e 23, resulta nas curvas cinéticas de extração, para o modelo de Sovová (1994).

Para $t < t_{CER}$:

$$m(t) = m_F Y_S t [1 - \exp(-Z)] \quad (21)$$

Para $t_{CER} \leq t \leq t_{FER}$:

$$m(t) = m_s \left\{ t - t_{CER} \exp \left[\frac{Z Y_S}{W X_0} \ln \left(\frac{1}{1-r} \left(\exp \left(\frac{W m_F}{m_S} \right) (t_{CER} - t) - r \right) \right) - Z \right] \right\} \quad (22)$$

Para $t > t_{FER}$:

$$m(t) = m_s \left\{ m_s - \frac{Y_S}{W} \ln \left[1 + \left(\exp \left(\frac{W X_0}{Y_S} \right) - 1 \right) \exp \left(\frac{W m_F}{m_S} \right) (t_{CER} - t) r \right] \right\} \quad (23)$$

Em que:

$$Z = \frac{k_F a m_S \rho_F}{m_F \rho_S} \quad (24)$$

$$W = \frac{m_S a k_S \rho_F}{m_F (1 - \varepsilon)} \quad (25)$$

$$t_{CER} = \frac{(1-r) m_S X_0}{Y_S Z m_F} \quad (26)$$

$$t_{FER} = t_{CER} + \frac{m_S}{W m_F} \ln \left[r + (1-r) \exp \left(\frac{W X_0}{Y_S} \right) \right] \quad (27)$$

Onde:

m_F : Vazão mássica de solvente (g);

t: Tempo de extração(s);

X_0 : Concentração inicial do óleo na matriz sólida (Kg.g⁻¹)

m_S : Massa de sólido isenta de óleo (g)

r: Fração de óleo facilmente acessível (X_P/X_0);

t_{CER} : Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte inicial do leito (s);

t_{FER} : Tempo em que se esgota o soluto presente na superfície das células na parte final do leito (s);

Z e W: são parâmetros adimensionais do modelo.

3.11 Plantas antioxidantes

A literatura mostra uma grande variedade de espécies de plantas que são estudadas quanto a sua capacidade antioxidante. Araticum (*Annona Montana*); Malva (*Malva sylvestris*); Carqueja (*Baccharis trimera*); Louro (*Laurus Nobilis*); Camomila (*Matricaria chamomilla*); Orégano (*Origanum vulgare*); Própolis (*Apis mellífera* L.) e Casca de romã (*Punica granatum* L.) foram avaliadas quanto sua atividade antioxidante por pesquisadores e por estudos anteriores quanto a potencial antioxidante para biodiesel.

Frutos de araticum são importantes fontes de antioxidantes. Segundo Roesler *et al.*, (2007) a polpa fresca de Araticum apresenta teores de compostos fenólicos na faixa de 150 a 200 mg.100g⁻¹. Indicando excelente capacidade de sequestrar radicais livres, ou seja, atividade antioxidante.

A *Malva sylvestris* apresentou, em alguns estudos, propriedades antioxidantes e sequestradora de radicais livres *in vitro* (DELLA GRECA *et al.*, 2009). Barros *et al.*, (2010) estudaram diferentes extratos metanólicos preparados a partir das folhas, flores, pequenos galhos folhas e flores e frutos imaturos. Os resultados obtidos mostraram que o extrato metanólico das folhas de *M. sylvestris* possui atividade antioxidante mais significativa.

As plantas do gênero *Baccharis*, se destacam por serem ricas em flavonóides, triterpenos e diterpenos (VERDI *et al.*, 2005). Assim, a Carqueja é considerada promissora quanto ao seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante *in vitro* da carqueja (*Baccharis trimera*) já foi comprovada pelo método DPPH••, através da capacidade em sequestrar radicais livres (MORAIS *et al.*, 2009).

O louro, além de ser um condimento muito usado na culinária, tem efeito antioxidante. Diversos estudos demonstram em sua composição compostos fenólicos fenólicos (ALBAYRAK *et al.*, 2012) e derivados como, flavonóides (EMAM *et al.*, 2010), α -tocoferol (OUCHIKH *et al.*, 2011) e compostos voláteis.

Existem cerca de 1.000 espécies de sálvia, dentre essas se destaca a *Salvia officinalis*, devido sua ação antioxidante. Kosar *et al.*, (2008) verificou que o ácido caféico é o principal composto responsável pela atividade antioxidante na sálvia, a variedade *Salvia officinalis* possui a presença de componentes antioxidantes como ácido carnósico, diterpenos e derivados carnosol.

A camomila, assim como outras variedades de chás, é visada em estudos quanto ao seu potencial antioxidante. O extrato metanólico de camomila, segundo Coelho *et al.*, (2012) apresentou significativa atividade antioxidante frente ao radical DPPH•.

O orégano vem ganhando destaque como um potencial antioxidante para sistemas lipídicos, se destacando pela ação antioxidante. Em 1989, Kikuzaki & Nakatani isolaram cinco diferentes compostos fenólicos do extrato metanólico de folhas de orégano e entre estes o ácido rosmarínico em concentrações mais bloqueador de espécies reativas e inibidor da peroxidação lipídica (KOSAR *et al.*, 2008).

A própolis é uma substância resinosa e misturada à cera, pólen e secreções salivares. Sua composição é complexa e está relacionada, principalmente, às características da vegetação de cada região. De-Melo *et al.*, (2014) verificaram a variação significativa na capacidade antioxidante (51,33-92,70%) do extrato de própolis de acordo com a região onde a amostra foi coletada, variação de 51,33% da região nordeste e 92,70% região Sudeste.

Polifenóis e antocianidinas foram observadas nos extratos da casca de romã apresentando, características antioxidantes superiores das encontradas no vinho tinto e no chá verde (AFAQ *et al.*, 2003). Sharma *et al.* (2009) estudaram o potencial antioxidante da casca da romã no controle da rancidez oxidativa de produtos de frango. Pande e Akoh (2009) realizaram uma avaliação da capacidade antioxidante e o perfil lipídico da romã onde foi possível observar maior teor de taninos hidrolisáveis na casca.

Kelawara e Ananthanarayan (2004) observaram que a casca pulverizada da romã produziu a maior atividade antioxidante. Singh *et al.* (2002) avaliaram extrato metanólico, aquoso e acetônico da casca e das sementes da romã, quanto a sua atividade antioxidante, sendo que o extrato metanólico da casca apresentou a maior atividade antioxidante. No entanto, não há na literatura trabalhos publicados que utilizem a casca de romã como antioxidante para o biodiesel.

10.12 Casca de Romã

A romã *Punica granatum* L., segundo estudos filogenéticos, pertence à família *Lythraceae* (HOLLAND *et al.*, 2009) conhecida popularmente por romãzeira, romeira ou granado, é uma das mais antigas frutas comestíveis. Embora seja cultivada em quase todo mundo, é nativa do Irã, sendo os cinco principais produtores dessa fruta a Índia, Irã, China, Estados Unidos e Turquia (LORENZI; MATOS, 2008; HOLLAND *et al.*, 2009). No Brasil, a romã, é cultivada em todo país (MOREIRA, 1985).

É um arbusto lenhoso que pode chegar até três metros de altura, com folhas pequenas e brilhantes, flores vermelhas nas extremidades dos ramos. Seus frutos são do tipo baga, esféricos e globóides podendo medir até 12 cm com numerosas sementes em camadas envolvidas em arilo polposo (LORENZI; SOUZA, 2001; LANSKY; NEWMAN, 2007; LORENZI; MATOS, 2008). A Figura 14 mostra a romãzeira e seu fruto romã.



Figura 14 - Romãzeira e fruto.
(Fonte: adaptado FERNANDES *et al.*, 2015).

O fruto da romã é composto por aproximadamente 3% de sementes, 30% de polpa e 67% de casca (LANSKY; NEWMAN, 2007). Segundo Liu *et al.* (2012) a romã é boa fonte de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o ácido linoléico e suas sementes segundo Jing *et al.* (2012) possuem propriedade antioxidantes.

Na casca da romã é onde se encontram até 28% de taninos (LORENZI; MATOS 2008) e compostos fenólicos como antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos e

compostos antioxidantes que captam facilmente radicais livres, devido a sua estrutura química. Estudos mostram a presença de diversos compostos bioativos, dentre os quais antocianinas com mecanismo de ação semelhante ao da vitamina C, vitamina E e betacaroteno (WERKMAN *et al.*, 2008).

Ainda, é possível encontrar na literatura trabalhos que estudam a romã quanto a propriedades antimicrobianas, atividade clínica na odontologia, atividade anti-neoplásica, atividade estrogênica, entre outras (WERKMAN *et al.*, 2008). No entanto há poucos trabalhos na literatura que caracterizem os compostos como os tocoferóis, esteróis e carotenóides presentes na folha, sementes ou casca da romã. (JING *et al.* 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo da Matéria Prima – Casca de Romã

As cascas de romã foram adquiridas no Município de Toledo na empresa Celeiro Nacional. As mesmas foram secas de forma natural (em temperatura ambiente), e então foram trituradas em um liquidificador comercial. O material triturado foi classificado de acordo com a série padrão de peneiras Tyler (20, 24, 48, 60 e 100 mesh) utilizando um agitador de peneiras para padronizar o tamanho das partículas. O material retido acima da peneira de 20 mesh e abaixo da peneira de 100 mesh foi descartado, sendo o restante armazenado a -5 °C, para posterior uso nas extrações convencionais e com fluído supercrítico.

4.2 Análises da Matéria-Prima

4.2.1 Determinação do diâmetro médio das partículas (d_s)

A classificação granulométrica das partículas foi determinada a partir de ensaio em agitador, com a série padrão de peneiras Tyler de 20, 24, 48, 60, 80 e 100 mesh (série Tyler, W.S. Tyler, Wheeling, EUA). A massa das frações retidas em cada peneira foi medida e o diâmetro médio de partículas foi calculado de acordo com as Equações 28 e 29, propostas por GOMIDE (1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i}{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i^3}} \quad (28)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (29)$$

Em que:

d_s = diâmetro médio superficial dos fragmentos (mm);

m_i : massa de amostra retida na peneira i (g);

m_t : massa total de amostra (g);

\bar{d}_i : diâmetro médio das partículas que passaram pela peneira i (mm);

n : número total de frações

4.3.2 Umidade da Casca de Romã

A umidade da matéria-prima foi determinada pelo método gravimétrico, em triplicata, sendo que aproximadamente 5 gramas de semente, pesados em balança analítica (AUX220 - Shimadzu), foram acondicionados em placa de petri devidamente tarada e levados a estufa a 105 °C por 24 horas, tempo este necessário para obter massa constante. Depois de retirados da estufa foram transferidos para dessecador contendo sílica gel para resfriamento até temperatura ambiente e em seguida foram pesados novamente. O percentual de umidade foi obtido de acordo com a Equação (30):

$$Umidade (\%) = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad (30)$$

Em que:

Mu : massa da amostra úmida;

Ms : massa da amostra seca (depois de 24 horas em estufa a 105 °C).

4.4 Obtenção de extratos convencionais

Os extratos da casca de romã foram obtidos por extração convencional com os solventes líquidos, álcool etílico, acetato de etila e hexano, os quais apresentam índices de polaridade distintos como indicado na Tabela 2. As extrações foram realizadas com aparelho Soxhlet e extrator de gordura método Goldfish.

Tabela 2 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração convencional

Solvente	Índice de polaridade
Hexano	0
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2

(Fonte: BYERS, 2009).

4.4.1 Extração Soxhlet

As extrações convencionais com aparelho Soxhlet, utilizando os solventes álcool etílico, acetato de etila e hexano, foram realizadas no Laboratório de Laboratório de Processos de Separação do Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo/Pr.

Foram pesados aproximadamente 15 gramas da amostra, totalmente envolta em papel filtro e acondicionada no extrator Soxhlet, que consiste de um tubo extrator, balão de vidro de fundo redondo e um condensador (Figura 15) .

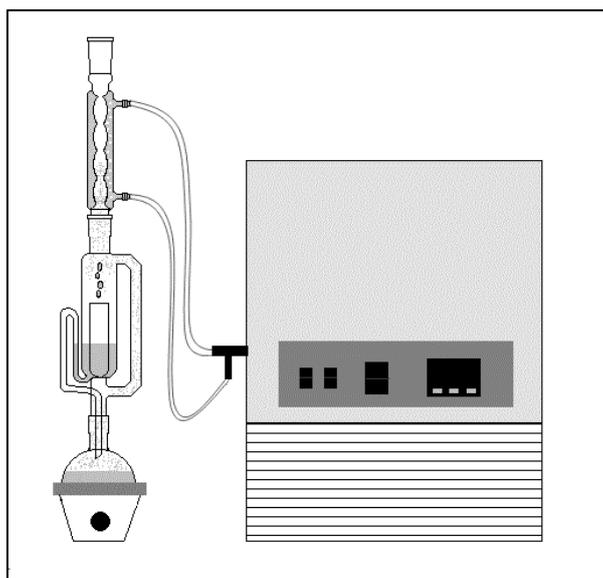


Figura 15 - Ilustração do extrator Soxhlet.

O tubo extrator é conectado ao balão de vidro, que contém 250 mL de solvente álcool etílico (Neon P.A), o qual é submetido ao aquecimento através de uma manta térmica. O início da extração foi contabilizado a partir do início do gotejamento do solvente, durante um tempo de 6 horas de extração. O mesmo procedimento foi repetido para os solventes acetato de etila (Anidrol, P.A) e Hexano (Anidrol, P.A).

Após a extração, os extratos foram secos em estufa a 60 °C até evaporação do solvente. Nesta etapa foram obtidos três extratos: Casca de romã/Etanol (SoxEt), Casca de romã /Acetato de etila (SoxAcet), Casca de romã/Hexano (SoxHex), os quais foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a -4 °C.

4.4.2 Extrator de óleos de gorduras - Goldfish

As extrações convencionais com alta temperatura foram realizadas com aparelho Goldfish, utilizando os solventes álcool etílico, acetato de etila e hexano. As extrações foram realizadas no Laboratório de Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo/Pr.

Para a realização deste experimento utilizou-se 150 mL de solvente álcool etílico (Neon P.A) e 10 gramas de casca de romã acondicionada em papel filtro e colocada no equipamento em contato com o solvente. O início da extração foi contabilizado a partir do início da fervura do solvente, na temperatura de 90 °C durante 1h30min, em seguida realizou-se aumento da temperatura 120 °C para a suspensão da amostra e o gotejamento do solvente aquecido a 120 °C durante 1 hora, por fim a recuperação do solvente foi realizada durante 30 minutos com o fechamento da válvula como mostra a Figura 16. O tempo total de cada extração foi de 3 horas. O mesmo procedimento foi repetido para o solvente Acetato de etila (Anidrol, P.A) e Hexano (Anidrol, P.A).



Figura 16 - Aparelho extrator de gordura - Goldfish.

Após a extração, os extratos foram secos em estufa a 60 °C até evaporação total do solvente. Nesta etapa foram obtidos três extratos: Casca de romã + etanol (ExtEt), Casca de romã + acetato de etila (ExtAcet), Casca de romã + hexano (ExtHex), os quais foram secos em estufa a 60 °C para retirada do solvente não recuperado.

A Figura 17 mostra o fluxograma geral no qual foram obtidos os extratos pelos métodos convencionais Soxhlet e Goldfish, com diferentes solventes em ordem crescente de polaridade.

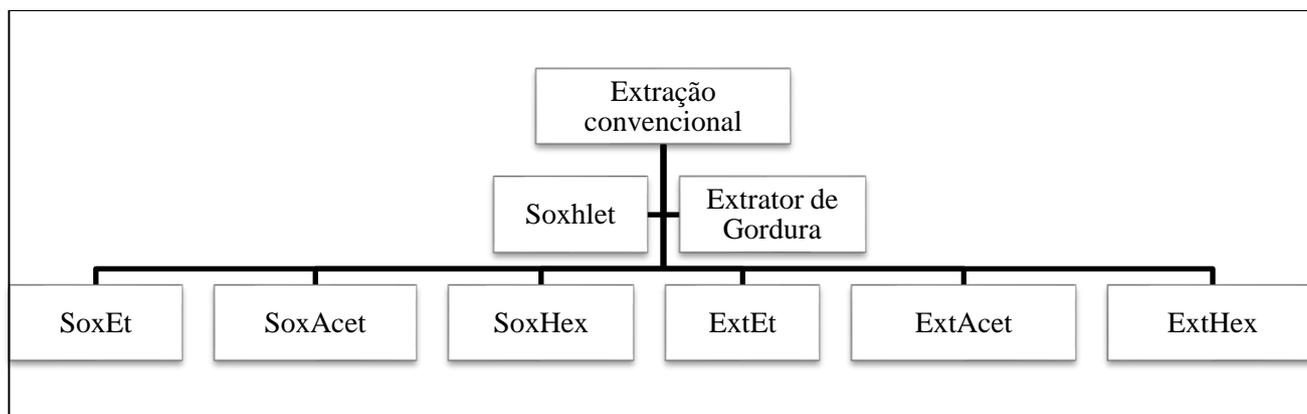


Figura 17 - Fluxograma da extração convencional.

4.5 Extração com dióxido de carbono supercrítico (ESC)

Os experimentos para obtenção do extrato da casca de romã utilizando dióxido de carbono supercrítico foram realizados no Laboratório de processos biotecnológicos e de separação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo/Pr. As análises realizadas tiveram como objetivo avaliar o efeito da temperatura e a adição de solvente na extração, sobre o rendimento da mesma. A Figura 18 ilustra a variação de temperatura e adição de etanol em cada extração realizada.

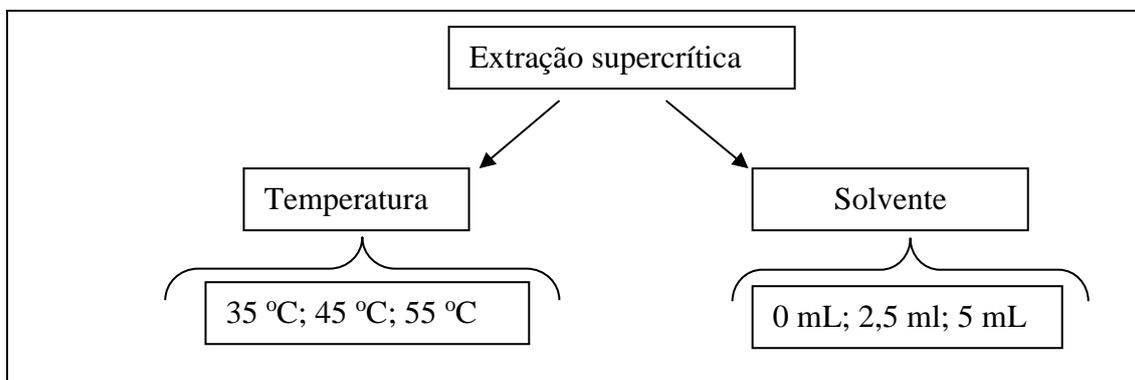


Figura 18 - Fluxograma extração supercrítica.

O módulo experimental é constituído por (a) Cilindro de armazenamento de CO₂, (b) Bomba Seringa modelo 500D (TELEDYNE ISCO); (c) banho termostático modelo FP-50 (JULABO), responsável pelo resfriamento do CO₂ bomba seringa; (d) banho termostático (MARCONI), responsável por aquecer o leito de extração; (e) termorregulador modelo MSC-04E (THOLZ), utilizado para manter a válvula micrométrica de expansão aquecida a 60 °C, evitando assim o congelamento; e (f) leito cilíndrico encamisado de aço inox, como ilustrado na Figura19.

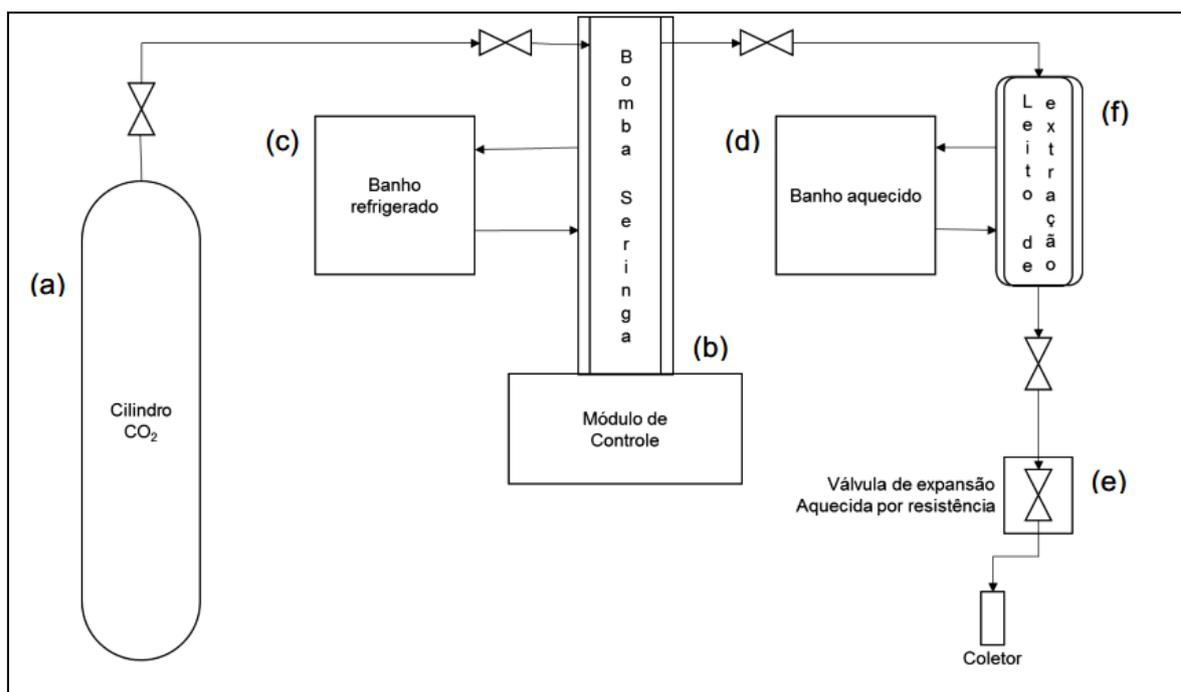


Figura 19 - Esquematização do módulo de extração com fluido supercrítico.
(Fonte: KLEIN, 2016)

Nessa etapa foram obtidos 9 extratos, sendo que foi realizado duplicata para todas as condições. A Tabela 3 representa os extratos obtidos, indicando a temperatura de extração bem como a quantidade de etanol (cossolvente) adicionado para realização da extração.

Tabela 3 - Extratos obtidos com CO₂ Supercrítico.

Extrato Supercrítico	Temperatura (°C)	Solvente (mL)
SC35/0	35	0,0
SC35/2,5	35	2,5
SC35/5	35	5,0
SC45/0	45	0,0
SC45/2,5	45	2,5
SC45/5	45	5,0
SC55/0	55	0,0
SC55/2,5	55	2,5
SC55/5	55	5,0

4.6 Rendimento das extrações

Os rendimentos das extrações podem ser calculados pela Equação (32), onde relaciona-se a quantidade de extrato final obtido e a quantidade de matéria-prima utilizada. Para extração supercrítica, não foi contabilizado o extrato remanescente no extrator.

$$R_{(\%)} = \frac{m_{\text{Extrato}}}{m_{\text{Massa amostra}}} \times 100 \quad (32)$$

Em que:

$R_{(\%)}$ = Rendimento global de extração;

m_{Extrato} = Massa de extrato obtida após o processo de extração;

$m_{\text{Massa amostra}}$ = Massa de amostra utilizada no processo de extração;

4.7 Modelagem Matemática da Extração Supercrítica

Para realização da modelagem matemática da extração com solvente CO₂ supercrítico é necessário saber algumas características do leito de extração bem como da amostra a ser extraída.

Os modelos matemáticos utilizados nesse trabalho foram o Modelo de Sovová (1994).

4.7.1 Densidade do CO₂

Foi obtida a partir das Tabelas termodinâmicas internacionais do dióxido de carbono adotadas pelo National Institute of Standards and Technology (NIST).

4.7.2 Solubilidade do extrato de Casca de Romã no CO₂ Supercrítico

A solubilidade do extrato da casca de romã em CO₂ supercrítico foi obtida empregando o método dinâmico da curva cinética de extração. No início do processo de extração, o soluto fica pressurizado no leito durante 30 minutos, tempo suficiente para que o sistema atinja o equilíbrio e o solvente fique saturado com a fração de óleo facilmente removível de forma que, a concentração na saída seja igual à concentração de equilíbrio. Assim, a solubilidade é calculada utilizando-se os dados da parte linear da curva de extração conforme Equação (33).

$$Y_S = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{solvente}}} \quad (33)$$

Em que:

Y_S : solubilidade do óleo no solvente;

$m_{\text{óleo}}$: massa total de óleo obtida apenas na parte inicial (linear) da curva de extração;

m_{solvente} : massa de solvente gasto apenas na parte inicial (linear) da curva de extração;

4.7.3 Densidade real da casca de romã

A determinação da densidade real da casca de romã, ρ_s , trituradas, foi realizada pela técnica de picnometria em gás hélio, utilizando-se o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos com o uso do equipamento da Micromeritics®, modelo AccuPyc II 1340, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. As condições utilizadas na análise são apresentadas na Tabela 4. O resultado final de densidade real foi obtido pela média de 10 determinações.

Tabela 4 - Condições utilizadas para determinar a densidade real das sementes por picnometria de gás hélio.

Condições	Valor
Massa de amostra (g)	4,5023
Temperatura do ensaio (°C)	25,70
Número de purgas	10
Pressão de enchimento na purga (psig)	19,50
Pressão de enchimento na corrida (psig)	19,50
Taxa de equilíbrio (psig/min)	0,05

4.7.4 Densidade do leito de extração

A densidade do leito de partículas (ρ_{leito}) foi determinada a partir da Equação 34.

$$\rho_{leito} = \frac{m_s}{V_{leito}} \quad (34)$$

Em que:

m_s : massa de inerte, sendo esta a massa de amostra alimentada no reator descontada a massa de óleo extraída;

V_{leito} : volume do leito;

4.7.5 Porosidade do leito de extração

Conhecendo os valores de densidade real das sementes e densidade do leito, a porosidade do leito de ESC pode ser determinada através da Equação (35):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_{leito}}{\rho_s} \quad (35)$$

Em que:

ρ_{leito} : densidade do leito;

ρ_r : densidade real das sementes

4.8 Obtenção do biodiesel

O biodiesel comercial foi proveniente do comércio de combustíveis da cidade de Londrina Paraná, cedido para estudo pelo Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LPAC) da Universidade Estadual de Londrina.

4.9 Caracterização dos Extratos

Os extratos obtidos pelas extrações convencionais e com fluido CO₂ supercrítico foram submetidos à caracterização quanto a sua composição, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos.

4.9.1 Determinação da composição química dos extratos

A composição química dos extratos foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG-MS QP2010 SE (Shimadzu). As amostras diluídas em diclorometano (Anidrol) foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas na determinação da composição química dos extratos.

Amostra	Volume injetado: 1,0 µL
Coluna	SH-RTx-5MS (shimadzu, 5% de fenil-metilsiloxano (30m x 0,25 mmid, 0,25 µm) Auto amostrador Shimadzu AOC-20i.
Gás de arraste	He (99,9999); 1,0 mL/min
Injetor	300 °C; Split (1:100)
Forno	50 °C → 300 °C (6 °C/min); 300 °C (10 min) Fonte de Ionização: Impacto por elétrons (70 eV)
Detector	Modo varredura (0,5 seg/scan) Faixa de massas: 30-600 daltons (u)

4.10 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TFT) pelo método FolinCiocalteau

A quantificação de compostos fenólicos nos extratos das cascas de romã foi realizada utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteau. Este método baseia-se no princípio que, em meio alcalino, os compostos fenólicos contidos na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstícos e fosfomolibdicos do reagente Folin em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorvância na faixa visível do espectro em 765 nm (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Para a realização do teste, os extratos da casca de romã foram dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg.mL⁻¹. Para análise adicionou-se em um tubo de ensaio 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau diluído (1:10; v/v), 0,3 mL de solução de extrato diluída em etanol e 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi incubada por 5 minutos a 50° C em banho-maria. A absorvância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro.

A quantidade total de fenóis de cada óleo essencial foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg.mL⁻¹. A partir da curva, foi calculado o coeficiente de correlação (R²). O branco foi obtido substituindo-se o volume de amostra por água, mantendo-se as mesmas quantidades de reagente de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio. Por meio da correlação com a curva padrão de ácido gálico, determinou-se os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG).g⁻¹de extrato, através da Equação (36). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

$$TFT \left[\frac{mgEAG}{g_{extrato}} \right] = \frac{EAG.1000}{D_{ext}} \quad (36)$$

Em que:

EAG: Equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (µg EAG/mL);

D_{ext} : diluição das amostras (mgEXT/mL).

4.11 Determinação da atividade antioxidante pelo Método DPPH•

O DPPH• é um radical livre, estável a temperatura ambiente devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta em etanol, caracterizada por uma banda de adsorção em etanol em cerca de 520 nm (ALVES *et al.*, 2010). Este ensaio é baseado na captura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, reduzindo-o a difenil-picril-hidrazina, resultando no descoloramento da solução para amarelo pálido (MENSOR *et al.*, 2001) e produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm (MENSOR *et al.*, 2001; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

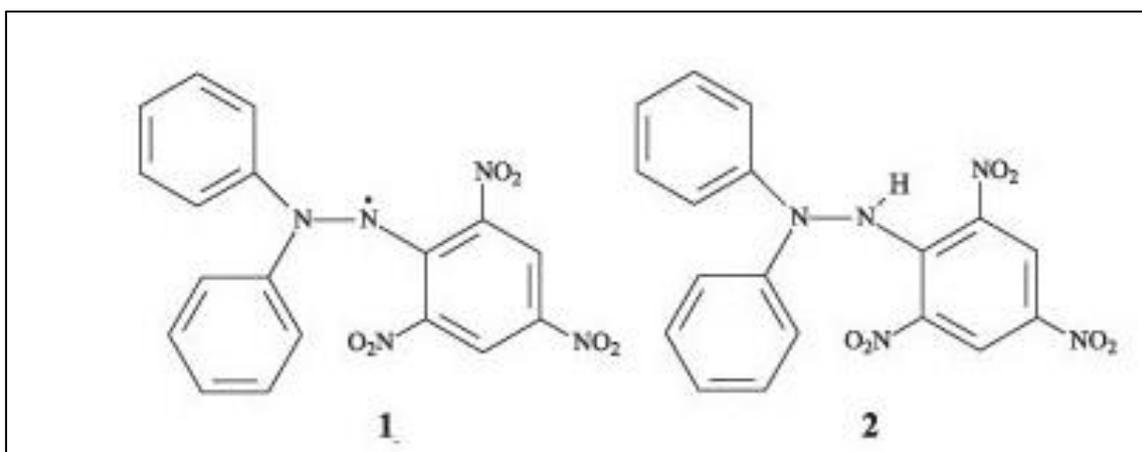


Figura 20 - Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH•.
(Fonte: ALVES *et al.*, 2010)

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. Os resultados são expressos como EC₅₀ (concentração equivalente) que nada mais é do que, a concentração mínima de material necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH• em 50% (MENSOR *et al.*, 2001).

Em um tubo de ensaio, adicionou-se a 3,9 mL da solução etanólica à 6×10^{-5} M de DPPH• (Sigma Aldrich, GE) e uma alíquota de 0,1 mL de diferentes diluições de todos os extratos. As misturas são agitadas por 30 segundos e deixadas para reagir por 40 minutos no escuro à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 515 nm, sendo todas as determinações

realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle sem o antioxidante. Foi utilizado álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A queda na leitura da densidade ótica dos extratos adicionados de radical DPPH• foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do DPPH•, a qual indicou a atividade antioxidante para os extratos obtidos nos diferentes testes (BRAND-WYLLIANS *et al.*, 1995).

O cálculo da porcentagem de atividade antioxidante foi realizado de acordo com a Equação (37) (MENSOR *et al.*, 2001).

$$\% \text{ Inibição do radical DPPH} \bullet = \frac{\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. controle}} \cdot 100 \quad (37)$$

Os valores EC, concentração do extrato necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH• em 50%, foram obtidos da regressão linear entre as concentrações utilizadas (abscissa) e a porcentagem da atividade antioxidante (ordenada).

4.12 Aditivação do Biodiesel

Para analisar a influência de antioxidantes naturais presentes nos extratos da casca de romã na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel, foi pesado 10 miligramas de amostra e adicionados a 10 gramas de biodiesel, gerando uma concentração 1000 ppm, os quais eram submetidos ao banho ultrasônico (Eco-sonics modelo Q5.9/37A), para melhor homogeneização. A Tabela 6 mostra os diferentes tipos de extratos avaliados no biodiesel. A fim de comparação, foi utilizado um antioxidante sintético (BHA e BHT) na mesma concentração (1000 ppm).

Tabela 6- Amostras submetidas ao teste de estabilidade oxidativa rancimat/ Extratos da casca de romã aditivadas ao biodiesel.

Amostra	Representação	Condição de Extração
A	SC35;0	Supercrítico 35 °C / 0 mL etanol
B	SC35;2,5	Supercrítico 35 °C / 2,5 mL etanol
C	SC35;5	Supercrítico 35 °C / 5 mL etanol
D	SC45;0	Supercrítico 45 °C / 0 mL etanol
E	SC45;2,5	Supercrítico 45 °C / 2,5 mL etanol
F	SC45;5	Supercrítico 45 °C / 5 mL etanol
G	SC55;0	Supercrítico 55 °C / 0 mL etanol
O	SC55;2,5	Supercrítico 55 °C / 2,5 mL etanol
I	SC55;5	Supercrítico 55 °C / 5 mL etanol
J	SoxEt	Soxhlet etanol
K	SoxAcet	Soxhlet Acetato de etila
L	SoxHex	Soxhlet Hexano
M	ExtEt	Goldfish etanol
N	ExtAcet	Goldfish Acetato de etila
O	ExtHex	Goldfish Hexano

4.13 Testes de Estabilidade Oxidativa do biodiesel

4.13.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As amostras de biodieseis aditivadas com os extratos de casca de romã foram submetidas à análise de estabilidade oxidativa foram obtidas num Calorímetro Exploratório Diferencial (Shimadzu DSC 60), aproximadamente 8 mg de amostra, é acondicionada em um cadinho de alumínio, e submetida taxa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹, em atmosfera de oxigênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, tendo sua temperatura variando de 25°C até 500°C.

A temperatura de oxidação do biodiesel, submetido ao teste DSC, foi obtido através do método das tangentes, pelo gráfico de fluxo de calor *versus* temperatura (°C).

4.13.2 Rancimat

Foram preparadas amostras de 3g de Biodiesel aditivado com 1000 ppm dos antioxidantes obtidos da casca de romã. Em seguida, foram levadas a aquecimento acelerado a 110 °C, com taxa de insuflação de ar de 10 L.h⁻¹, para determinação do período de indução. O teste foi realizado utilizando o Rancimat 873, marca Metrohm a fim de atender a norma oficial EN 14112 de determinação da estabilidade em teste acelerado.

4.13.3 Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos

Realizou-se a cinética para as amostras que demonstraram os melhores tempos de indução , utilizando as temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C. A partir dos dados obtidos foi possível determinar os valores das constantes de velocidade (k), a energia de ativação (Ea), a energia de ativação aparente (Eaa) utilizando as equações 2; 3; 4 e 5, respectivamente. Ainda foi possível encontrar os parâmetros termodinâmicos como entalpia, entropia e energia livre de Gibbs.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da casca de Romã

5.1.1 Diâmetro médio

O diâmetro médio das partículas pode ser obtido através da Equação (28). A Tabela 7 apresenta a distribuição granulométrica das cascas de romã após o processo de trituração.

Tabela 7 - Distribuição granulométrica das cascas de romã após secagem e moagem.

Mesh (Tyler)	Fração	Abertura das peneiras (mm)	Diâmetro médio (\bar{d}_i)	Amostra retida (g)	Amostra retida (%) ($\Delta_i \cdot 100$)
20	>20		>0,710	71,864	8,1
24	20/24	0,710	0,780	138,394	15,5
48	24/48	0,300	0,505	315,071	35,3
60	48/60	0,250	0,360	70,862	7,9
100	60/100	0,150	0,200	95,977	10,8
Fundo	<100		<0,150	200,000	22,4
Total				892,168	100

Para realização dos experimentos foram utilizadas partículas que ficaram retidas entre as peneiras de 24 a 60 mesh, pois se trata de um tamanho de partícula intermediário aos obtidos após moagem, além de ter apresentado maior proporção mássica em relação às demais frações.

Considerando apenas as partículas retidas nas peneiras 20 a 60 mesh, utilizando as equações 27 e 28 tem-se que o diâmetro é $\bar{d}_s = 0,29 \text{ mm}$.

5.1.2 Umidade

Os valores de umidade da casca de romã foram obtidos conforme metodologia descrita e calculada através da Equação (29), onde encontrou-se um valor médio de $12,14 \pm 0,12$ (%), valor este considerado baixo quando comparado com a umidade da polpa (64,09 %) e semente (38,30 %) analisado por Jardini e Mancini Filho (2007).

A umidade do material é um parâmetro importante devido sua possível influencia no processo de extração, que pode melhorar ou não o desempenho, dependendo do seu teor de água e do método de extração utilizada.

5.2 Rendimento Global das Extrações

5.2.1 Extração convencional – Soxhlet e Goldfish

Após evaporação do solvente utilizado na extração convencional, realizou-se o cálculo do rendimento dos extratos obtidos, pela Equação (31). Os resultados estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8 - Rendimento global das extrações convencionais com extrator Soxhlet e extrator de gordura Goldfish.

Tipo de extrator	Solvente	Tempo de extração (min)	Rendimento (%)
Soxhlet (90 °C)	Etanol	360	$35,25 \pm 0,05$
	Acetato de Etila	360	$2,98 \pm 0,01$
	Hexano	360	$0,82 \pm 0,07$
Extrator de gordura (120 °C)	Etanol	180	$25,87 \pm 0,03$
	Acetato de Etila	180	$2,28 \pm 0,02$
	Hexano	180	$0,43 \pm 0,02$

Observa-se que o rendimento com o solvente etanol foi maior para ambas as metodologias de extração, seguida da extração com acetato de etila e n-hexano respectivamente, indicando a presença de compostos polares no extrato da casca de romã. O etanol possui índice de polaridade alto (5,2) quando comparado com o acetato de etila (4,4) e o n-hexano (0), desta forma nota-se que há um indicio da relação entre a polaridade do solvente utilizado e a diminuição do rendimento da extração.

Segundo Aguiar *et al.* (2013) solventes mais polares possuem alta solubilização dos compostos vegetais, no entanto apresentam baixa seletividade, levando a uma grande variedade de compostos a serem extraídos. Além da polaridade, o tipo de interação entre o solvente e a matriz vegetal também influencia no rendimento da extração (Almeida, 2006).

Quanto a temperatura de extração, segundo Castro e Priego-Capote (2010) é um fator que influencia na extração de compostos, sendo que quando muito elevada pode causar a perda de compostos termolábeis. Desta forma, o melhor rendimento para a extração convencional com equipamento Soxhlet, quando comparada a extração realizada com extrator de óleos de gorduras, pode estar relacionada a menor temperatura.

5.3 Extração Supercrítica

Através da extração supercrítica da casca de romã foi possível obter extratos, com diferentes rendimentos devido às condições de extrações empregadas, bem como a influencia na solubilidade dos extratos e a atividade antioxidante no biodiesel. A condição de pressão foi mantida a 200 bar, considerando as limitações do equipamento, a temperatura e a adição de cossolvente etanol variaram conforme Tabela 6. Também foi realizada a caracterização do leito de partículas, para realização da modelagem matemática das curvas cinéticas da extração com intuito de verificar a capacidade em prever os modelos experimentais.

5.3.1 Rendimento Global

O rendimento global das extrações supercrítica foi obtido pela relação entre a massa do extrato obtido no final da extração e a massa da casca de romã empacotada no extrator de leito fixo. As extrações foram realizadas em condição isobárica (200 bar), durante 150 min, condições estabelecidas levando em consideração as limitações do aparelho de extração.

Devido ao alto rendimento encontrado nas extrações convencionais com solvente etanol, o mesmo foi utilizado para extração supercrítica como solvente modificador nos volumes de 0; 2,5 e 5 mL. A temperatura variou em 35, 45 e 55 °C, sendo possível avaliar os efeitos da temperatura e da adição de cossolvente no rendimento global da extração, sendo que foi realizado duplicata em cada condição de extração.

Tais condições experimentais permitiram uma variedade na densidade do dióxido de carbono (CO₂) supercrítico acarretando em ampla solvatação do CO₂. A Tabela 9 apresenta as condições experimentais e os resultados dos rendimentos globais da extração supercrítica da casca de romã.

Tabela 9 - Condições operacionais e rendimentos globais da extração supercrítica da casca de romã.

Amostra	Pres (bar)	Temp. (°C)	Cossolvente (mL)	Dens. CO₂ (kg.m⁻³)^a	Rend. (%)	Tempo (min)
A	200	35	0,0	865,72	0,5409	150
B	200	35	2,5	865,72	0,6334	150
C	200	35	5,0	865,72	0,7311	150
D	200	45	0,0	812,69	0,6040	150
E	200	45	2,5	812,69	0,6626	150
F	200	45	5,0	812,69	0,6589	150
G	200	55	0,0	754,61	0,5500	150
H	200	55	2,5	754,61	0,6618	150
I	200	55	5,0	754,61	0,8133	150

^aNIST – National Institute of Standards and Technology

A condição onde se observou maior rendimento (0,8133) foi para a amostra I nas condições de temperatura mais elevada (55 °C) e maior quantidade de etanol (5 mL). O trabalho descrito por Ara Mahdavi e Raofie (2016) realizaram extração supercrítica da

casca de romã com utilização de solvente modificador e obtiveram um rendimento de 1,18% para extração com fluido supercrítico e adição de solvente modificador (metanol), em condições de pressão 350 atm e temperatura 55 °C.

Nota-se que o rendimento dos extratos aumentou com a adição de etanol, no entanto, para a amostra E (condições de extração a 45 °C com e 2,5 mL de etanol), o rendimento foi levemente inferior ao encontrado na amostra F extraído na mesma temperatura 45 °C, porém com 5 mL de etanol, indo contra o descrito nas outras temperaturas de extração.

Sabe-se que o aumento da pressão na ESC aumenta o poder de solvatação do CO₂, devido à variação da densidade do mesmo, desta forma, aumentando a solubilidade dos analitos (BRENNECKE, 1997; LEITNER, 2000). A temperatura durante a extração supercrítica também tem influencia na densidade do CO₂ e na volatilidade do óleo a ser extraído da matriz vegetal. Ao aumentar a temperatura, a densidade do fluido supercrítico diminui e a volatilidade do extrato aumenta. A utilização do solvente modificador aumenta a polaridade do fluido supercrítico e facilita a dessorção do óleo da matriz vegetal (KHAJEH, 2011).

A Figura 21, expressa os valores do rendimento da extração supercrítica, sendo possível visualizar o comportamento do rendimento com a adição de etanol. Sendo que as análises foram realizadas em condição isobárica, nota-se que em uma mesma temperatura, ocorre aumento no rendimento em função do aumento do volume de solvente modificador. Segundo Hollender *et al.*, (1997) o aumento do volume adicionado de etanol influencia de forma positiva no rendimento da extração, quebrando as interações entre o soluto e a matriz vegetal, ocorrendo uma substituição pelo solvente modificador nos sítios ativos da matriz.

Acredita-se que quanto maior o número de moléculas de solvente disponíveis, maior será a interação com a matriz vegetal, solubilizando as substâncias presentes na matéria-prima através da mistura de solventes (HOLLENDER *et al.*, 1997; LUTERMANN *et al.*, 1998).

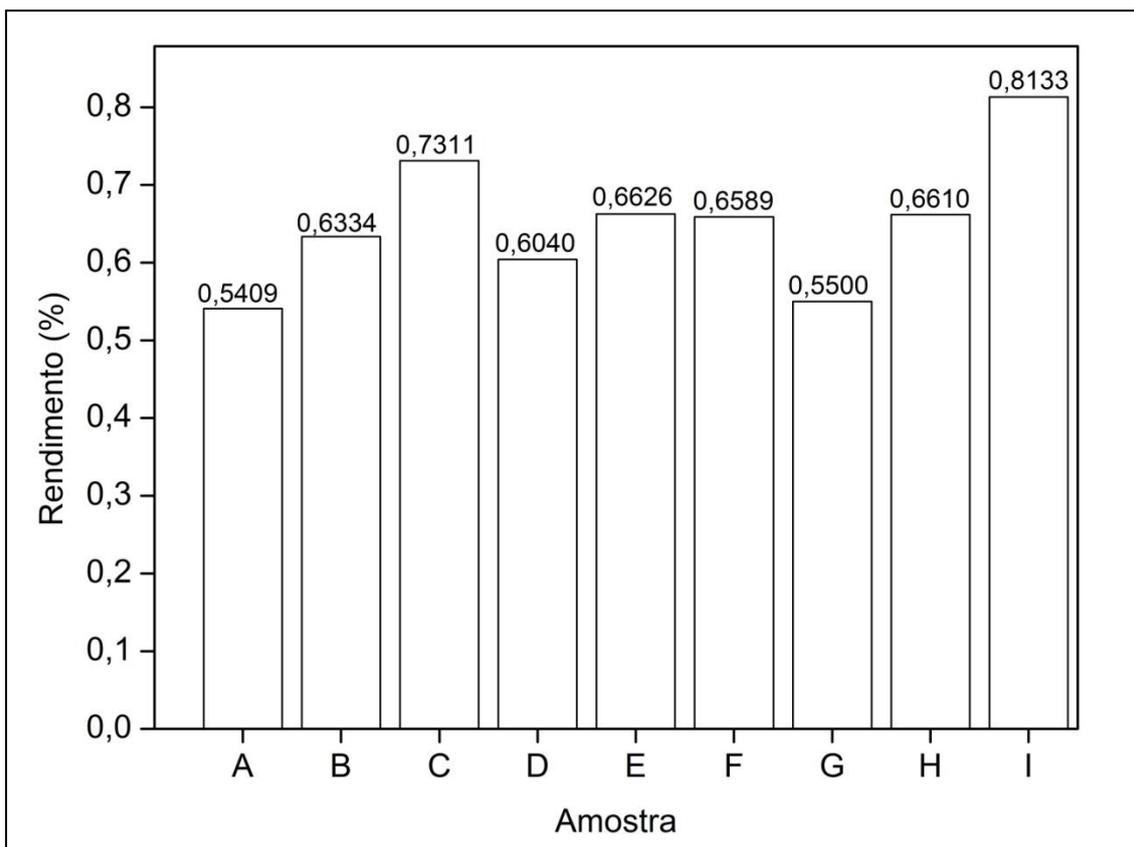


Figura 21 - Rendimento da extração supercrítica da casca de romã.

Quando comparamos os rendimentos da extração convencional (Tabela 8) com a extração supercrítica (Tabela 9), observa-se que a primeira mostrou rendimentos muito superiores aos rendimentos obtidos com CO_2 supercrítico e CO_2 +etanol, no entanto deve-se considerar que a quantidade de solvente utilizada na ESC é muito inferior ao usado na extração convencional, além de levar em consideração a seletividade de compostos extraídos devido ao uso de solvente polar (CO_2) e sua mistura com solvente modificador polar (etanol). Desta forma acredita que em grande escala a extração dos compostos em CO_2 supercrítico é a forma mais seletiva de obter determinados compostos.

5.3.2 Análise estatística para o rendimento da extração supercrítica

Utilizando o programa computacional *Statistica7* (STATSOFT), foram realizadas as análises estatísticas, visando determinar os efeitos das variáveis (temperatura e adição de etanol) sobre o rendimento global da extração. A Tabela 10 demonstra o planejamento experimental utilizado para realizar a análise estatística dos dados de extração.

Tabela 10 - Planejamento experimental utilizado para realizar a análise estatística dos dados de extração.

Condições	
Temperatura (°C)	Etanol (mL)
35 (-1)	0 (-1)
35 (-1)	5 (1)
45 (0)	2,5 (0)
55 (1)	0 (-1)
55 (1)	5 (1)

Para isso um modelo linear com intervalo de confiança de 95%. Na Tabela 11 são apresentados os efeitos das variáveis sobre o rendimento global da extração.

Tabela 11 - Tabela de efeitos principais pressão e temperatura e de interação no rendimento da ESC.

Fator	Efeito	Desvio padrão	t(5)	p-valor	Lim. Inf. 95% de confiança	Lim. Sup. 95% de confiança
Média	0,660100	0,023746	27,79794	0,000001	0,599058	0,721142
Temp.	0,046750	0,053098	0,88044	0,418923	-0,089744	0,183244
Etanol	0,228250	0,053098	4,29862	0,007726	0,091756	0,364744
Interação PxT	0,036750	0,053098	0,69211	0,519688	-0,099744	0,173244

Neste caso foi considerado erro puro, uma vez que os desvios foram obtidos a partir das repetições do experimento. Para duas repetições em todos os pontos, tem-se que o número de graus de liberdade é igual a 5, o valor de t-student para 95% de confiança e 2 graus de liberdade é igual a 2,02. Como os valores obtidos para t(5) são maiores que o Tabelado ($t_2=2,02$), os efeitos são considerados significativos. O p-valor representa a probabilidade de erro envolvida ao aceitarmos o valor observado como válido, quanto maior o p-valor, menos confiamos que o efeito é significativo, quanto menor mais confiamos que o efeito é significativo neste trabalho, os p-valores obtidos são todos menores que 0,05, indicando que a probabilidade de erro ao aceitarmos estes fatores como significativo é de menos de 5%.

O gráfico de Pareto permite visualizar com clareza os efeitos das variáveis do planejamento sobre o rendimento global da extração supercrítica pois apresenta a significância dos efeitos em ordem decrescente, sendo que a linha tracejada preta representa o limite de significância (Figura 22).

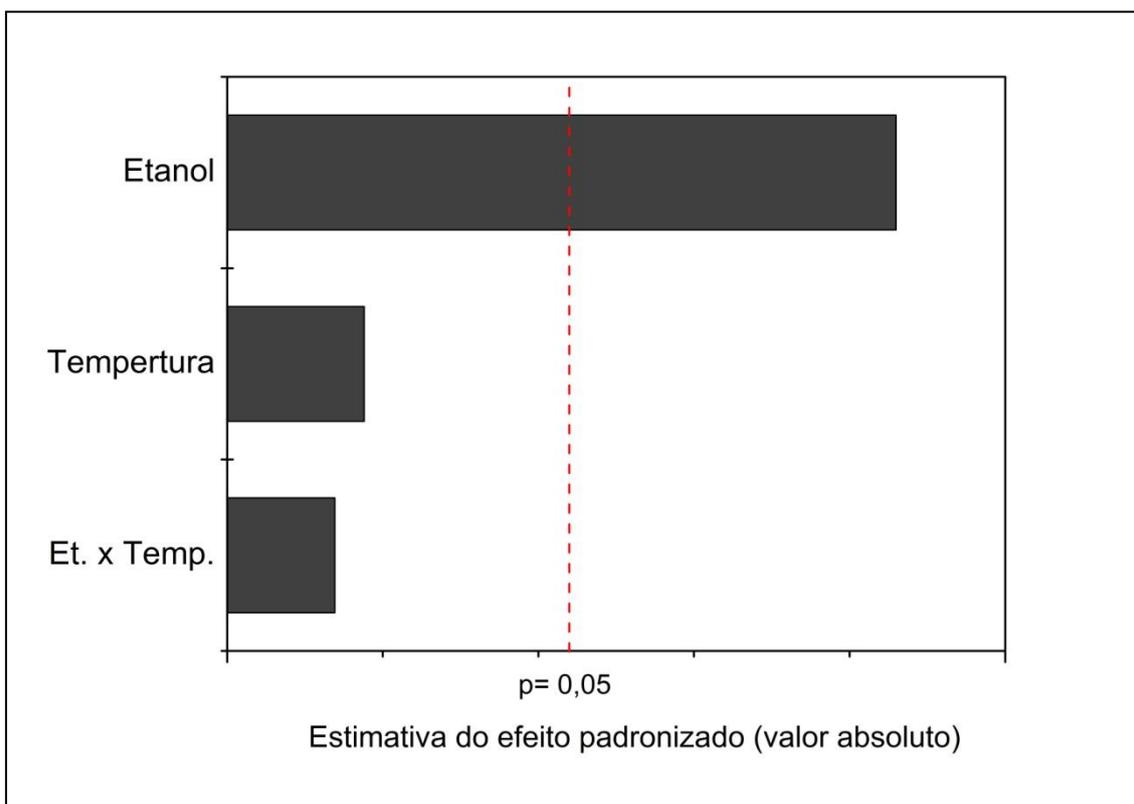


Figura 22 - Gráfico de Pareto dos efeitos para as variáveis pressão e temperatura no rendimento da ESC.

Observa-se que os efeitos da adição de etanol é significativo e positivo, o que explica o aumento médio do rendimento quando é adicionado maior volume de etanol. Da mesma forma, a interação entre as duas variáveis é significativa e positiva, indicando efeito favorável, pois ao aumentar os dois fatores simultaneamente, ocorre um aumento no rendimento da extração.

Os efeitos à esquerda dessa linha são considerados não significativos e os à direita são significativos. Essa linha pode ser alterada de acordo com o limite de confiança escolhido. Para o limite de confiança de 95% (t_2 Tabelado=2,92) a probabilidade de erro é de 5%.

De acordo com a Figura 22 e a Tabela 11, observa-se que o efeito da adição de etanol teve maior significância para o aumento no rendimento das extrações com fluido supercrítico. A temperatura teve em média um efeito positivo, porém não tão significativo, uma vez que a influência da temperatura é resultado de dois efeitos competitivos: o aumento da temperatura aumenta a volatilidade da matriz vegetal e diminui a densidade do solvente.

O modelo estatístico que descreve o rendimento em função das variáveis codificadas é dado pela Equação (38).

$$\hat{y}(x_1, x_2) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (38)$$

Onde $\hat{y}(x_1, x_2)$ é o valor do rendimento calculado pelo modelo; b são estimadores dos parâmetros populacionais e x_1 (temperatura) e x_2 (Adição de etanol) são fatores codificados calculados pelas Equações 39 e 40, respectivamente.

$$x_1 = \frac{T - 45}{10} \quad (39)$$

$$x_2 = \frac{Et - 2,5}{2,5} \quad (40)$$

Nas Equações 39 e 40 temos, T representa a temperatura e Et , a adição de etanol. Os valores de b podem ser estimados através do método dos mínimos quadrados, onde os coeficientes do modelo b_1 ; b_2 ; b_{12} são iguais a metade dos efeitos, já o coeficiente b_0 é igual a média. Assim, obtêm-se a Equação 41.

$$\hat{y}(x_1, x_2) = 0,6601 + 0,0233 x_1 + 0,114125 x_2 + 0,018375x_1x_2 \quad (41)$$

Os valores observados e preditos pelo modelo são mostrados na Figura 21, a seguir:

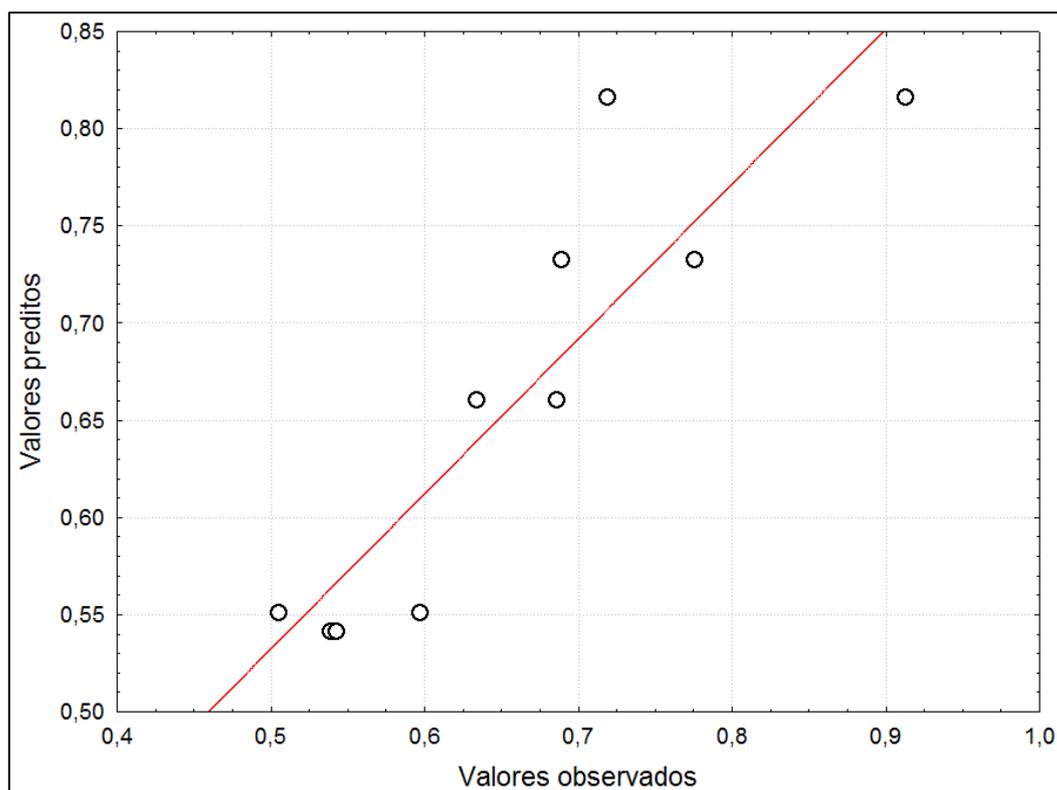


Figura 23 - Gráfico dos valores observados x valores preditos pelo modelo referente ao rendimento das extrações.

A análise de variância (ANOVA) é o método mais usado para avaliar numericamente a qualidade do ajuste. A Tabela 12 apresenta o teste de ANOVA para o modelo completo, a 95% de confiança.

Tabela 12 - Tabela ANOVA a 95% de confiança.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Nº de GL.	Média Quadrática	F calc.	F tab.
Regressão	$1,113 \times 10^{-1}$	3	$3,709 \times 10^{-2}$	7,893	4,757 (3,6)
Resíduo	$2,819 \times 10^{-2}$	6	$4,699 \times 10^{-3}$		
Falta de ajuste	$2,500 \times 10^{-8}$	1	$2,500 \times 10^{-8}$	$4,434 \times 10^{-6}$	6,608 (1,5)
Erro puro	$2,819 \times 10^{-2}$	5	$5,639 \times 10^{-3}$		
Total	$1,395 \times 10^{-2}$	9			

Coeficiente de % de variação explicada: 79,78349
 % máxima de variação explicável: 79,78451

Como o valor de F_{calc} (7,893) é maior do que o F_{tab} (4,757), o modelo é considerado válido no nível de significância de 5% e representa bem os resultados experimentais obtidos, dentro da faixa estabelecida nos níveis para as variáveis em estudo para a resposta rendimento. O modelo obtido pela regressão linear é apresentado na Equação (41), sendo que ele explica 79% das variações entre os valores experimentais e os previstos, indicando ótima concordância.

A Figura 24 apresenta a superfície de resposta para o rendimento da extração com fluido supercrítico, a partir da variação da adição de etanol e temperatura. Pode-se observar que a região com melhores resultados está localizada nas condições de maior volume de etanol e temperatura.

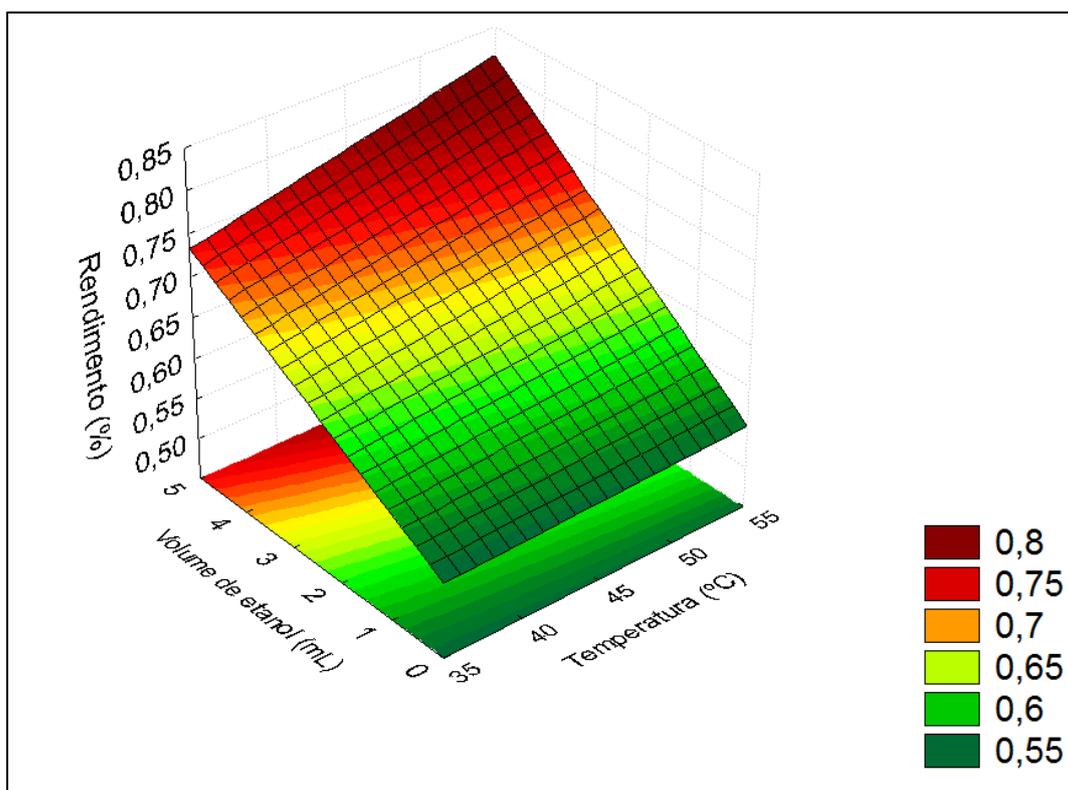


Figura 24 - Superfície de resposta e Curvas de níveis para o rendimento da ESC.

Pode-se observar na superfície de resposta e nas curvas de níveis que para os níveis das variáveis estudados, os maiores rendimentos são obtidos na região onde há maior quantidade de solvente e temperatura mais elevada, demonstrando que existe uma grande influência do volume de etanol adicionado na extração com fluido supercrítico.

5.4 Modelagem Matemática da Extração Supercrítica

Os parâmetros utilizados para a modelagem matemática da cinética de extração foram: concentração inicial de óleo, (dada pela razão entre a massa de óleo nas sementes, com base no maior rendimento, e a massa de sólido inerte), densidade real da amostra, porosidade do leito, densidade do leito, massa de material inerte, a densidade do solvente e a solubilidade. Os resultados dos dados citados acima se encontram na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros utilizados para a modelagem matemática da cinética de extração.

Parâmetros analisados	Valores utilizados
Concentração inicial de óleo ($\text{g}_{\text{óleo}} \cdot \text{g}_{\text{sólido}}^{-1}$)	0,0039
Densidade real da casca de romã (g/cm^3)	1,4733
Densidade do leito (g/cm^3)	0,5105
Porosidade do Leito	0,6535
	35 °C: 0,8657;
Densidade do solvente CO ₂ (g/cm^3)	45 °C: 0,8127;
	55 °C: 0,7546;
Massa de Inerte (g)	24,5622

5.4.1 Solubilidade

A solubilidade determina a quantidade máxima de soluto (extrato) que pode ser solubilizado em determinadas condições, é utilizada para modelagem dos dados experimentais. Para garantir um tempo de contato suficiente entre a matriz vegetal e o FSC e permitir a saturação do solvente com o óleo na saída do extrator é necessário que a coluna de extração seja suficientemente longa ou que a vazão de solvente suficientemente baixa. Desta forma, quanto maior a solubilidade do soluto no solvente maior será a quantidade de produto extraído.

Os valores de solubilidade foram determinados a partir da inclinação da reta tangente à curva de extração na etapa de taxa constante de extração (CER), representando

a quantidade de extrato obtida em função da quantidade de CO₂ consumida durante a etapa CER, estes valores estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Solubilidade do soluto no solvente CO₂.

Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade do CO₂ (g/mL)	Solubilidade (g extrato g sólido⁻¹)
200	35	0,8657	0,0012
200	35	0,8657	0,0022
200	35	0,8657	0,0017
200	45	0,8127	0,0012
200	45	0,8127	0,0012
200	45	0,8128	0,0031
200	55	0,7546	0,0009
200	55	0,7546	0,0021
200	55	0,7546	0,0024

O aumento da temperatura, a pressão constante, diminui a densidade do solvente, ao mesmo tempo em que aumenta a pressão de vapor do soluto, resultando na inversão da isoterma de rendimento. No entanto, nota-se que a solubilidade do CO₂ teve influencia, além da temperatura, também da adição de solvente modificador, pois é possível verificar o aumento da solubilidade com o aumento da concentração de etanol. A condição 35 °C com 2,5 mL de etanol apresentou um comportamento diferente, sendo a solubilidade superior ao encontrado com 5 mL de etanol, na mesma temperatura. Acredita-se que a dificuldade em controlar e manter a vazão pode ter influenciado nos valores da solubilidade, através de um erro operacional, sendo que a válvula micrométrica não permite um ajuste preciso.

5.5 Modelo cinético de Sovová (1994)

A cinética de extração da casca de romã foi representada pelo modelo de Sovová. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 13 e a solubilidade na Tabela 14.

Os parâmetros ajustados do modelo de Sovová são apresentados na Tabela 15. Onde, o parâmetro r (fração de óleo presente na superfície das células) é constante, pois considera-se a eficiência da moagem da matriz vegetal a mesma devido a utilização da granulometria nos experimentos. O coeficiente de transferência de massa no filme externo (k_{ya}) foi obtido através da Equação 24, utilizando o valor de Z , já o coeficiente de transferência de massa no filme sólido (k_{sa}), foi obtido pela Equação 25.

Tabela 15 - Parâmetros ajustados do modelo de Sovová para as extrações da casca de romã com CO₂ supercrítico.

Amostra	Z	W	r	t_{CER} (min)	t_{FER} (min)	k_{ya} (min ⁻¹)	k_{sa} (min ⁻¹)
A	5,0653	0,050	0,465	11,312	73,507	0,189	1,1x10 ⁻³
B	12,997	0,107	0,465	2,202	33,441	0,486	2,4 x10 ⁻³
C	2,716	0,194	0,465	13,215	56,497	0,105	4,4 x10 ⁻³
D	12,998	0,140	0,465	2,863	45,737	0,515	3,1 x10 ⁻³
E	12,7426	0,119	0,465	4,137	66,374	0,505	2,6 x10 ⁻³
F	8,10047	0,119	0,465	5,207	53,596	0,321	2,6 x10 ⁻³
G	12,9316	0,066	0,465	6,328	99,209	0,474	1,2 x10 ⁻³
H	6,58045	0,143	0,465	5,143	43,258	0,250	2,8 x10 ⁻³
I	9,45623	0,526	0,465	3,362	47,335	0,365	1,0 x10 ⁻³

O modelo de extração proposto por Sovová pode ser dividido em três períodos. De acordo os dados da Tabela 15, o primeiro período, chamado de CER, é o mais rápido, e ocorre entre 2,202 a 13,215min, isso ocorre devido a elevada taxa de extração (k_{ya} entre 0,105 e 0,515 min⁻¹ da fração de óleo exposta diretamente ao solvente ($r = 0,465$).

O segundo período é onde passa a ocorrer transferência de massa por difusão juntamente com a convecção, pois a fração de óleo disponível na superfície das células começa a se esgotar. Essa etapa vai de 33,441 a 99,209 min, a partir de então inicia-se a o terceiro período chamado de DCR, onde a transferência de massa ocorre somente por difusão. O óleo de fácil acesso já foi removido restando apenas o óleo que fica presente na parede celular da matriz vegetal.

Desta forma, a etapa DCR é considerada a etapa limitante da extração, sendo o rendimento final função da taxa de transferência de massa k_{sa} entre 4,4x10⁻³ e 1,0x10⁻³

$^3 \text{ min}^{-1}$. O maior valor de k_{sa} foi encontrado para condição com maior temperatura e maior concentração de etanol (55 °C e 20%), condição esta onde obteve-se maior rendimento de extração.

Os valores da função objetivo, apresentados na Tabela 16 são de grande importância já que indica o erro para cada modelo, assim quanto menor o valor da função objetivo, menor o erro entre os valores do modelo e os dados experimentais. A Tabela 16 mostra os valores da função objetivo bem como o coeficiente de correlação (R^2) para as diferentes condições de extração.

As curvas cinéticas experimentais de extração ajustadas com o modelo de Sovová (1994) são apresentadas nas Figuras 25, 26 e 27 comparando a influência da adição de solvente (etanol) na cinética de extração em temperatura e pressão constante.

O comportamento inicial das curvas é semelhante. Isso porque a quantidade de óleo disponível para a transferência de massa por convecção é constante e o solvente está saturado com o soluto facilmente removível.

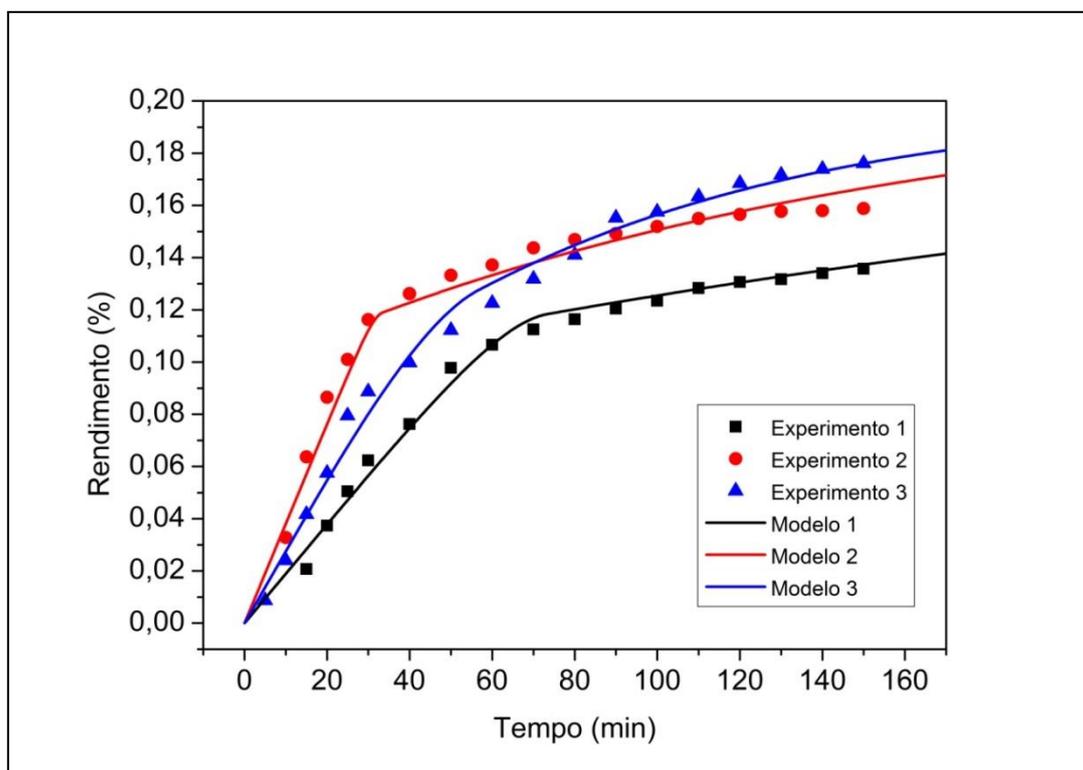


Figura 25- Curva cinética experimental e modelo de Sovová (1994) das extrações supercrítica da casca de romã (Temperatura de 35 °C e variação do volume de etanol (1) 0 mL; (2) 2,5 mL e (3) 5 mL).

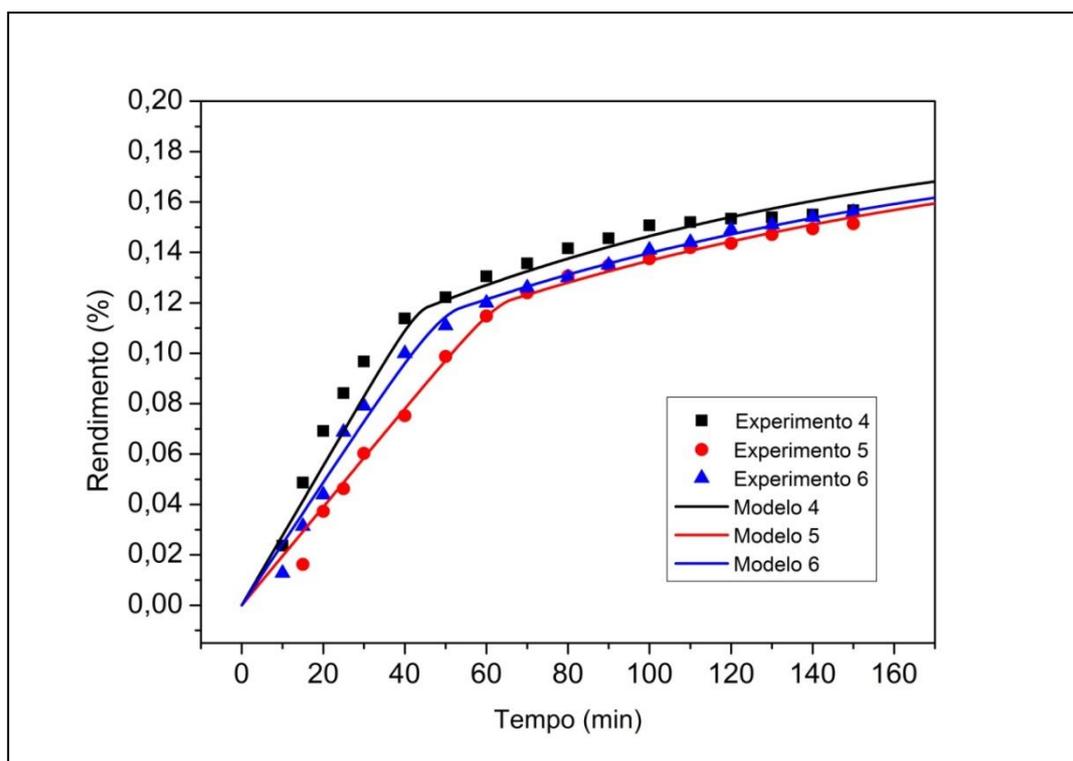


Figura 26 - Curva cinética experimental e modelo de Sovová (1994) das extrações supercrítica da casca de romã (Temperatura de 45 °C e variação do volume de etanol (4) 0 mL; (5) 2,5 mL e (6) 5 mL).

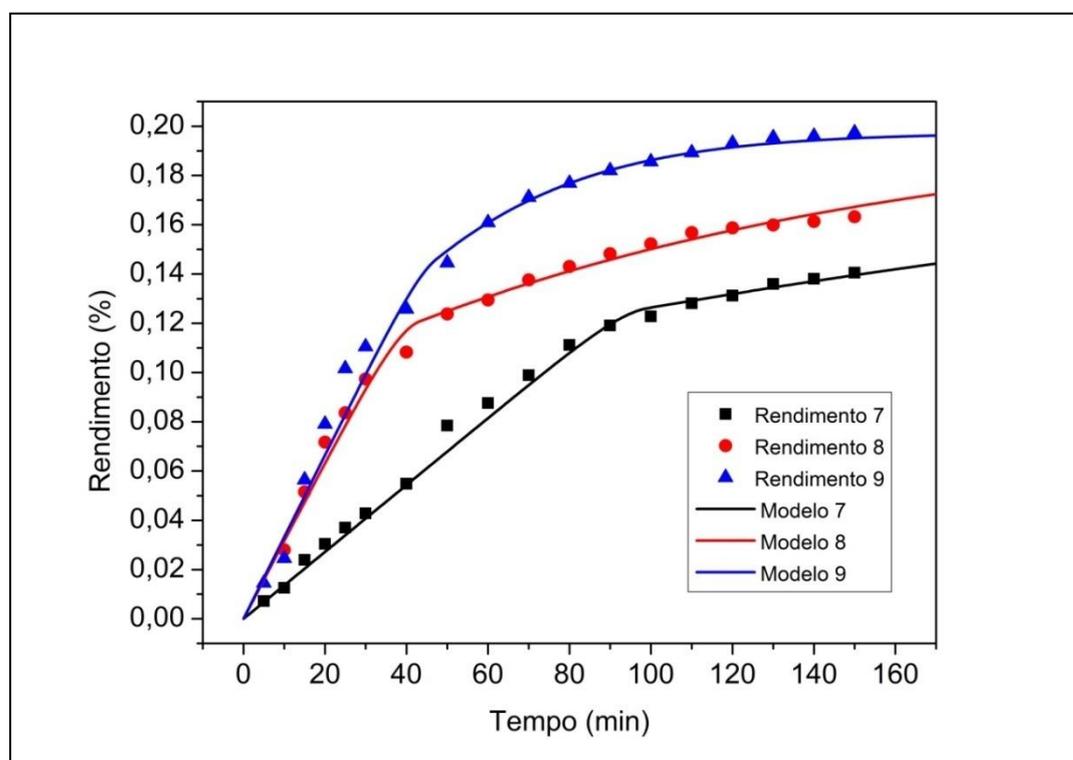


Figura 27 - Curva cinética experimental e modelo de Sovová (1994) das extrações supercrítica da casca de romã (Temperatura de 55 °C e variação do volume de etanol (7) 0 mL; (8) 2,5 mL e (9) 5 mL).

Nota-se que nas temperaturas de 35 °C e 55 °C houve maior separação das curvas, mostrando uma variação maior no rendimento da extração conforme o aumento da quantidade de solvente adicionado. Enquanto que na temperatura de 45 °C as curvas tiveram um comportamento muito parecido em seu rendimento apesar da adição de cossolvente.

Os indicadores estatísticos da modelagem matemática (desvio médio absoluto – DMA, função objetivo e coeficiente de determinação – R^2) são apresentados na Tabela 16. O modelo de Sovová (1994) apresentou bom ajuste aos dados experimentais, com erro médio absoluto máximo de 9,27 %.

Tabela 16 - Indicadores estatísticos da modelagem matemática.

Temperatura (°C)	Etanol (mL)	Desvio médio absoluto	Função objetivo	R^2
35	0	4,7606	0,000191	0,9910
35	2,5	4,9048	0,000452	0,9793
35	5	7,7330	0,000475	0,9905
45	0	7,1456	0,000864	0,9681
45	2,5	7,1963	0,000217	0,9929
45	5	9,2732	0,000323	0,9904
55	0	5,4018	0,000232	0,9940
55	2,5	4,2289	0,000280	0,9900
55	5	6,7904	0,000824	0,9871

Como pode ser observado na Tabela 16, os valores da função objetivo são baixos, representando desta forma, uma boa aproximação dos dados do modelo com os experimentais, sendo assim, possível a determinação das curvas cinéticas das extrações experimentais e simuladas usando o modelo proposto por Sovová (1994).

5.6 Composição química dos Extratos

5.6.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas (CG-EM) embora seja uma análise qualitativa, a mesma permite determinar o perfil químico dos

extratos da casca de romã, autores como Steingass *et al.* (2015) e Othman *et al.* (2015) e empregaram o método CG-EM para a análise de componentes como ácidos fenólicos e flavonóides. A Tabela 17 mostra os principais compostos presentes nos extratos da casca de romã obtidos pelo método de extração Supercrítica e a Tabela 18 demonstra os principais compostos presentes nos extratos pelo método convencional de extração (Soxhlet e Goldfish).

É possível perceber a diversidade de compostos presente nos extratos da casca de romã. Dentre os ácido graxos verificou-se a presença de ácido oléico (ácido graxo monossaturado) nos extratos supercrítico A (35 °C/0 mL), B (35 °C/2,5 mL), C (35 °C/5 mL), E (45 °C/2,5 mL), F(45 °C/5 mL) e I (55 °C/5 mL). Nos extratos convencionais pelo método Soxhlet o ácido oléico foi identificado nas amostras K (SoxAcet) e L (SoxHex) e no método com extrator de óleos e gorduras - Goldfish nas amostras M (ExtEt) e O (ExtHex). O ácido linoléico (ácido graxo poli-insaturado) e o ácido palmítico (ácido graxo saturado) foram detectados em todos os extratos.

O termo vitamina E é utilizado para os tocoferóis e tocotrienóis, são classificados em isômeros α , β , γ e δ (TRABER; SIES, 1996). Nos extratos supercrítico da casca de romã foi possível encontrar as espécies, α -tocoferol em todas as amostras exceto na amostra E, que por sua vez possui o β -tocoferol bem como na amostra I. O γ -tocoferol foi detectado nas amostras A (35 °C/0 mL), B (35 °C/2,5 mL) e C (35 °C/5 mL). Já os extratos convencionais apresentaram apenas o α -tocoferol nas amostras K (SoxAcet), L (SoxHex), N (ExtAcet) e O (ExtHex), com porcentagem de área relativa inferior quando comparado aos extratos supercríticos .

Os tocoferóis são considerados os principais compostos inibidores da peroxidação lipídica, possui propriedades que eliminam espécies reativas de oxigênio, como o ânion radical superóxido, oxigênio singlete ou óxido nítrico. Devido à reatividade com radicais peroxila, a vitamina E possui como principal função sua atividade antioxidante (LIEBLER *et al.*, 1999).

O esqualeno ($C_{30}H_{50}$) é um triterpenóide, é um lipídio natural com uma estrutura isoprenóide pertencente à família dos terpenóides. É encontrado em um grande número de plantas em quantidades altamente variáveis (LOU-BONAFONTE *et al.*, 2018). Foi possível verificar a presença do Pentacosane em todos os extratos supercrítico, enquanto que nos extratos convencionais apenas as amostras K, L e M, representados em menor quantidade quando comparados aos supercríticos.

Segundo Caligiani *et al.* (2010) o óleo da semente de *Punica granatum* L. (romã) possui entre 828-1449 mg.Kg⁻¹ de esqualeno. Quanto a sua atividade oxidativa, há uma grande quantidade de evidências que sugerem que o esqualeno inibe a degradação térmica. Segundo Rigane *et al.* (2013) a adição de esqualeno ao azeite refinado resulta em maior estabilidade durante o armazenamento a longo prazo.

O pentacosane (pentacosano) é um hidrocarboneto saturado alifático, sendo estes praticamente não reativos (TULLOCH, 1976). Encontra-se presente em todos os extratos supercríticos enquanto nos extratos convencionais apenas a amostra O apresentou o composto Pentacosane, sendo este a maior porcentagem de área relativa para este composto dentre os extratos analisados, ainda esta amostra foi à única que não apresentou o composto 5-Hidroximetilfurfural, este é um composto orgânico, constituído por um anel de furano ligado aos grupos aldeído e álcool (ROSATELLA, *et al.*, 2011).

O 5-Hidroximetilfurfural é produzido pela desidratação de açúcares, reação de Maillard, possui segundo Cheriote *et al.* (2009) certa capacidade antioxidante. Ainda, segundo Kataoka (2005) possui capacidade de inibir a peroxidação lipídica pelos radicais de oxigênio. Neste trabalho o 5-Hidroximetilfurfural esta presente em todos os extratos analisados, com exceção dos extratos L (SoxHex) e O (ExtHex), ambos obtidos a partir da extração convencional com solvente hexano. Cheyad e Salmam (2017) encontraram o 5-Hidroximetilfurfural entre os compostos majoritários na análise cromatográfica no extrato metanólico da casca de romã.

O γ -Sitosterol, assim como o β -Sitosterol pertencem à classe dos fitoesteróis, estando presente em diversas plantas. São estereoisômeros diferindo apenas na configuração espacial do carbono C-17. O γ -Sitosterol possui propriedades medicinais como antimicrobiana, antifúngico, anti-inflamatória. (BALAMURUGAN *et al.*, 2011, TRIPATHI *et al.*, 2013). A atividade antioxidante é relatada principalmente para o β -Sitosterol. Não há relatos na literatura da presença do γ -Sitosterol na casca de romã, no entanto o β -Sitosterol foi relatado por Fernandes *et al.*, (2015), Promprom *et al.* (2010). Dentre os extratos apenas o K (SoxAcet) e N (ExtAcet) não identificaram presença do γ -Sitosterol.

O composto Ciclononasiloxano, octadecametil foi observado nas amostras K (SoxAcet) e N (ExtAcet) com uma elevada porcentagem de área relativa. Este composto pertence ao siloxanos cíclicos possui ligações Si-O (LEE SMITH, 1991). Os siloxanos são estáveis para reagentes térmicos e químicos e possuem excelente resistência ao envelhecimento, hidrofobicidade e isolamento elétrico.

Tabela 17- Principais compostos presentes nos extratos supercríticos da casca de romã.

Amostra	Área (%)						
	5 Hidroxi metil furfural	Esqualeno	Pentacosane	β - Tocoferol	γ - Tocoferol	α - Tocoferol	γ - Sitosterol
A	3,85	16,09	9,34	-----	5,61	16,89	10,77
B	6,30	17,34	17,71	-----	6,36	13,56	9,47
C	11,58	15,31	10,7	-----	5,31	12,84	11,16
D	1,29	4,79	24,92	-----	-----	10,01	4,87
E	1,45	3,82	26,46	0,15	-----	-----	6,32
F	0,33	4,72	26,19	-----	-----	11,83	7,32
G	1,19	5,82	31,05	-----	-----	11,39	5,83
H	2,13	5,92	27,69	-----	-----	11,28	5,93
I	0,44	3,37	24,9	0,15	-----	12,41	8,87

Tabela 18- Principais compostos presentes nos extratos convencionais da casca de romã nos solventes etanol, acetato de etila e hexano.

Amostra	Área (%)					
	5 Hidroxi metil furfural	Ciclononasilo- xano octadecametil	Escaleno	Pentacosane	α - Tocoferol	γ - Sitosterol
J	13,45	-----	-----	-----	-----	0,27
K	11,80	28,09	0,69	-----	2,21	-----
L	-----	-----	0,34	-----	0,7	3,81
M	31,86	-----	0,24	-----	-----	0,55
N	1,27	33,11	-----	-----	0,67	-----
O	-----	-----	-----	38,60	6,71	11,67

5.6.2 Determinação do Teor de Compostos fenólicos totais (TFT) método FolinCiocalteu

O método para determinar o teor de fenóis utilizando o reagente FolinCiocalteu, é um dos mais utilizados pelos pesquisadores. Este reagente é uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico, onde o molibdênio e o tungstênio se encontram em um estado de oxidação +6. Na presença de agentes redutores, ocorre a formação de molibdênio e tungstênio azul, cujo estado de oxidação se encontra entre +5 e +6, respectivamente. Esta mudança na coloração permite que, através da absorbância, seja determinada a concentração de substâncias redutoras, como os compostos de natureza fenólica (CHAVES *et al.*, 2010).

Através das diluições realizadas conforme metodologia, foi possível montar a curva de calibração com $R^2 = 0,9999$, conforme Figura 28. O coeficiente de correlação, alto mostra que o gráfico possui linearidade satisfatória para análise dos compostos fenólicos nos extratos da casca de romã.

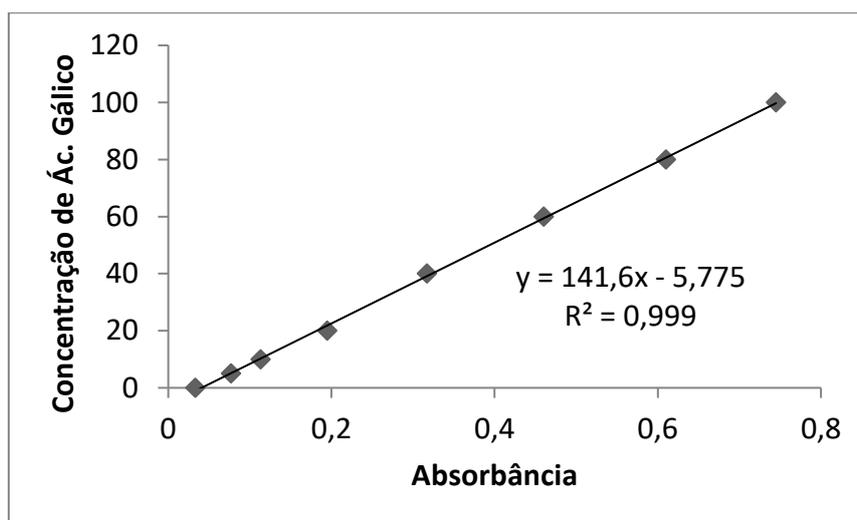


Figura 28 - Curva padrão Ácido Gálico.

A partir do gráfico e dos valores de absorbância obtidos na análise dos extratos pode-se calcular com o auxílio da Equação da reta $y = 141,6 \cdot x - 5,775$, onde y é a absorbância para cada amostra analisada e x representa o teor de compostos fenólicos totais (TFT) dos extratos expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Os resultados encontrados para as extrações supercríticas e convencionais estão expostos na Tabela 17.

Tabela 19 - Teor de fenólicos totais para os extratos de casca de romã.

Amostra	Condição	TFT (mg de EAG/g de extrato)
A	SC35/0	21,56±0,011
B	SC35/2,5	40,59±0,012
C	SC35/5	49,70±0,011
D	SC45/0	22,08±0,004
E	SC45/2,5	38,80±0,004
F	SC45/5	35,30±0,001
G	SC55/0	40,21±0,006
H	SC55/2,5	39,93±0,06
I	SC55/5	41,02±0,010
J	SoxEt	80,35±0,020
K	SoxAcet	67,69±0,008
L	SoxHex	13,11±0,010
M	ExtEt	98,62±0,007
N	ExtAcet	45,88±0,001
O	ExtHex	14,91±0,004

De acordo com os valores encontrados nota-se que as amostras extraídas pelos métodos convencionais com Soxhlet e extrator de gordura, utilizando solvente etanol apresentaram os valores mais altos de TFT, seguida pela extração com o solvente acetato de etila. A extração com o solvente hexano apresentou o menor valor para o teor de compostos fenólicos dentre todas as outras extrações, sendo 13,11±0,010 e 14,91±0,004 mg de EAG/g de extrato, respectivamente. As amostras obtidas pelo método extração supercrítica apresentaram valores que variaram de 21,56±0,011 e 49,70±0,011 mg de EAG/g de extrato.

A variação dos resultados encontrados para o teor de compostos fenólicos é encontrado em diversos estudos referente à casca da romã. A composição química das plantas é influenciada pelo tipo de solo, local de origem, época de colheita e maturação, sendo estes fatores que interferem na quantidade de compostos fenólicos existentes na casca de romã (FADAVI *et al.* 2004; ORAK *et al.* 2012).

Akhtar *et al.*,(2014), Orak *et al.*, (2012), Fischer *et al* (2011) e Li *et al.*, (2009) estudaram os compostos da romã, e relataram maior teor de fenólicos totais e flavonóides principalmente no extrato da casca da romã quando comparada com o extrato do suco da fruta.

O teor de compostos fenólicos encontrados nas diferentes extrações da casca da romã neste trabalho, demonstraram valores comparáveis aos relatados por outros pesquisadores. Mansour e colaboradores (2013) encontraram valores entre 82,00 a 230,40 mg de EAG/ g de extrato metanólico e de 40,80 a 59,80 mg de EAG/ g de extrato de água. Rummun *et al.* (2013) encontraram no extrato metanólico da casca de romã, valores de fenóis totais equivalente a 190,27 mg GAE.g⁻¹. Manasathien *et al.*, (2012) encontrou valores de 380,54 mg EAG.mg⁻¹ para o extrato aquoso da casca da romã.

Arun *et al.*, 2017 relatou alto teor de compostos fenólicos no extrato metanólico da casca de romã (841,5 mg EAG / g de extrato) quando comparado ao extrato com acetato de etila (259,3 mg EAG / g de extrato). Shams Ardekani *et al.*, (2011) estudaram o extrato da casca de romã pelo método de extração Soxhlet com solvente acetato de etila, e obtiveram valores superiores aos encontrados nesse trabalho, que variaram de 98,24 a 250,13 mg de EAG / g de extrato e Mushtaq *et al.*, (2015) relatou valor de 301,53 mg de EAG/g de extrato obtido por extração com fluido supercrítico auxiliado por coenzima (3,8%) a 49 °C e pH 6,7 por 85 min.

Para extratos etanólicos da casca da romã, diversos autores relataram valores com uma variação muito grande entre seus valores e superiores aos encontrados nesse trabalho. Oliveira *et al.* (2017) encontraram valores de 126,50 mg EAG.g⁻¹. Manasathien *et al.* (2012) relataram valores de 449,60 mg EAG.mg⁻¹. Morais *et al.* (2009) encontraram 135,89 mg EAG.mg⁻¹.

Os diferentes resultados encontrados para o teor de compostos fenólicos na casca de romã, esta relacionado com a utilização de diferentes solventes e técnicas de extrações, bem como a origem e a forma de cultivo da matéria-prima analisada. A *Punica granatum* L. apresenta composição química extremamente complexa, no entanto todos os estudos mostram um valor considerado elevado de compostos fenólicos na mesma, confirmando sua possível utilização como composto atividade antioxidante.

Singh *et al.*, 2002 relatou diversos estudos referente ao teor de compostos fenólicos para a casca de romã. Foi possível observar que a variação no teor de compostos fenólicos presentes casca de romã varia de acordo com a região de origem, método de extração e o solvente utilizado. O mesmo foi possível visualizar neste trabalho.

5.6.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

O método DPPH• é utilizado em mais de 90% dos estudos que avaliam a capacidade antioxidante de substâncias, sejam elas puras, misturas ou matrizes complexas. O resultado encontrado através da Equação (37) refere-se à quantidade de antioxidante necessária para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH• em 50%, chamado de EC₅₀. (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; CHEN *et al.* 2013).

Desenvolvido em 1958 por Blois, o método DPPH• vem sofrendo muitas modificações e adaptações em seus procedimentos por diversos pesquisadores, tais como diferentes concentrações iniciais, diferentes solventes para dissolver o DPPH•, diferentes tempos de reação e absorvância. Como consequência os resultados são representador de formas diferentes, dificultando a comparação entre estudos (OLIVEIRA, 2015; CHEN *et al.* 2013; FISHER *et al.* 2011).

Os extratos foram diluídos conforme metodologia descrita nas concentrações de 1000 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹ e 150 µg.mL⁻¹, todos os ensaios foram realizados em triplicata onde foi possível encontrar a equação da reta para cada amostra e seu respectivo coeficiente de correlação, e por fim calcular a atividade antioxidante (%) e sua capacidade de reduzir 50% da concentração do radical DPPH• (EC₅₀). Os resultados foram expressos na Tabela 18.

Quanto menor o valor do EC₅₀ maior será a atividade antioxidante do extrato, para uma pequena concentração do extrato há uma redução na concentração do radical DPPH• em 50%, mostrando uma alta atividade antioxidante do mesmo.

A elevada atividade antioxidante de casca de romã também já foi reportada por Fisher *et al.* (2011). Segundo esses autores, a atividade, medida pelos métodos ABTS e FRAP correlacionam com o conteúdo de fenólicos totais presentes na amostra. Verificaram que tanto o Teor de Fenólicos Totais (TFT) quanto a Atividade Antioxidante (AA) para a casca da romã foram maiores do que para o suco da fruta.

Tabela 20 – Atividade antioxidante dos extratos de casca de romã na concentração de 1000 µg.mL⁻¹ e a capacidade de redução de 50% do radical DPPH• (EC₅₀).

Amostra	Condição	EC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	R ²	AA(%)
		±Desvio Padrão		1000 µg.mL ⁻¹

A	SC35;0	14,98 ± 0,003	0,9371	11,02 ± 0,001
B	SC35;2,5	10,11 ± 0,003	0,9820	12,44 ± 0,001
C	SC35;5	3,59 ± 0,003	0,9971	19,85 ± 0,004
D	SC45;0	16,70 ± 0,002	0,9974	11,06 ± 0,001
E	SC45;2,5	9,15 ± 0,002	0,9579	8,69 ± 0,002
F	SC45;5	2,88 ± 0,005	0,9949	20,42 ± 0,008
G	SC55;0	15,24 ± 0,001	0,9746	6,51 ± 0,002
O	SC55;2,5	10,12 ± 0,002	0,9712	8,36 ± 0,002
I	SC55;5	1,68 ± 0,007	0,9937	31,58 ± 0,004
J	SoxEt	0,32 ± 0,001	0,9002	91,45 ± 0,001
K	SoxAcet	0,35 ± 0,004	0,9267	94,16 ± 0,001
L	SoxHex	6,23 ± 0,001	0,9369	11,54 ± 0,001
M	ExtEt	0,23 ± 0,002	0,9028	92,26 ± 0,002
N	ExtAcet	0,43 ± 0,044	0,9909	93,35 ± 0,002
O	ExtHex	8,27 ± 0,001	0,9856	7,93 ± 0,002

Ambas as amostras extraídas com os solventes etanol e acetato de etila, obtidas com o extrator Soxhlet e extrator de gordura, apresentaram os menores valores de EC₅₀, bem como as maiores atividade antioxidantes, sendo a amostra três a maior entre elas com uma AA de 93,35%±0,002. Para os extratos obtidos a partir da extração supercrítica, em todas as temperaturas as amostras com 5 mL de etanol foram as que apresentaram maior atividade antioxidante, sendo a temperatura mais elevada, de 55 °C a que apresentou maior atividade antioxidante (31,58%±0,004) entre as extrações supercrítica.

Alguns autores relataram valores para atividade antioxidante, próximos aos encontrados neste trabalho. Singh *et al.*, (2002) avaliaram o extrato metanólico de casca de romã e obtiveram atividade antioxidante de 81%. Silva *et al.*, (2013) 80,15% de inibição do radical DPPH•. Abid *et al.* (2017) encontrou valores que variaram de 71,11% a 84,16% de inibição do radical DPPH• para diferentes cultivos da casca de romã em extrato aquoso, variação de 71,73% a 96,73% para extratos etanólicos e variação de 77,31% a 97,82% para extratos acetônicos.

Moreira *et al.* (2014), encontraram valores de EC₅₀ iguais a 378,80µg.mL⁻¹ para o extrato hidroalcolico, próximo aos valores alcançados neste trabalho, com os

extratos de acetato de etila e etanol pelo método Soxhlet. Manasathien *et al.*, (2012) e Sousa de Sá (2012) encontraram valores EC_{50} para o extrato etanólico da casca de romã iguais a $121,65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a $47,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Valores de $69,49 \pm 9,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram encontrados por Sousa de Sá (2012) para o extrato com acetato de etila e maiores que $243 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para extratos hexânicos e clorofórmicos.

Muller, Frojlich e Bohm (2011) acreditam que alguns compostos, por serem lipofílicos, não reagem frente ao radical DPPH•. Desta forma, devido à sensibilidade de cada método utilizado na extração dos compostos, bem como para determinação da atividade antioxidante, os resultados podem ser divergentes entre si.

Fisher *et al.*, (2011) reportou elevada atividade antioxidante da casca da romã e correlacionou com o conteúdo de fenólicos totais presentes na amostra. Essa tendência também foi encontrada nesse trabalho, tendo em vista que as amostras J (SoxEt); K (SoxAcet); e M (ExtEt) apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante.

5.7 Estabilidade oxidativa do Biodiesel – Determinação do Período de indução.

5.7.1 Rancimat

No método Rancimat, o fluxo intenso de oxigênio e a temperatura elevada causam vaporização e o arraste de moléculas de ácidos graxos de baixo peso molecular para a água, favorecendo a oxidação acelerada e indicando o período de indução oxidativa. O gráfico condutividade *versus* o tempo para as amostras submetidas a esse método para o biodiesel sem adição de antioxidante está ilustrado na Figura 29.

O tempo de indução de um óleo é o tempo para se atingir nível de rancidez detectável ou surpreendente mudança na taxa de oxidação (Frankel, 1984; Antoniassi, 2001). O tempo de indução encontrado para a amostra controle, de biodiesel puro, foi de 4,38 horas, valores este abaixo do limite mínimo estabelecido pela Resolução nº 45/2014 da ANP, que é de 8 horas. É possível encontrar relatos de diversos pesquisadores sobre a

baixa estabilidade oxidativa em combustíveis derivados de óleos vegetais e a utilização de antioxidantes sintéticos e/ou naturais para aumentar a estabilidade oxidativa dos mesmos e tornar possível sua comercialização.

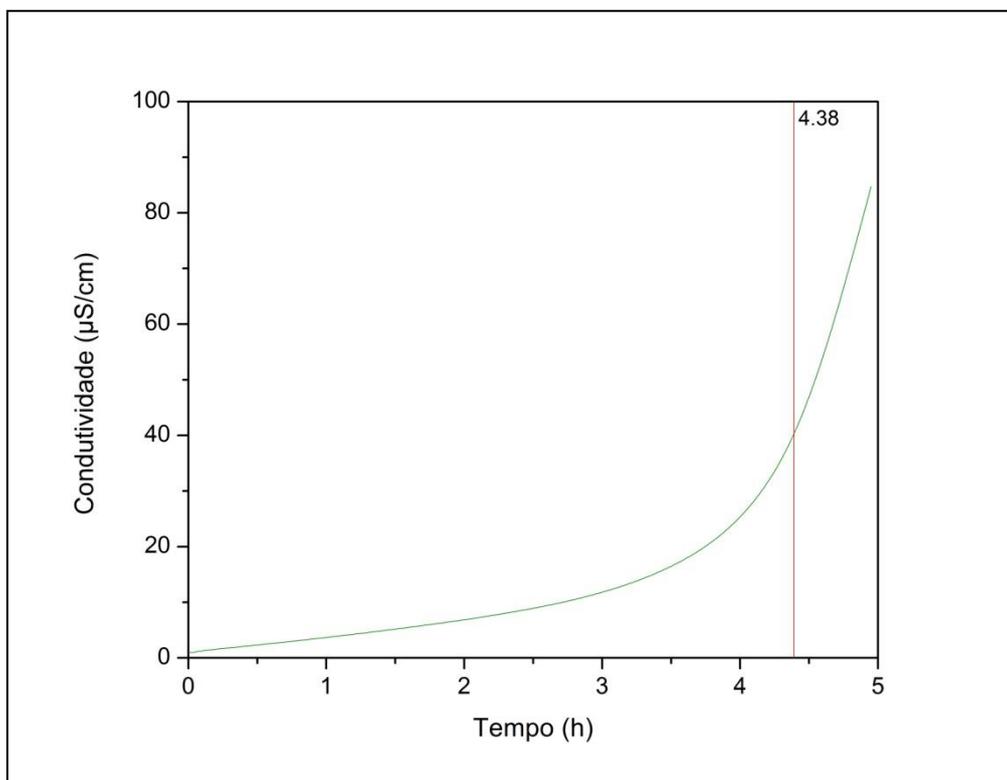


Figura 29 - Gráfico da condutividade em função do tempo, da avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel comercial (controle) sem adição de antioxidantes.

Os antioxidantes sintéticos BHT (butil-hidroxi-tolueno) e BHA (butil-hidroxi-anisol) foram adicionados na concentração de 1000 ppm, ao biodiesel para fins de elevar o ponto de indução comparação com o antioxidante da casca de romã oriunda das extrações. O gráfico onde mostra o tempo de indução encontrado para o biodiesel com adição de BHA e BHT (1000 ppm) esta representado na Figura 30, sendo obtido um tempo de 6,91 e 7,86 horas, respectivamente. Apesar do tempo de indução não atingir o exigido pela ANP, de 8 horas ambos demonstraram eficiência. O valor inferior encontrado para o antioxidante sintético BHA, quando comparado ao BHT, esta relacionado com o seu maior potencial antioxidante em gorduras animais do que em óleos vegetais.

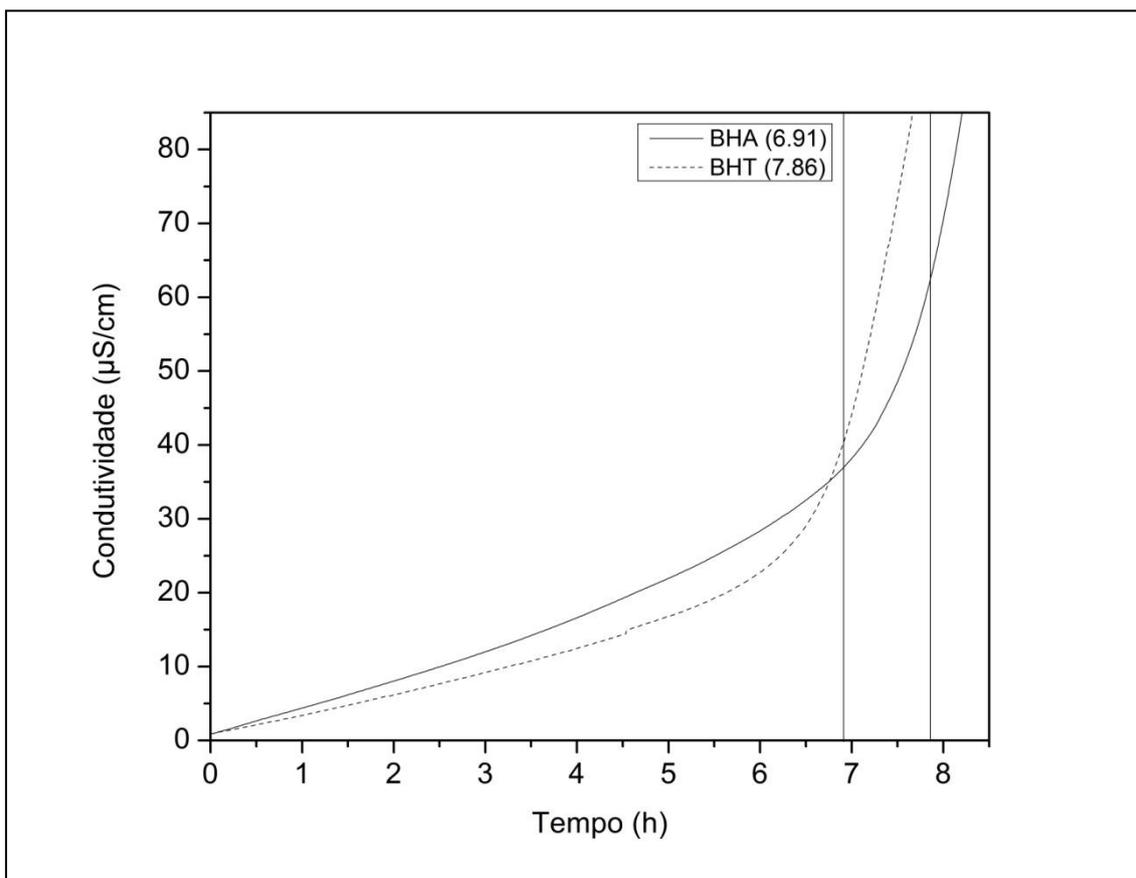


Figura 30 - Gráfico que indica o tempo de indução do biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT.

O aumento no tempo de indução quando da adição de antioxidantes sintéticos no biodiesel, é relatado por diversos autores, entre eles estão Mittelbach e Schober (2003), Liang *et al.*, (2006), Domingos *et al.*, (2007), De Guzman *et al* (2009), Ferrari e Souza (2009) que utilizaram em diferentes concentrações nos biodieseis os antioxidantes sintéticos BHA e BHT e relataram o aumento da estabilidade oxidativa quando comparado ao biodiesel puro.

Os extratos da casca de romã foram adicionados ao biodiesel, segundo metodologia descrita, na concentração de 1000 ppm, sendo os resultados expressos na Tabela 21.

Tabela 21- Tempo de indução obtido na análise Rancimat para as amostras de biodiesel aditivadas com os extratos da casca de romã.

Amostra	Condição	Tempo de Indução (h) (Desvio padrão \pm 0,11)
Biodiesel	--	4,38
A	SC35/0	4,29
B	SC35/2,5	5,46
C	SC35/5	8,01
D	SC45/0	4,72
E	SC45/2,5	5,24
F	SC45/5	7,21
G	SC55/0	4,93
H	SC55/2,5	5,51
I	SC55/5	7,77
J	SoxEt	5,94
K	SoxAcet	11,01
L	SoxHex	5,12
M	ExtEt	6,33
N	ExtAcet	11,13
O	ExtHex	4,58

Para avaliar a estabilidade oxidativa ou a susceptibilidade à oxidação dos extratos da casca de romã acrescidos de antioxidantes foi submetido ao teste de oxidação acelerada pelo equipamento Rancimat na mesma concentração avaliada para os antioxidantes sintéticos. Os extratos com o solvente acetato de etila apresentaram tempo de indução bem superior ao encontrado para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT. O extrato obtido através da extração convencional Soxhlet obteve um tempo de indução de 11,01 horas enquanto o obtido pela extração com extrator de gordura o tempo de indução foi de 11,13 horas.

Dos extratos obtidos através da extração supercrítica, apenas um deles teve tempo de indução de acordo com o previsto na legislação, sendo a amostra C, com adição de 5 mL de cossolvente etanol na temperatura de 35°C, obteve o tempo de indução igual a 8,01 horas, desconsiderando desvio padrão negativo. Ainda foi possível notar que a adição de etanol como cossolvente influenciou positivamente no aumento do tempo de indução. Já o aumento da temperatura de extração não influenciou no aumento do tempo de indução, tendo em vista que os dois maiores valores foram na menor (35°C) e maior (55°C) temperatura, 8,01 e 7,77 respectivamente.

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos referentes ao uso de antioxidantes naturais no biodiesel de diversas origens, no entanto o extrato da casca de romã nunca foi utilizado para essa finalidade. Araújo *et al.* (2011) utilizou a Casca da Castanha de Caju, na concentração de 2000 ppm, como antioxidante natural no biodiesel de Garampara e encontrou um tempo de indução de 6,02 horas. Bastos *et al.*, 2013 utilizou na concentração de 3000 ppm o extrato etanólico de manjeriço no biodiesel de soja e obteve 5,97 horas como tempo de indução. Bastos *et al.* (2013) utilizou na concentração de 3000 ppm o extrato etanólico de casca de Buriti e folhas de manjeriço e encontrou tempo de indução igual a 4,80 hora e 5,97 horas, respectivamente.

Santos (2014) utilizou extratos de acerola e hortelã como antioxidante natural para o biodiesel de soja, e obteve valores maiores do tempo de indução para o extrato obtido pelo método Soxhlet com solvente hexano quando comparado com o solvente etanol. Ambos os extratos obtidos pela extração supercrítica, nas condições de maior temperatura (60 °C) e pressão (250 bar), apresentaram maior tempo de indução quando adicionados ao biodiesel.

Todos os extratos utilizados, com exceção da amostra A (35 °C e 0 mL) elevaram a estabilidade oxidativa do biodiesel, como pode ser visto na comparação do tempo de indução para cada extrato (Figura 31). Os extratos obtidos, neste trabalho, pelo método de extração supercrítica elevaram o tempo de indução do biodiesel conforme a o aumento da adição de etanol, confirmando que a utilização de cossolvente aumenta a extração de compostos antioxidantes.

Apesar de estudos que comprovem sua ação antioxidante, bem como seu alto teor de compostos fenólicos, não há trabalhos que usem a casca de romã como antioxidante natural para o biodiesel. Os resultados obtidos neste trabalho, em concentração de 1000 ppm para as amostras C (35 °C, 0 mL), K (SoxAcet) e N (ExtAcet) foram superiores ao esperado pela resolução ANP nº45/2014 de 11 horas. Ainda, em comparação com estudos citados acima nota-se que, mesmo em menor concentração (1000 ppm) os resultados obtidos foram superiores. REVER

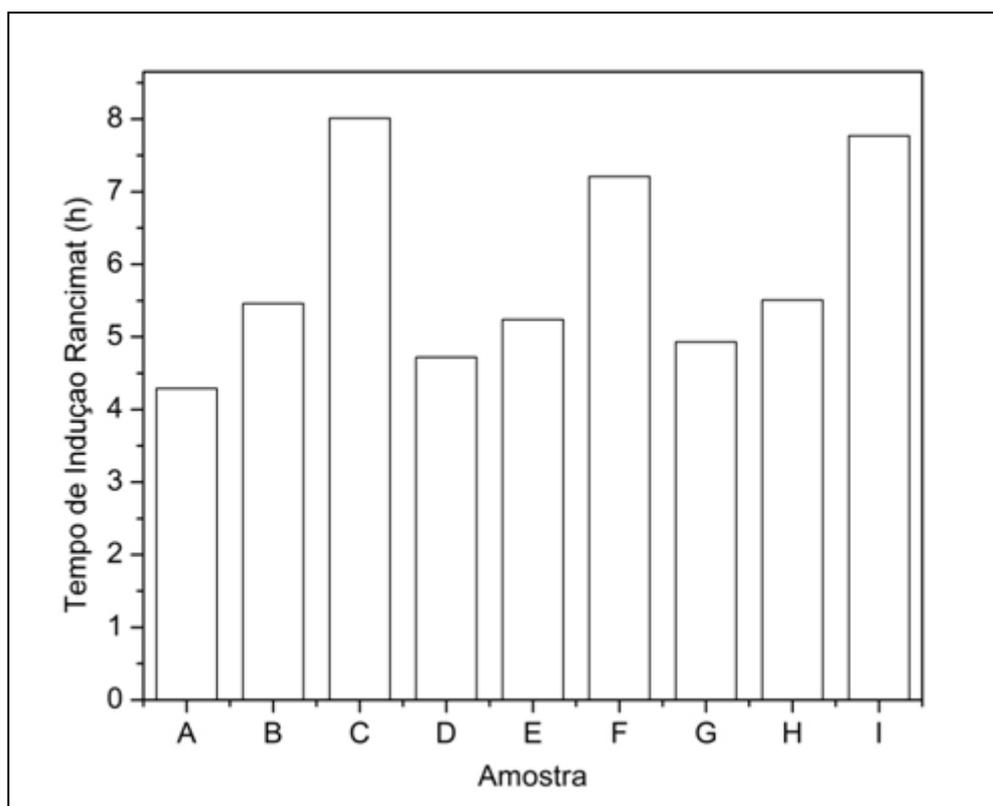


Figura 31 – Gráfico referente ao tempo de indução do biodiesel com adição dos extratos obtidos pelo método de extração supercrítica com e sem adição de etanol, conforme item 4.9.

A Figura 31 demonstra que para os extratos obtidos pela extração supercrítica ocorreu um aumento no tempo de indução no biodiesel, com o aumento da adição de etanol para todas as temperaturas de extração.

Para as extrações convencionais utilizando equipamento Soxhlet e extrator de gorduras, nota-se que houve maior influencia do tipo de solvente quando comparado a variação do método de extração. Tendo em vista que os tempos de induções foram maiores para o solvente acetato de etila, seguidos do etanol e hexano, isso pode ser verificado pela Figura 32.

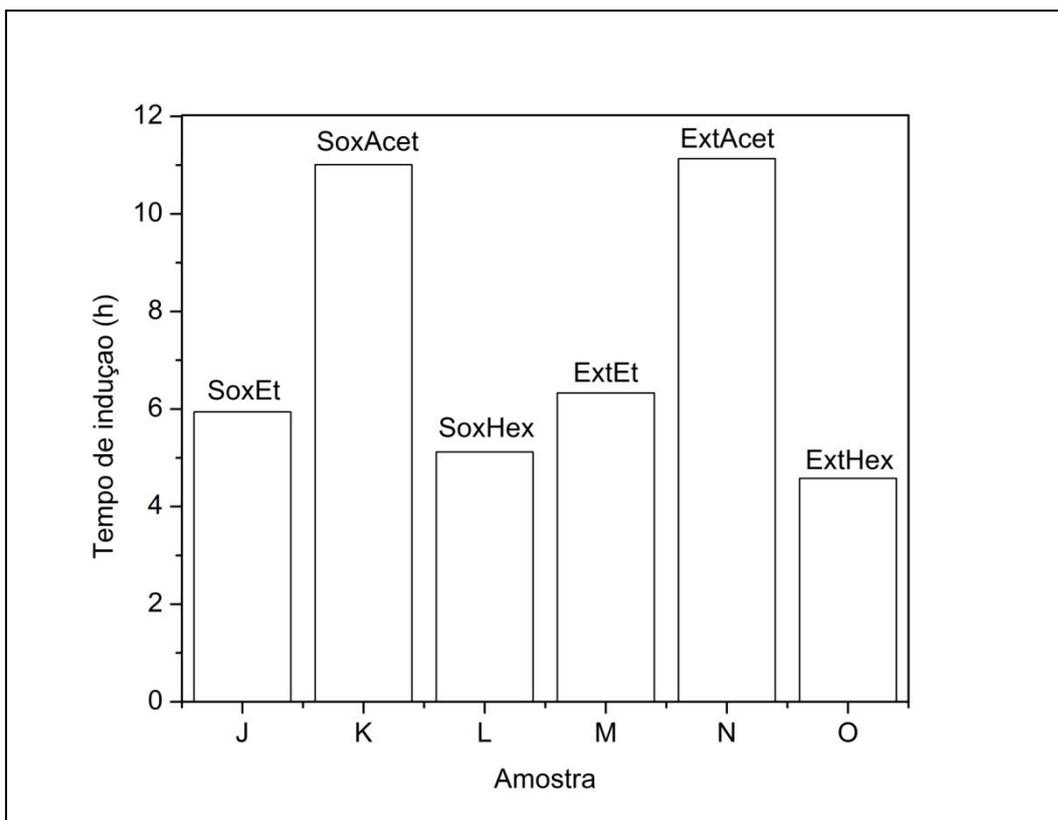


Figura 32 - Gráfico referente ao tempo de indução do biodiesel para os extratos obtidos pela extração Soxhlet (Sox) e Extrator de Gordura (Ext) com variação de solventes Etanol (Et), Acetato de etila (Acet) e Hexano (Hex).

É possível encontrar vários estudos na literatura que buscam um substituto natural para antioxidantes sintéticos utilizados no biodiesel, no entanto há trabalhos como os citados acima, nota-se que mesmo em concentração inferior (1000 ppm) os resultados obtidos do tempo de indução para o biodiesel, foram inferiores ao.

5.7.1.1 Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos da reação de oxidação do biodiesel comercial aditivado com os extratos de casca de romã foram investigados submetendo o biodiesel comercial, ao teste de estabilidade oxidativa acelerada (Rancimat) nas temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C, aditivado com os extratos de casca de romã extraídos nas condições representadas por C, I, K e N, bem como aditivada com os antioxidantes

sintéticos BHA e BHT. O tempo de indução encontrado nas diferentes temperaturas para as amostras estão expressas na Tabela 22.

Tabela 22 – Período de Indução do biodiesel com e sem adição de antioxidantes nas temperaturas 110, 115, 120 e 125 °C.

Amostra	Período de Indução (h)			
	110 °C	115 °C	120 °C	125 °C
Controle	4,30	2,95	2,18	1,44
BHA	7,86	5,85	4,44	2,86
BHT	6,91	4,99	3,53	2,36
C	8,01	5,52	3,89	2,82
I	7,77	5,81	3,96	2,84
K	11,01	6,63	4,57	3,66
N	11,13	6,79	4,70	3,79

O período de indução é menor com o aumento da temperatura para todas as análises representadas na Tabela 22. Ainda, é possível verificar que em todas as temperaturas de análise o biodiesel comercial puro (controle) possui o menor tempo de indução, o que afirma a eficácia dos antioxidantes adicionados a ele.

Com auxílio da Equação (1) foi possível determinar os valores da constante de velocidade (k) nas diferentes temperaturas de ensaio. A Tabela 23 apresenta os valores de k encontrados para o Biodiesel comercial (controle), para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT e para as amostras C (SC35/5); I (SC55/5); K (SoxAcet) e N (ExtAcet), as quais apresentaram melhor resultado no tempo de indução para o teste Rancimat a 110 °C.

Tabela 23 - Constante de velocidade (k) para as temperaturas de 110, 115, 120 e 125 °C para as amostras

Amostras/ Temp. de análise	Constante de Velocidade $k(h^{-1})$			
	110 °C	115 °C	120 °C	125 °C
Controle	0,7752	0,9594	1,2533	1,9265
BHA	0,3910	0,5372	0,6319	1,0263
BHT	0,4169	0,5579	0,7649	1,1645
C	0,4040	0,4588	0,6683	1,0021
I	0,3836	0,4306	0,7325	1,0266
K	0,2720	0,4025	0,5634	0,8114
N	0,2581	0,4140	0,6240	0,7683

Os resultados expressos na Tabela 23 mostram que os valores de k para as amostras contendo os extratos antioxidantes apresentam valores menores quando comparados a amostra controle. Desta forma, indica que a reação de oxidação é reduzida pela adição dos extratos de casca de romã no biodiesel, retardando as etapas de iniciação e propagação radicalar. Ainda, os resultados demonstram o mesmo comportamento, ou seja, a constante de velocidade (k) é maior com o aumento da temperatura. Este fato está relacionado à dependência entre a taxa de velocidade da reação e a temperatura. A grandeza com que k aumenta, diferencia esta dependência sendo bem mais acentuada para alguns casos como para o controle e para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT.

Segundo Tan *et al.*, (2010) a ausência de antioxidante e a presença de insaturações na estrutura do biodiesel aumenta a constante de velocidade, sendo que o valor de k está relacionado com a estrutura dos ácidos graxos além da presença de antioxidantes no biodiesel. O aumento da temperatura aumenta a energia de impacto das colisões entre as moléculas, fazendo com que aumente a probabilidade de mais moléculas excederem a energia de ativação formando mais produtos de oxidação, por isso, observa-se que os valores de k elevam-se com o aumento da temperatura. (MAIA *et al.*, 2011).

A energia de ativação (E_a) da reação é a energia necessária para que ocorra um rearranjo molecular com energia suficiente para tornar viável a formação de produtos, sendo desta forma um parâmetro cinético importante para o estudo da reação de oxidação do biodiesel (SILVA *et al.*, 2013; COUTINHO *et al.*, 2015). Pode ser determinada a partir dos dados cinéticos experimentais aplicados na equação de Arrhenius, esta por sua vez expressa à relação quantitativa entre a temperatura, a constante de velocidade e a energia de ativação.

Os antioxidantes elevam a E_a da reação de oxidação do biodiesel evitando-a por um período maior. Ainda, segundo Borsato *et al.*, (2014) quanto mais elevada for a energia de ativação, mais forte será a dependência entre constante de velocidade e a temperatura. Na Tabela 24 são apresentados os valores da energia de ativação (E_a) obtidas.

Alguns estudos sugerem que o valor da E_a deve aumentar com a adição de extratos antioxidantes, pois a barreira energética deve ser maior dificultando o início da reação de oxidação quando comparado com o controle. Esse comportamento foi verificado para o antioxidante sintético BHT e para as amostras I (SoxEt), K (SoxAcet) e N (ExtAcet), com antioxidante natural extraídos da casca de romã, indicando que as

adições desses antioxidantes se mostraram efetivas quanto à barreira energética para início da oxidação.

Tabela 24- Energia de ativação para as amostras de biodiesel comercial com e sem adição de antioxidante.

Amostra	Condições	Energia de ativação KJ.mol⁻¹
Controle	Biodiesel Comercial	84,8824
BHA	--	78,6784
BHT	--	86,0300
C	SC35 °C/5 mL	80,3920
I	SC55 °C /5 mL	90,0168
K	SoxAcet	91,5888
N	ExtAcet	91,8696

Dentre os ensaios realizados as amostras contendo antioxidante sintético BHA e antioxidante natural extraído conforme condição da amostra C (SC35/2,5), quando comparados a Ea do controle (84,8824) não respeitaram a relação descrita acima, sendo que a Ea foi de 78,6784 e 80,3920 respectivamente.

Hashemi *et al.*, (2015) afirmam que reações com alta energia de ativação possuem maior sensibilidade a variações de temperatura do que reações com baixa Ea. Desta forma, a mudança de temperatura da reação tem um efeito significativo nas reações com alta energia de ativação. Segundo Gregório *et al.*, (2017) não se pode considerar apenas a relação entre os reagentes e a temperatura em que ocorre a oxidação, deve-se levar em conta que a reação química é mais complexa, apresentando mecanismos predominantes que independem da temperatura, fazendo-se necessário determinar a energia aparente dessas amostras, desta forma, o que explica os resultados com baixa energia de ativação encontrado em algumas amostras (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2017).

Graficamente a Ea é dada pelo coeficiente angular da reta e demonstra que quanto mais elevada à energia de ativação, mais inclinada será a reta, e mais forte será a dependência entre a constante de velocidade e a temperatura (BORSATO *et al.*, 2014). As Figuras 33 a 37 apresentam os gráficos $\ln k$ versus $1/T$ para os ensaios realizados com o controle puro e aditivado com os as amostras C (SC35/2,5), I (SC55/5), K (SoxAcet), N (ExtAcet), BHA e BHT.

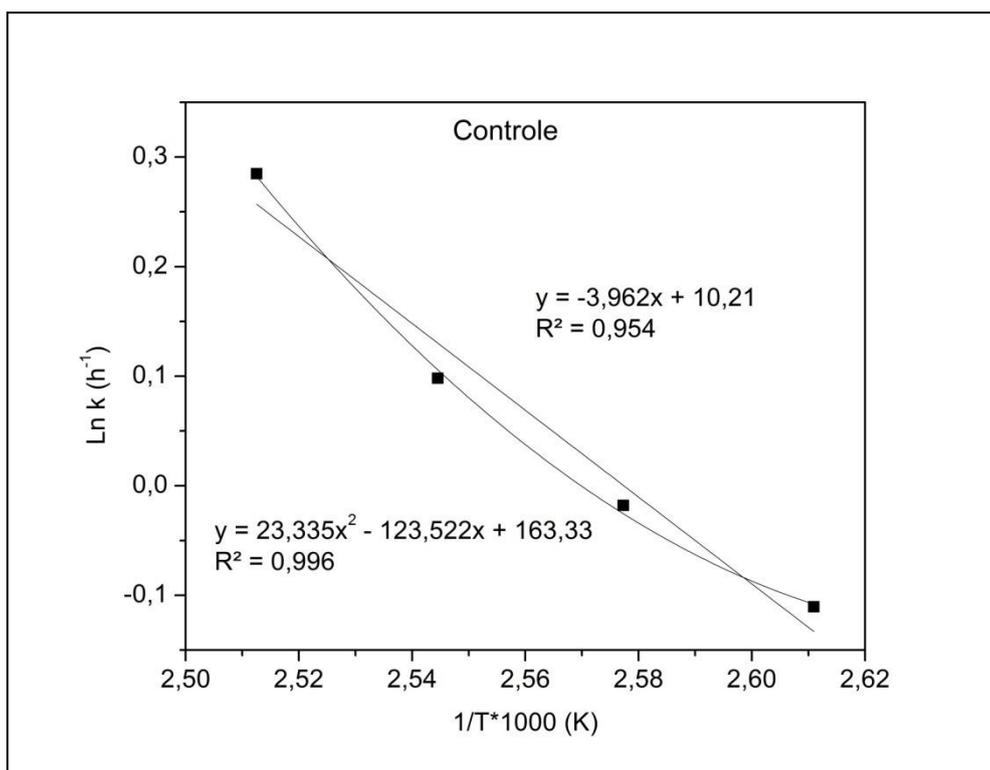


Figura 33 - Gráfico da Equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel comercial puro (Controle).

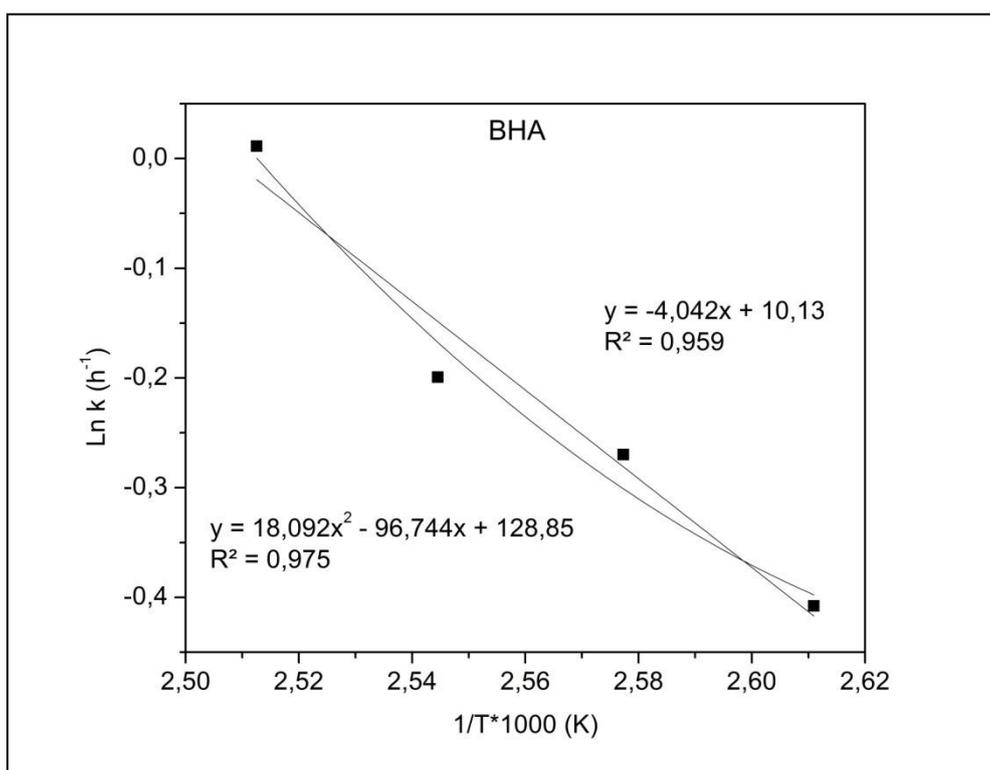


Figura 34- Gráfico da Equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com BHA.

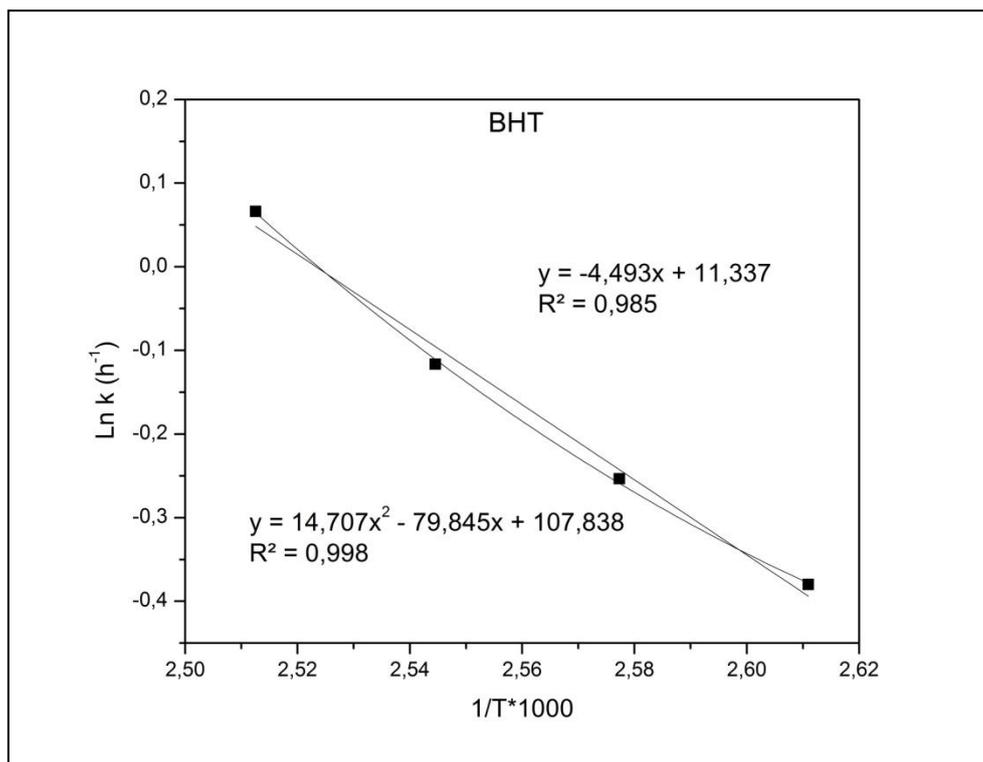


Figura 35 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com BHT.

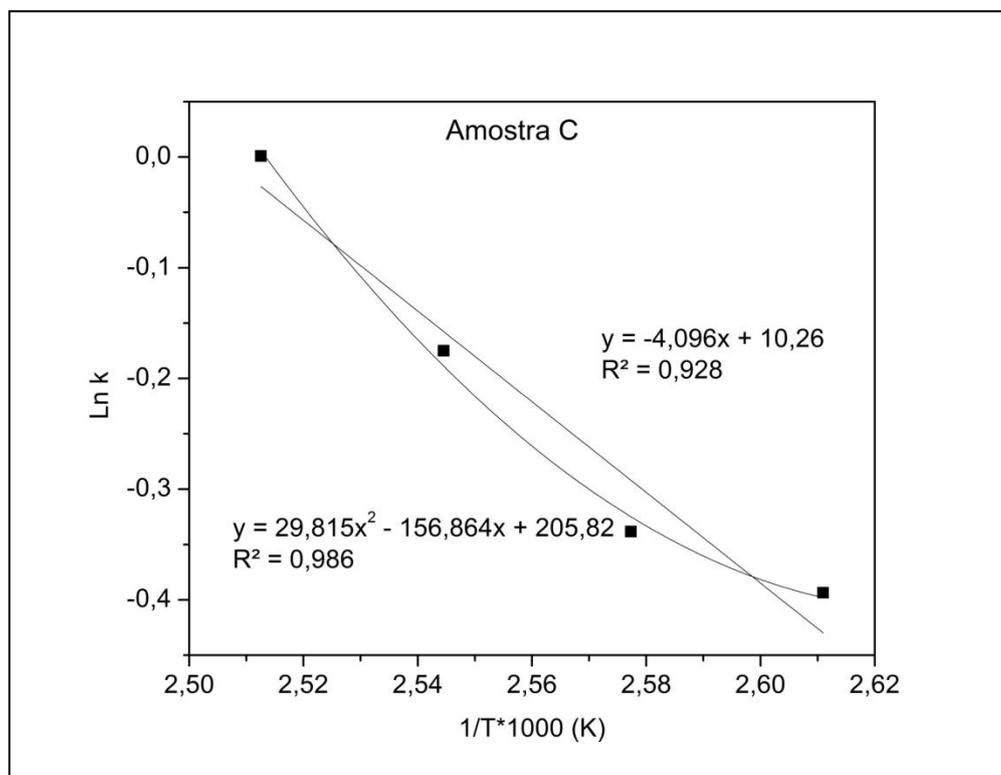


Figura 36- Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato C. Condição de extração Supercrítica na temperatura de 35 °C, com 5 mL de etanol e Pressão de 200 bar.

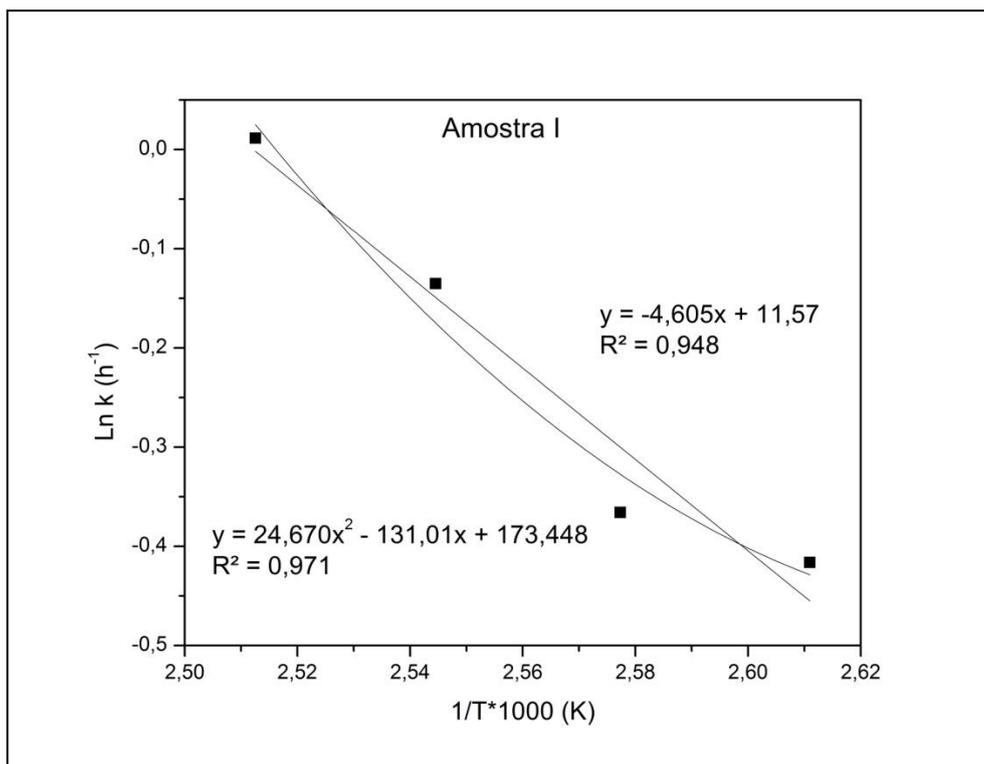


Figura 37 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato I. Condição de extração Supercrítica na temperatura de 55 °C, com 5 mL de etanol e Pressão de 200 bar.

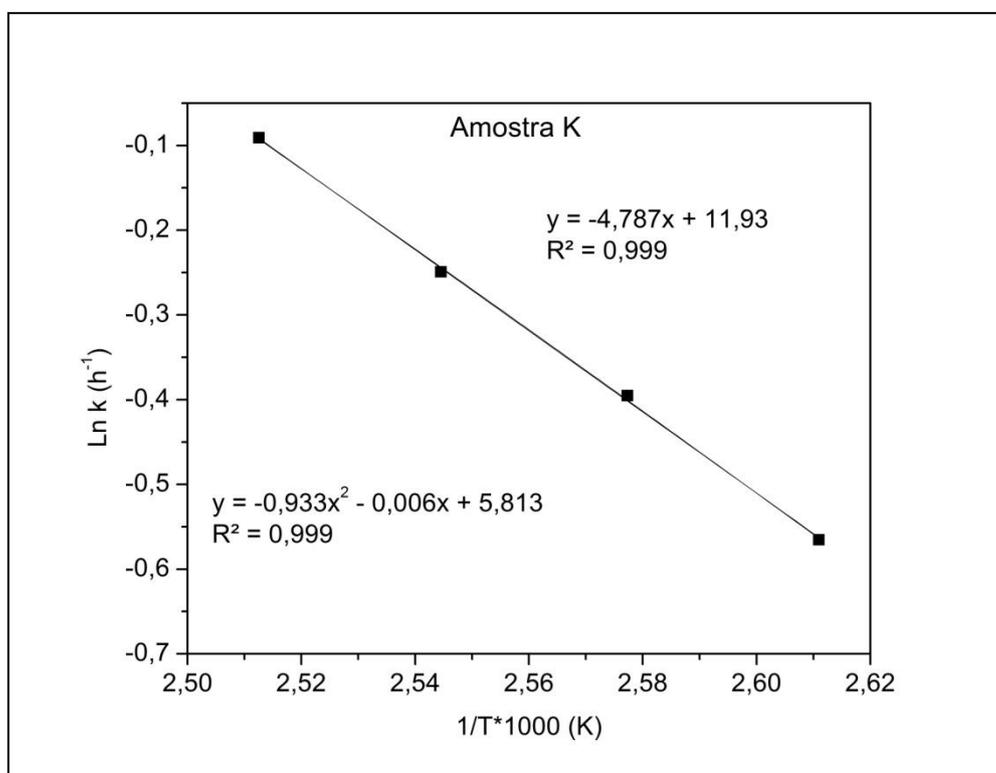


Figura 38- Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato K. Condição de extração com equipamento Soxhlet e solvente Acetato de Etila.

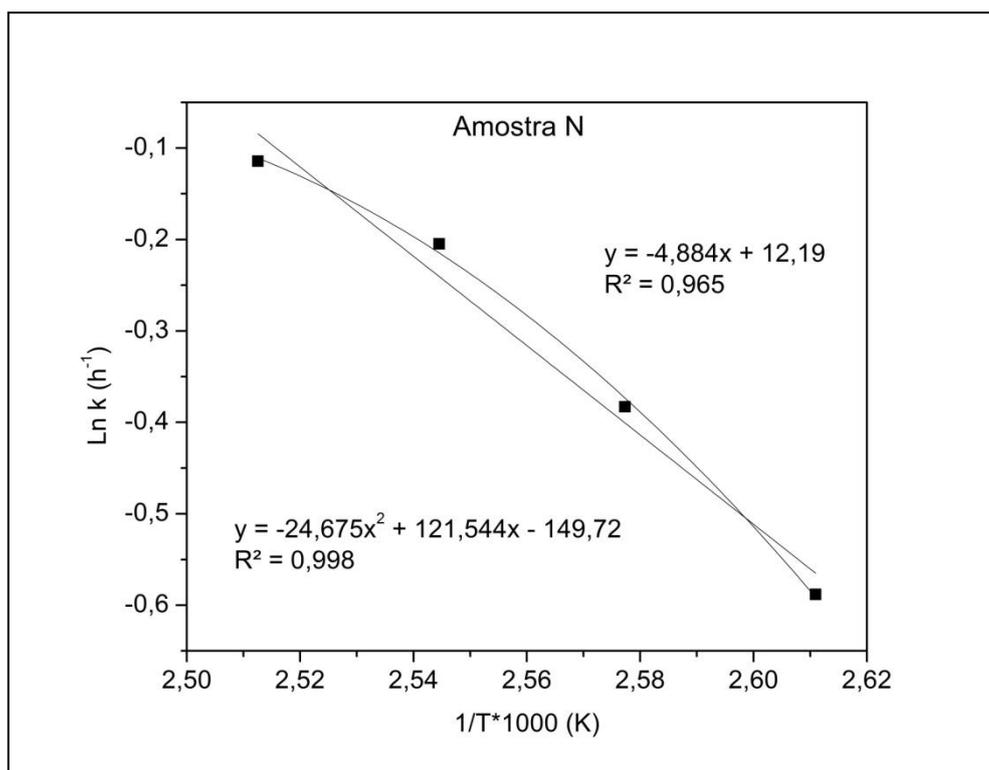


Figura 39 - Gráfico da equação de Arrhenius para a reação de oxidação do biodiesel aditivado com extrato K. Condição de extração com equipamento Extrator de Gordura e solvente Acetato de Etila

O comportamento polinomial é utilizado para corrigir os desvios causados pelo modelo de Arrhenius. Segundo Aquilanti *et al.*, (2010) classificamos o comportamento do ajuste polinomial em côncavo ou convexo. Para o comportamento côncavo, a energia de ativação aumenta com o aumento da temperatura e em caso de convexo, a E_a decresce com o aumento da temperatura (CHENDYNSKI *et al.*, 2017).

A amostra N (ExtAcet) (Figura 39) em que foi utilizado o extrator de gordura e acetato de etila foi à única amostra que obteve comportamento convexo, enquanto a amostra K (SoxAcet) (Figura 38) utilizando o Soxhlet e acetato de etila, apresentou linearidade, não possuindo um desvio significativo, como o proposto por Arrhenius, indicando que o modelo polinomial não contribui para a melhora do ajuste dos dados experimentais.

5.7.1.2 Parâmetros Termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos, a partir dos valores das constantes de velocidade, conforme apresentado na Tabela 23, foram calculados os valores de entalpia (ΔH^\ddagger) e entropia (ΔS^\ddagger) por meio da Equação (6) e Energia Livre de Gibbs média (ΔG^\ddagger) pela Equação (7), todas relativas ao estado ativado. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 25- Valores de Entalpia (ΔH^\ddagger), Entropia (ΔS^\ddagger) e Energia Livre de Gibbs (ΔG^\ddagger) para as amostras analisadas.

Amostra	ΔH^\ddagger	ΔS^\ddagger	ΔG^\ddagger
	(KJ.mol ⁻¹)	(KJ.mol ⁻¹)	(KJ.mol ⁻¹)
CONTROLE	70,6062	-59,9804	23,4949
BHT	82,7741	-38,4260	97,7794
BHA	74,1382	-61,4171	98,1215
C	75,1811	-58,9387	98,1967
I	84,9257	-33,9784	98,1942
K	88,4009	-26,9666	98,9314
N	90,2681	-22,1357	98,9121

A entalpia (ΔH^\ddagger) é a variação de energia do sistema nas reações de oxidação, correspondendo à energia necessária para que a reação de oxidação seja favorável. Segundo Spacino *et al.*, (2015) os valores altos de entalpia mostram que para ocorrer a reação, há um consumo maior de energia, indicando ainda que a reação possui natureza endotérmica. A adição de antioxidantes gera valores de ΔH^\ddagger maiores que os observados pela amostra controle, isso foi verificado em todas as amostras estudadas quando comparada ao controle.

O parâmetro ΔS^\ddagger está diretamente ligado com a formação de espécies no estado ativado durante o processo de oxidação. Quando há união dos compostos para formação do complexo ativado, ocorre um decréscimo no número de espécies livres, desta forma o parâmetro ΔS^\ddagger se torna negativo. Da mesma forma, quando há um acréscimo no número de moléculas no meio, o grau de desordem do sistema aumenta e torna o valor de entropia menos negativo (maior valor) (SPACINO *et al.*, 2015; ANGILELLI *et al.*, 2017b).

Para os valores obtidos experimentalmente, a amostra utilizando antioxidante sintético BHA, apresenta valor mais negativo que a amostra controle, o extrato C demonstrou valor próximo ao encontrado para o controle. Contudo, as demais amostras seguem o previsto, apresentam valores menos negativos e indicam que houve um acréscimo na desordem do sistema, devido a um maior número de moléculas. (GREGÓRIO *et al.*, 2017).

A variação de energia durante a reação de oxidação é entendida como a Energia Livre de Gibbs, representada por ΔG^\ddagger . Valores mais positivos indicam processos endergônicos, menos favoráveis de ocorrerem. Para os valores obtidos experimentalmente, expressos na Tabela 25 é possível observar que todos os valores são maiores que o da amostra controle, isto é, devido à natureza endotérmica da formação do complexo ativado.

5.8 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

A Resolução 45/2014 da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis, determina conforme norma EN 14112 a estabilidade oxidativa do biodiesel, onde emprega o aparelho Rancimat para encontrar o tempo de indução do biodiesel que pela Resolução é de 8 horas à 110 °C. Por outro lado, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) é um método que vem sendo utilizada por diversos pesquisadores para analisar a oxidação de combustíveis, biocombustíveis, óleos entre outros (SANTOS *et al.*, 2009; LÓPEZ-BACEIRO *et al.*, 2010).

As curvas DSC traçadas para o controle (Biodiesel comercial puro) e para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT estão representados na Figura 40. O início da oxidação é sinalizado por um aumento brusco da temperatura da amostra, onde por meio de retas tangentes, é possível obter a temperatura onde inicia-se a oxidação do biodiesel, representado na Figura 40 como o ponto P.

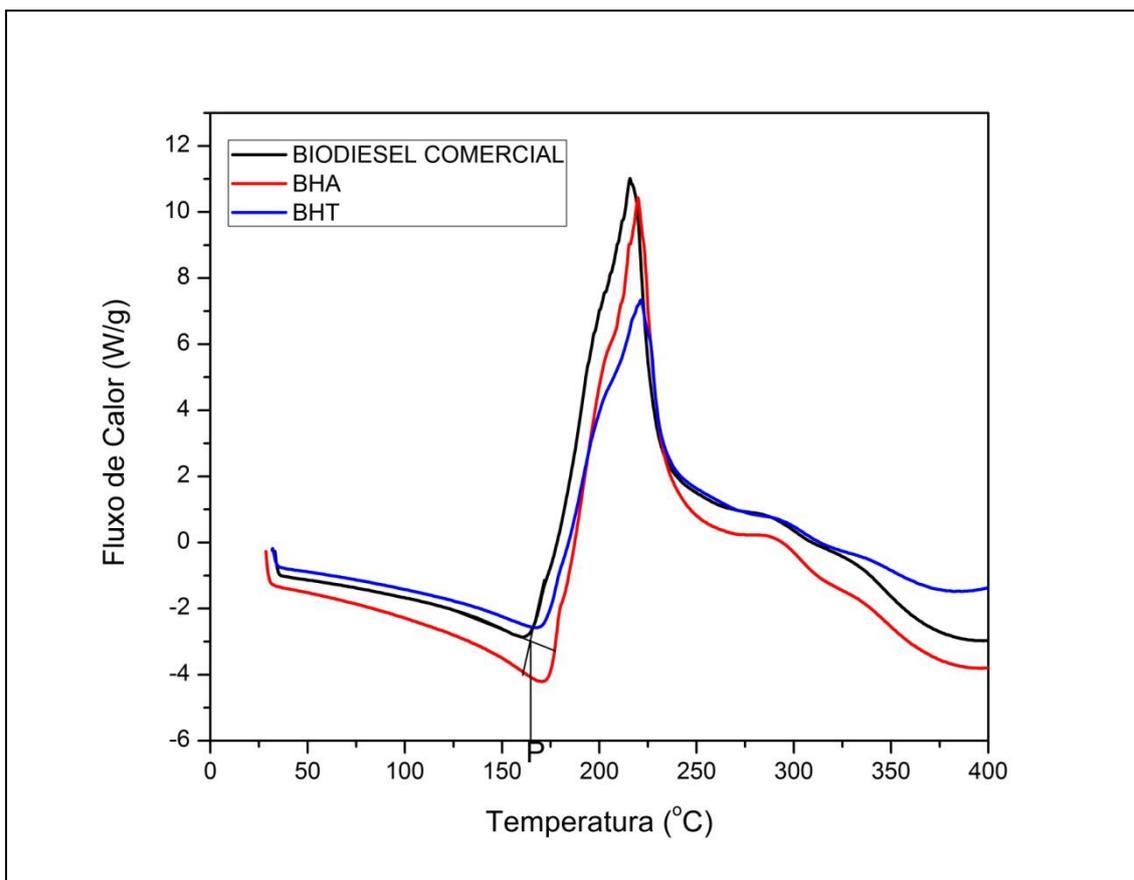


Figura 40 - Curva referente à análise DSC para o biodiesel comercial puro e aditivado com os antioxidantes BHA e BHT.

No ponto mais extremo das curvas, encontra-se a temperatura relacionada com o equilíbrio entre a formação de radicais livres, radicais peróxidos e superóxidos. As demais temperaturas encontradas estão relacionadas com a formação dos compostos estáveis na fase de terminação da autooxidação (TAVARES *et al.*, 2011; CORDEIRO, 2011).

A temperatura de oxidação do biodiesel comercial puro (controle) foi de 166 °C, para os antioxidantes BHA e BHT foram de 175 e 174 °C, respectivamente. Através das temperaturas de oxidação é possível encontrar o tempo de indução oxidativo pelo método DSC sendo de 28,17 minutos para o biodiesel, para o BHT de 29,50 minutos e 31,42 minutos para o BHA. Foi possível verificar que houve um aumento no valor do tempo de início da oxidação do biodiesel após a utilização dos antioxidantes sintéticos, estando de acordo com diversos estudos referente ao uso de antioxidantes sintéticos no biodiesel (VALLE, LEONARDO E DWECK, 2014; TAVARES *et al.*, 2012).

Stavinoha e Kline (2001) demonstraram que o P-DSC é uma técnica adequada para avaliar antioxidantes na resistência à oxidação em biodiesel. Tavares *et al.*, (2009) relataram que as mudanças de temperatura causado pela análise DSC na amostra, ocorre devido a diversas reações químicas como reações de desidratação, dissociação ou decomposição bem como a reação de oxidação. Valle, Leonardo e Dweck (2014), avaliaram o período de indução para o biodiesel de soja empregando o BHT como antioxidante sintético, pelos métodos de análise, DSC, Rancimat e PetroOXY, e encontraram o aumento no tempo de indução oxidativa com o aumento da concentração de antioxidante para todos os métodos.

A análise DSC foi realizada para o biodiesel adicionados dos extratos de casca de romã, onde foi possível encontrar a temperatura em que ocorreu a oxidação bem como o tempo aproximado para que a oxidação ocorra, tais valores estão descritos na Tabela 26.

Tabela 26 – Resultados encontrados para as análises DSC no biodiesel aditivado com os extratos de casca de romã.

Amostra	Condição	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
A	SC35/0	167	27,50
B	SC35/2,5	168	27,25
C	SC35/5	176	31,25
D	SC45/0	166	29,42
E	SC45/2,5	168	30,00
F	SC45/5	172	29,67
G	SC55/0	170	28,25
H	SC55/2,5	168	28,75
I	SC55/5	174	30,42
J	SoxEt	173	29,25
K	SoxAcet	178	30,42
L	SoxHex	169	28,17
M	ExtEt	169	30,25
N	ExtAcet	177	31,42
O	ExtHex	167	28,33

O biodiesel sem adição de antioxidante obteve o tempo de oxidação igual a 28,17 minutos de análise, desta forma pode-se notar que dentre os extratos analisados as amostras A (SC35/0) e B (SC35/2,5) mostraram ineficiência como antioxidante, pois o tempo de oxidação foi inferior ao biodiesel puro. O extrato N (ExtAcet), na condição de extração com extrator de gordura utilizando solvente acetato de etila, foi o que apresentou

maior tempo de indução oxidativa (31,25 min) equiparando ao valor encontrado para o antioxidante sintético BHA. Em seguida, a amostra C (SC35/5), na condição de extração supercrítica com adição de 5 mL de cossolvente etanol, demonstrou um tempo de indução equivalente a 31,25 minutos.

Polavka *et al*, (2005); Arain *et al*, (2009); Moser (2009); Ramalho *et al*, (2011) compararam os resultados obtidos utilizando o equipamento Rancimat e a técnica DSC para determinação da estabilidade à oxidação, e foi possível verificar que é enfatizada a coerência entre os resultados obtidos pelas técnicas citadas. Neste trabalho foi possível notar certa coerência nos tempos de indução, sendo que para ambos os testes a amostra N (ExtAcet) foi a que apresentou maior tempo de indução, sendo de 11,13 horas para o Rancimat e 31,42 minutos para o DSC.

Quando relaciona-se o tempo de indução dos testes Rancimat e DSC com o Teor de Fenólicos totais (TFT) nota-se que não há uma relação direta entre os resultados encontrados. Segundo Dunn (2005), alguns antioxidantes fenólicos possuem alta volatilidade e suscetibilidade à oxidação, tornando-se sua eficiência baixa em temperaturas muito elevadas.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho foi desenvolvido para estudar a casca de romã como possível substituinte dos antioxidantes sintéticos no biodiesel, analisando os métodos de extração, convencional e supercrítico, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos presentes nos extratos obtidos, bem como sua composição química, por fim o teste de estabilidade oxidativa a 110 °C com equipamento Rancimat, avaliou que alguns extratos possuíram melhor tempo de indução quando comparado a antioxidantes sintéticos BHA e BHT.

A partir dos resultados conseguidos neste trabalho, pode-se afirmar que a casca de romã pode ser utilizada para obtenção de extratos que apresentam atividade antioxidante. A extração utilizando CO₂ supercrítico, apresentou maior rendimento quando foi adicionado um cossolvente (etanol), sendo que a quantidade de cossolvente e a temperatura influenciaram estatisticamente na obtenção do extrato. Para os extratos obtidos pelos métodos convencionais (Soxhlet e extrator de gordura – Goldfish), apesar do alto rendimento obtido com solvente etanol, a seletividade dos compostos extraídos foi menor quando comparado a solventes mais apolares.

A modelagem matemática resultou em uma boa aproximação dos dados do modelo com os experimentais, sendo possível a determinação das curvas cinéticas das extrações experimentais e simuladas usando o modelo proposto por Sovová (1994).

Nos extratos obtidos foi possível identificar a presença de compostos antioxidantes como α , β e γ -Tocoferol, além da presença do ácido palmítico, esqualeno, 5-hidroximetilfurfurale, compostos siloxanos, entre outros compostos minoritários. A presença de compostos antioxidantes está de acordo com o teor de compostos fenólicos (TFT) pelo método FolinCiocalteu e a atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH•.

Com relação à estabilidade oxidativa dos extratos no biodiesel, obtidos pelo método Rancimat, pode-se verificar que os extratos convencionais (método com Soxhlet e extrator de gordura – Goldfish), com solvente acetato de etila apresentaram tempo de estabilidade oxidativa de aproximadamente 11 horas superior ao exigido pela ANP que determina tempo mínimo de 8 horas e muito superiores ao biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT de 6,91 e 7,86 horas, respectivamente. O extrato

supercrítico nas condições de 35 °C e 5 mL de cossolvente apresentou o mesmo comportamento com tempo de indução igual a 8,01 horas.

Através da cinética realizada no equipamento Rancimat para o biodiesel puro, as amostras com maior tempo de indução oxidativa (C, I, K e N) e os antioxidantes sintéticos BHA e BHT foi possível determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos que comprovam de forma qualitativa a eficiência ou não dos extratos.

O método DSC para obtenção do tempo de oxidação do biodiesel aditivado com os extratos se mostrou eficiente, tendo em vista que a amostra N (extração convencional acetato de etila) e C (supercrítico 35 °C e 5 mL de cossolvente) demonstraram maiores valores de tempo de oxidação, no entanto para outras amostras não foi possível obter correlação dos valores.

Desta forma, acredita-se que para os extratos convencionais, houve maior influência do solvente utilizado na extração do que o método, tendo em vista que, para o acetato de etila o tempo de indução foi praticamente o mesmo. Para os extratos supercríticos o tempo de indução oxidativa quando aditivados ao biodiesel puro aumentou com a adição docossolvente.

Finalmente, conclui-se que a casca de romã pode ser utilizada para obtenção de extratos com atividade antioxidante, pois verificou-se o aumento da estabilidade oxidativa do biodiesel aditivados com os extratos, desta forma sendo considerado um possível substituinte dos antioxidantes sintéticos, sendo que, alguns extratos necessitam de concentrações maiores para elevar o tempo de estabilidade oxidativa.

REFERÊNCIAS

ABID, MUHAMMAD *et al.* Antifungal Potential of Indigenous Medicinal Plants against *Myrothecium* Leaf Spot of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.60, 2017.

ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. **Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-98, 1998.

AFAQ, F. *et al.* Novel agents and targets for skin cancer chemoprevention: studies with pomegranate fruit extract. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 1, p. 140, 2003.

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha Pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-411, 2004.

AGUIAR, A. C.; SILVA, L. P. S.; COUTINHO, J. P.; BARBERO, G. F.; GODOY, H. T.; MARTÍNEZ, J. Influence of temperature and pressure conditions on the supercritical CO₂ extraction of Capsicum pepper oleoresin. **Journal Supercritical Fluids**, v. 81, p. 210-216, 2013.

AKHTAR, S, ISMAIL, T.; SESTILI, P.;. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, pp. 397-405, 2012.

ALADEDUNYE, F., PRZYBYLSKI, R., MATTHAUS, B. Performance of antioxidative compounds under frying conditions: A review. **Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 1539-1561, 2017.

ALBAYRAK, S.; AKSOY, A.; SAGDIC, O.; ALBAYRAK, S. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 547-554, 2012.

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

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANGILELLI, K. G.; CHENDYNSKI, L. T.; DA SILVA, P. R.; BORSATO, D. The Effect of Catalysis on the Parameters of the Oxidation Reaction of Biodiesel. **Chemistry Select**, v. 2, n. 20, p. 5453-5457, 2017a.

ANGILELLI, K. G.; FERREIRA, B. A. D.; SILVA, L. R. C.; CHENDYNSKI, L. T.; BORSATO, D. Evaluation of the kinetic and thermodynamic parameters of oxidation

reaction in biodiesel from a quaternary mixture of raw material. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 2, 2017b.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State**. v.3. Carbon dioxide. Pergamon Press, 1976.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001

AQUILANTI, V.; COUTINHO, N. D.; CARVALHO-SILVA, V. H. Kinetics of low-temperature transitions and a reaction rate theory from non-equilibrium distributions. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, v. 375, n. 2092, p. 20160201, 2017

AQUILANTI, V.; MUNDIM, K. C.; ELANGO, M.; KLEIN, S.; KASAI, T. Temperature dependence of chemical and biophysical rate processes: Phenomenological approach to deviations from Arrhenius Law. **Chemical Physics Letters**, v. 498, n. 1, p. 209-213, 2010.

ARA MAHDAVI, K.; RAOFIE, F. Application of response surface methodology for the optimization of supercritical fluid extraction of essential oil from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel. **Journal Food Science Technology**, v.53, n.7, p. 3113-3121, 2016.

ARAIN, S.; SHERAZI, S. T. H.; BHANGER, M. I.; TALPUR, F. N.; MAHESAR, S. A. – Oxidative stability assessment of *Bauhinia Purpurea L.* seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods. **Journal Elsevier Thermochimica Acta**, v. 484, p. 1–3, 2009.

ARAÚJO, S. V.; ROCHA, B. S.; LUNA, F. M. T.; ROLA JÚNIOR, E. M.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTE Jr, C. L. FTIR assessment of the oxidation process of castor oil FAME submitted to PetrOXY and Rancimat methods. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 5, p. 1152-1155, 2011.

ARUN, K. B.; JAYAMURTHY, P.; ANUSHA, C. V.; MAHESH, S. K.; NISHA, P. Studies on activity guided fractionation of pomegranate peel extracts and its effect on antidiabetic and cardiovascular protection properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, 2017.

BAILEY, A. E.; Bailey's: Industrial Oil and Fat Products. 5ª Edição, v. 3, **John Wiley & Sons**, 1996.

BALAMURUGAN, R.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora L.* in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 410, 2011.

BALL, D. W. **Físico-Química**, v.2. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva Sylvestris L.* a comparative study of the nutraceutical potential and composition. **Food Chemical Toxicology**. v. 48, n. 6, p.1466-72, 2010.

BASTOS, R. R. C.; MONTEIRO JÚNIOR, O. V, THOMAZ, K. T. C.; PONTES, R. G.; BITTENCOURT, J. A.; CONCEIÇÃO, L. R. V.; CAVALCANTE, M. S, ROCHA FILHO, G. N.; ZAMIAN, J. R. Comportamento antioxidante de extratos etanólicos na estabilidade oxidativa de biodiesel de soja. 5º Congresso norte-nordeste de química. In: 3º Encontro norte-nordeste de ensino de química. Natal. *Anais...Natal-RN*, 2013.

BENELLI, P.; *Agregação de valor ao bagaço de laranja (Citrus sinensis L. osbeck) mediante a obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração*. 2010. 229f. Dissertação. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 305–309, 2017.

BISCAIA, D. *Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas*. 2007. 128f. Dissertação. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199- 1200, 1958.

BORSATO, D.; DE MORAES CINI, J. R.; DA SILVA, H. C.; COPPO, R. L.; ANGIELLI, K. G.; MOREIRA, I., MAIA, E, C, R. Oxidation kinetics of biodiesel from soybean midex with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. **Fuel Processing Technology**, v. 127, p. 111- 116, 2014.

BORSATO, D.; DALL'ANTONIA, L. H.; GUEDES, C. L. B.; MAIA, E, C, R.; FREITAS, H. R.; MOREIRA, I.; SPACINO, K. R. Aplicação do delineamento simplex-centroide no estudo da cinética da oxidação de Biodiesel B100 em mistura com antioxidantes sintéticos. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1726-173, 2010

BOTELLA, L.; BIMBELA, F.; MARTÍN, L.; ARAUZO, J.; SÁNCHEZ, J. L. Oxidation stability of biodiesel fuels and blends using the Rancimat and PetroOXY methods. Effect of 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol and catechol as biodiesel additives on oxidation stability. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 43, 2014.

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

BRASIL., Constituição 2005. Lei Nº 11.097. Constituição da República Federativa do Brasil: promulgada em 13 de Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do Biodiesel na matriz energética brasileira, Brasília, 2005.

BRENNECKE, J. F. Solvents: molecular trees for green chemistry. **Nature**, v. 389, p. 333-334, 1997.

BRUM, L. F. W.; *Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (Eucalyptus dives) como potenciais antioxidantes em alimentos*. 2010. 135f. Dissertação. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010

BRUNNER, G. Gas extraction. IN: Introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Ed. 1^a, p. 387, Alemanha: **Editora Steinkopff**, 1994.

BUOSI, G. M.; SILVA, E. T.; SPACINO, K.; CHANAN SILVA, L. R.; FERREIRA, B. A. D.; BORSATO, D. Oxidative stability of biodiesel from soybean oil: Comparison between synthetic and natural antioxidants. **Fuel**, v. 181, p. 759-764, 2016.

BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex. 2009. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/Error/NoPage.aspxerrorpath=/phen/Doc/z366.pdf>> Acesso em 05 de janeiro de 2017.

CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; ARAUJO, C. R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.

CALAME, J. P.; STEINER, R. Carbon dioxide in the flavour and perfumery industry. **Chemistry and Industry**. n. 12. p. 399, 1982

CALIGIANI, A.; BONZANINI, F.; PALLA, G.; CIRLINI, M.; BRUNI, R. Characterization of a potential nutraceutical ingredient: pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, n.3, p.277-283, 2010.

CAMPOS, L. M. A. S.; MICHELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 163-70, 2005.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CECCHI, M. H. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: São Paulo: UNICAMP, 2003. 207p.

CHAVES, M. H.; *et al* . Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira. Farmacognosia**, v. 20, n. 1, pp. 106-112, 2010.

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

CHENDYNSKI, L. T., ROMAGNOLI, E. S., DA SILVA, P. R. C., BORSATO, D. Activation Energy's Deviations of the Oxidation Reaction of Biodiesel in Mixtures with Ferric Ions and Natural Antioxidant. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 9, p. 9613-9618, 2017.

CHERIOT, S.; BILLAUD, C.; PÖCHTRAGER, S.; WAGNER, K.; NICOLAS, J. A comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine glucose-

derived maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural. **Food Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 132-138, 2009.

CHEYAD, M. S.; SALMAN, T. A. Characterization and study the inhibition activity of Pomegranate Peel extract for α -Brass corrosion in H_2SO_4 solution. **Oriental Journal of chemistry**, v. 33, n. 3, p. 1241-1251, 2017.

CHOONG, W. P.; TAN, C. H.; SHOW, P. L.; LAM, H. L.; ANNUAR, M. S. B. M.; JUAN, J. C.; CHANG, J. C.; LING, T. C. (2016). Efficient enzyme-catalysed transesterification of microalgal biomass from *Chlamydomonas* sp. **Energy**, v.116, n. 2, p. 1370-1272, 2016.

COELHO, G. C.; SCIO, E.; LIMA, I. V. A.; NOGUEIRA, M. Atividades antimicrobiana e antioxidante da *Chamomilla recutita* L. **Revista HU**, .38, n. 1 e 2, p. 61-65, 2012.

CORDEIRO, C. S.; ROSA DA SILVA, F.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-486, 2011.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

COUTINHO, N. D.; SILVA, V. H.; MUNDIM, K. C.; DE OLIVEIRA, H. C. Description of the effect of temperature on food systems using the deformed Arrhenius rate Law: deviations from linearity in logarithmic plots VS. inverse temperature. **Rendiconti Lincei**, v. 26, n. 2, p. 141-149, 2015.

DALMOLIN, I. et al. Chemical characterization and phase behavior of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, p. 797-801, 2010.

DANTAS, M. B.; ALBUQUERQUE, A. R.; BARROS, A. K.; RODRIGUES FILHO, M. G.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SINFRÔNIO, F. S. M.; ROSENHAIM, R.; SOLEDADE, L. E. B.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel. **Fuel**, v. 90, ed. 2, p. 773-778, 2011.

DE GUZMAN, R.; TANG, H.; SALLEY, S, NG SIMON, K. Y. - Synergistic Effects of Antioxidants on the Oxidative Stability of Soybean Oil and Poultry Fat-Based Biodiesel, **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 86, p. 459–467, 2009.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115–176, 2014.

DEL RE, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DELLA GRECA, M.; CUTILLO, F.; D`ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; PACIFICO, S.; ZARRELLI, A. Antioxidante and radical scavenging properties of *Malvo sylvestris*. **Natural Product Communication**, v. 4, p. 893-893, 2009.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the pro oxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DECKER, E. A. Antioxidant mechanisms. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2.ed.p.517-42, 2002.

DEGIRMENBASI, N.; BOZ, N.; KALYON, D. M. Biofuel production via transesterification using sepiolite-supported alkaline catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 150, p. 147-156, 2014.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B.; VECHIATTO, W. W. D.; WILHELM, H. M.; e RAMOS, L. P.; The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 416-423, 2007.

DUUN, R. O. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1071-1085, 2005.

EMAM, A. M.; MOHAMED, M. A.; DIAB, Y. M.; MEGALLY, N. Y. Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* L. and *Emex spinosus* L. **Drug Discovery & Therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 202-207, 2010.

EMBUSCADO, M. E. Spices and Herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, part. B, p. 811-819, 2015.

ENCINAR, J.; GONZÁLES, J. F.; RODRÍGUES, J/ J.; TEJEDOR, A. Biodiesel fuels from vegetables oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with etanol. **Energy & Fuels**, v. 19, p. 443-450, 2002.

ESCARPA, A.; GONZALES, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 57, 2001.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁNEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, p. 1275-1287, 2009.

FADAVI, A.; BARZEGAR M.; AZIZI, M. H. An investigation on the physico-chemical composition of various pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Yazd. **Iranian Journal of Food Science and Technology**, v. 2, pp. 9-14, 2004.

FERNANDES, L.; PEREIRA, J. A.; LOPÉZ-CORTÉS, I.; SALAZAR, D. M.; RAMALHOSA, E.; CASAL, S. Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of Food Compositions and Analysis*, v. 39, p. 13-22, 2015.

FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; DOS SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonóides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sobreamento. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper Nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, n.3, p. 235, 1999

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A.; CABRAL, F. A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.121-133, 1993.

FERRARI, A. R.; SOUZA, W. L. de. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 106-111, 2009.

FILIPPI, R. P. CO₂ as a solvent: application to fats, oils and other materials. **Chemical Industry**, v. 19, p. 390-394, 1982.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 807-821, Jul. 2011.

FOCKE, W. W.; WESTHUIZEN, I. V. der.; GROBLER, A. B. L.; NSHOANE, K. T.; REDDY, J. K.; LUYT, A. S.; The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Fuel**, v. 94, p. 227-233, 2012.

FOCKE, W. W.; WESTHUIZEN, I. V. der.; OOSTHUYSEN, X. Biodiesel oxidative stability from Rancimat data. **Thermochimica Acta**, v. 633, p. 116-121, 2016.

FRANKEL, E. Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, pp.1908-1917, 1984.

GALVAN, D.; ORIVES, J. R.; COPPO, R. L.; RODRIGUES, C. H. F.; SPACINO, K. R.; PINTO, J. P.; BORSATO, D. Study of oxidation kinetics of B100 biodiesel from soybean and pig fat: activation energy determination. **Química Nova**, v. 37, p. 244- 248, 2014.

GAMA, P. E.; GIL, R. A. S.; LACHTER, E. R. Produção de biodiesel através de transesterificação in situ de sementes de girassol via catálise homogênea e heterogênea. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1859-1862, 2010.

- GANÁN, N., BRIGNOLE, E. A. Fractionation of essential oils with biocidal activity using supercritical CO₂ – Experiments and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 58-67, 2011.
- GERPEN, J. V. Biodiesel Processing and Production. **Fuel Process Technology**, v. 86, p. 1097-1107, 2005.
- GERHARD, K.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. 1^a Ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.
- GOMIDE, Reynaldo. **Operações unitárias: operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Gomide, 1983.
- GREGÓRIO, A. P. H.; BORSATO, D.; MOREIRA, I.; SILVA, E. T.; ROMAGNOLI, É. S.; SPACINO, K. R. Apparent activation energy and relative proportion factor of natural antioxidants in mixture with biodiesel. **Biofuels**, p. 1-8, 2017.
- GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. **Food Chemistry: Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section**, v. 77, p. 503-510, 2001.
- HASHEMI, S. M. B.; BREWER, M. S.; SAFARI, J.; NOWROOZI, M.; ABADI SHERAHI, M. H.; SADEGHI, B.; GHAFORI, M. Antioxidant activity, reaction mechanisms, and kinetics of *Matricaria recutita* extract in commercial blended oil oxidation. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 2, p. 257-271, 2016.
- HOCHKOGLER, C. M.; HOI, J. K.; LIEDER, B.; MÜLLER, N.; HANS, J.; WIDDER, S.; LEY, J. P.; SOMOZA, V. Cinnamyl Isobutyrate Decreases Plasma Glucose Levels and Total Energy Intake from a Standardized Breakfast: A Randomized. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 3, pp. 277-283, 2010.
- HOLLAND, D.; HATIB, K.; BAR-YA'AKOV, I. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. **Horticultural Reviews**, v. 35, p.127–191, 2009.
- HOLLENDER, J.; HNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GOTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. **Journal of Chromatography A**, v. 776, p. 233-243, 1997.
- JAIN, S.; SHARMA, M. P. Renewable and Sustainable Energy Reviews. **Review Elsevier**, v. 14, p. 667-678, 2010.
- JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes de romã (*Punica Granatum*, L.). Revista **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.
- JING, P.; YE, T.; SHI, H.; SHENG, Y.; SLAVIN, M.; GAO, B.; LIU, L.; YU, L. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1457-1464, 2012.

KANNAN, N.; VAKEESAN, D. Solar energy for future world: - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 62, p. 1092-1105, 2016.

KATAOKA, S. Functional effects of Japanese style fermenter soy sauce (shoyo) and its components. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 227-234, 2005.

KELAWARA, N. S.; ANANTHANARAYAN, L. Antioxidant activity of selected foodstuffs. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 6, p. 511-6, 2004.

KEYZER, M. A.; MERBIS, M. D.; VOORTMAN, R. L. The Biofuel Controversy. **The Economist**, v. 156, n. 4, p. 507-527, 2008.

KHAJEH, M. Optimization of process variables for essential oil components from *Satureja hortensis* by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental design. **Journal Supercritical Fluids**, n. 55, p. 944-948, 2010.

KHALIL, O. A. K.; OLIVEIRA, O. M. M. F. O.; VELLOSA, J. C. R.; QUADROS, A. U.; DALPOSSO, L. M.; KARAM, T. K.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Atividade antifúngica e antioxidante da curcumina é aumentada na presença de ácido ascórbico. **Química dos Alimentos**, v. 133, p. 1001-1005, 2012.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oreganum vulgare* L.). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 519-24, 1989.

KLEIN, E. J. **Obtenção de compostos bioativos de folhas de Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) utilizando CO₂ supercrítico e extração com solvente assistida por ultrassom.** 105 f. Dissertação (Mestrado). Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2016.

KNEZ, Z. *et al.* Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

KNOTHE, G. Dependence of Biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Process Technology**, v. 88, p. 669, 2007.

KOSAR, M.; GÖGER, F.; BASER, K. H. C. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* (Jacq.) from Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.7, p.2369-74, 2008.

KUCEK, K. T.; CESAR-OLIVEIRA, M. A. F.; WILHELM, H. M. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 84, n. 4, p. 385-392, 2007.

LANSKY, E. P, NEWMAN, R. A. *Punica granatum* L. (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 109, p. 177-206, 2007.

LEE SMITH, A. The analytical chemistry of silicones, **John Wiley** 1991.

LEE, A. K. K.; BULLEY, N. R.; FATTORY, M.; MEISEN, A. Modeling of supercritical carbon dioxide extraction of canola oil seed in fixed beds. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 63, n.7, p. 921-925, 1986.

LEITNER, W. Green chemistry: designed to dissolve. **Nature**, v. 405, p. 129-130, 2000.

LI, H. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 454-440, 2009

LIANG, Y. C.; MAY, C. Y.; FOON, C. S.; NGAN, M. A.; HOCK, C. C.; BASIRON, Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, v. 85, n, 5, p. 867-870, 2006.

LIEBLER, D. C.; BURR, J. A.; HAM, A. J. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin e and its oxidation products. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 309-318, 1999.

LIU, G.; XU, X.; GONG, Y.; ELE, L, GAO, Y. Efeitos de parâmetros supercríticos da extração de CO₂ na composição química e atividade de eliminação de radicais livres de óleo de semente de romã (*Punica granatum* L.). **Processamento de Alimentos e Bioprodutos**, v. 90, p. 573-578, 2012.

LOMANOCO, D.; MAIA, F. J. N.; CLEMENTE, C. S.; MOTA, J. P. F.; COSTA Jr, A. E.; MAZZETTO, S. E.; Thermal studies of new biodiesel antioxidants synthesized from a natural occurring phenolic lipid. **Fuel**. v. 97, p. 552–559, 2012.

LÓPEZ-BECEIRO, J.; ARTIAGA, R.; TARRÍO-SAAVEDRA, J.; GRACIA, C.; NAYA, S.; MIER, J. L. Comparison of olive, corn, soybean and sunflower oils by P-DSC. **Journal Thermal Analysis Calorimetry**, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2^a Ed. São Paulo: Saraiva, 2008. 351p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil** – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. Ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1088p.

LOU-BONAFONTE. J. M.; MARTÍNEZ-BEAMONTE, R.; SANCLEMENTE, T.; SURRA, J. C.; HERRERA MARCOS, L. V.; SANCHEZ-MARCO, J.; ARNAL, C.; OSADA, J. Current Insights into the Biological Action of Squalene. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 62, p. 1-16, 2018.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet Extraction of Solid Materials: An Outdated Technique with a Promising Innovative Future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p, 1-10, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010.

LUTERMANN, C.; WILLEMS, E.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Effects os various binary and ternary supercritical phases on the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Journal of Chromatography A**, v. 816, p.201-211, 1998.

MAIA, E. R.; BORSATO,D.; MOREIRA, I.; SPACINO, K. R.; RODRIGUES, P. R. P.; GALLINA, A. L. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1750-1755, 2011.

MANASATHIEN, J.; INDRAPICHATE, K.; INTARAPICHETET K. Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn. peel and seed extracts. **Journal Pharmacology**, v. 2, p.131-141, 2012.

MANNINEN, P.; PAKARINEN, J.; KALLIO, H. Large-Scale Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Supercritical Carbon Dioxide Countercurrent Extraction of Cloudberry Seed Oil, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 2533–2538, 1997.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH• free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 127-130, 2001.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. R. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica* L.) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scalo-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v, 51, p. 10-16, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131-8, 2005.

MITTELBAACH, M.; GANGL, S. Long storage stability of biodiesel made from reseeded and used frying oil. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 78, n. 6, p. 573-577, 2001.

MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy Policy**, .v. 63, p. 114-122, 2013.

MOREIRA, F. **As Plantas que curam**. 5ª. Ed.. São Paulo: Editora Hemus Ltda., 1985.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MOSER, B. R. Comparative Oxidative Stability of Fatty Acid Alkyl Esters by Accelerated Methods - **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p.699–706, 2009.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v.72, p. 145-171, 2001.

MULLER, L.; FROHLICH, K.; BOHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH• assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry. Barking**, v. 129, n.1, p. 139-148, 2011.

MUKHOPADHYAY, M. **Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 72 p

MUSHTAQ, M.; SULTANA, B.; ANWAR, F.; ADNAN, A.; RIZVI, S. S. H. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction os phenolic antioxidants from pomegranate peel. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, n. 1, p. 122-131, 2015.

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

NAIK, S. N.; VAIBHA, V.; PRASANT, K. R.; AJAY, K. D. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578-597, 2010.

NAJARAN, Z. T.; HASSANZADEH, M. K.; NASERY, M.; EMAMI, S. A. **In Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**: Capítulo 45 – Dill (*Anethum graveolens* L.) Oils. Irã: **Academic Press**, 2016. p. 405–412.

NIVETHA, S.; VETHA ROY, D. Effect of natural an synthetic antioxidants an oxidative stability of FAMES obtained from hevea brasiliensis. **Journal of Energy Chemistry**, v. 22, p. 935-941, 2014.

O'BRIEN, R.; WAKELYN, P. Cottonseed oil: an oil for trans-free options. *Inform*, Sawston, v. 16, n. 11, p. 677-679, 2005.

OLIVEIRA, A. C. de.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, V. A.; VERONEZI, C. M.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N.; Avaliação de óleo de soja adicionado de extrato de casca de romã (*Punica granatum* L.) sob aquecimento. In: **X CIRG Section IV International Technical Symposium**. 2016. Disponível em <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/497.pdf>. Acesso em Jan. 2017.

ORAK, H. H.; AKTAS, T.; YAGAR, H.; İSBILIR, S. S.; EKINCI, N.; SAHIN, F. H. Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*arbutus unedo* l) fruit. **Food Sci Technol**, v. 18, n. 4, pp. 391-402, 2012.

OROZCO, F. D. A.; SOUSA, A. C.; DOMINI, C. E.; ARAUJO, M. C. U.; BAND. B. S. F. An ultrasonic-accelerated oxidation method for determining the oxidative stability of biodiesel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 3, p. 820-825, Nov. 2013.

OTHMAN, A. R.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S. ISMAIL, I. S.; ZAKARIA, M. P. Elucidation of in-vitro anti-inflammatory bioactive compounds isolated from *Jatropha curcas* L. plant root. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 11, 2015.

OUCHIKH, O.; CHAHED, T.; KSOURI, R.; TAARIT, M. B.; FALEH, H.; ABDELLY, C.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. The effects of extraction method on the measured Tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 103-110, 2011.

PALLEROS, D. R. Experimental Organic Chemistry. Santa Cruz: **John Wiley**, 1999. 836 p.

PANDE, G.; AKOH, C. C. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9427-9436, 2009.

PERES, J. R. R.; BELTRÃO, N. E. M. **Oleaginosas para biodiesel: situação atual e potencial**. In: FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. M. P. N. O futuro da indústria: Biodiesel: coletânea de artigos. Brasília: MDIC-STI/IEL, 2006. p 67-82.

PIZZOLATTI, M. G. *et al.* Artefatos cumarínicos isolados de *Polygalapaniculata* L. (*Polygalaceae* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 21- 26, 2002.

POKORNY, J., KORCZAK, J. **Preparation of natural antioxidant**. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N., *et al.*, Antioxidants in Food: practical applications. England: Editora: Woodhead Publishing Limited, 2001. p. 311-310.

POLAVKA, J.; PALIGOVÁ, J.; CVENGROS, J.; SIMON, P. Oxidation Stability of Methyl Esters Studied by Differential Thermal Analysis and Rancimat. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 82, n. 7, p. 519-524, 2005.

PROMPROM, W.; KUPITTAYANANT, P.; INDRAPICHATE, K.; WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S. The effects of pomegranate seed extract and β -Sitosterol on rat uterine contractions. **Reproductive Sciences**, v. 17, p. 288-296, 2010.

RAEMY, A.; FROELICHER, I.; LOELIGER, J. **Thermochimica Acta**, v. 114, p. 159–164, 1987.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMALHO, E. F. S. M.; ALBUQUERQUE, A. R.; SOUZA, A. L.; BARRO, A. K, MAIA, A. S.; SANTOS, I. M. G; SOUZA, A. G. -Use of different techniques in the evaluation of the oxidative stability of poultry fat biodiesel **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p.787–791, 2011.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologia de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RASHED, M. M.; KALAM, M. A.; MASJUKI, H. H.; HABIBULLAH, M.; IMDADUL, H. K.; SHAHIN, M. M.; RAHMAN, M. M. Improving oxidation stability and NOX reduction of biodiesel blends using aromatic and synthetic antioxidant in a light duty diesel engine. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 273–284, 2016.

RECASENS, F.; ABAROUDI, K.; TRABELSI, F.; CALLOUD-GABRIEL, B. Mass Transport enhancement in modified supercritical fluid. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 3505-3518, 1999.

REGINATO NETO, A.; RAMOS JUNIOR, E.U.; GALLO, P.B.; FREITAS, J.G. de; AZZINI, L.E. Comportamento de genótipos de arroz de terras altas no Estado de São Paulo. **Revista Ciência Agrônômica**, v.44, p.512-519, 2013

REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p. 1–37, 1997.

REVERCHON, E.; ADAMI, R.; CAPUTO, G. Supercritical assisted atomization: performance comparison between laboratory and pilot scale. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, p. 298-306, 2006.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166, 2006.

RIGANE, G.; BOUAZIZ, M.; SAYADI, S.; BEN SALEM, R. B. Effect of Storage on Refined Olive Oil Composition: Stabilization by Addition of Chlorophyll Pigments and Squalene. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 12, 2013.

RIZVI, S. S. H.; Supercritical fluid processing of food and biomaterials. London: Editora: **Blackie Academic & Professional**, 1994. p. 257.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSATELLA, A. A.; SIMEONOV, S. P.; FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. 5-Hidroximetilfurfural (HMF) como plataforma de blocos de construção: propriedades biológicas, síntese e aplicações sintéticas. **Química Verde**, v. 13, n. 4, p. 754, 2011.

RUMMUN N., SOMANAH J., RAMSAHA S., BAHORUN T., NEERGHEEN-BHUNJUN V.S. Bioactivity of nonedible parts of Punica granatum L.: a potential source of functional ingredients. **Journal. Food Sci**, v. 1, p. 12, 2013

RYAN, K. G.; SWINNY, E. E.; MARKHAM, K. R.; WINEFIELD, C. Flavonoid gene expression and UV protection in transgenic and mutant Petunia Leaves. **Phytochemistry**. v. 59, n. 1, p. 23-32, 2002.

SALUJA, R. K.; KUMAR, V.; SHAM, R. Stability of biodiesel – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 62, p. 8660-881, 2016.

SANTOS, N. A.; SANTOS, J. R. J.; SINFRÔNIO, F. S. M.; BICUDO, T. C.; SANTOS, I. M. G.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; FERNANDES, V. J. J. R.; SOUZA, A. G. Thermo-oxidative stability and cold flow properties of babassu biodiesel by P-DSC and TMDSC techniques. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 611, 2009.

SANTOS, D. N. *Extração com dióxido supercrítico e estudo da composição dos extratos das sementes de Pitanga (Eugenia uniflora L.)*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). USP. Pirassununga, 2012.

SANTOS, W. *Extração de compostos antioxidantes da folha de mangueira (Mangifera indica L.) utilizando CO₂ supercrítico, água e etanol*. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado) Engenharia Química. UNICAMP. Campinas, 2013.

SANTOS, A. C. C., *Análise da estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de soja na presença de antioxidantes naturais obtidos por diferentes técnicas de extração*. Dissertação (Mestrado em Bioenergia área de concentração Biocombustíveis) Universidade Estadual do Centro-Oeste. Toledo-PR, 2014.

SAUCEAU, M.; LETOURNEAU, J. J.; FREISS, B.; RICHON, D.; FAGES, J. Solubility of eflucimibe in supercritical carbon dioxide with or without a co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 31, n. 2, p. 133-140, 2004.

SCHOBER, S.; MITTELBAACH, M. Iodine value and biodiesel: is limitation still appropriate? **Lipid Technology**, v. 19, n. 12, p. 281-284, 2007.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 1, p. 199-201, 1998.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L. R.; GARDNER, P. T.; HEINONEN, M. I.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; ACPHAIL, D.; SKIBSTED, L. H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

SERRA, A. T.; SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BRONZE, M. R.; DE SOUSA, H. C.; DUARTE, C. M. M. Processing cherries (*Prunus avium* L.) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p.184-191, 2010.

SHI, J. Q.; XUE, Z.; DURUCAN, S. Supercritical CO₂ core flooding and imbibition in Tako sandstone-Influence of sub-core heterogeneity. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, v. 5, pp.75-87, 2011.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. 2^a. Ed. Editora: Lancaster CRC Press, 2003. 405p.

SHAMS ARDEKANI, M. R.; HAJIMAHMOODI, M.; OVEISI, M. R.; SADEGHI, N.; JANNAT, B.; RANJBAR, A. M.; GHOLAM, N.; MORIDI, T. Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n. 3, p. 519-524, 2011.

SHARMA, A. *et al.* Antibacterial activity of medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. **India Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n. 2, p.136-139, 2009.

SHI, L. E.; ZHANG, Z. L.; XING, L. Y.; YANG, D. D.; GUO, Y. P.; GUO, X. F.; ZHAO, L. M.; TANG, Z. X. Antioxidants extraction by supercritical CO₂. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 3, p. 300-308, 2011.

SHYU, Y. S.; LIN, J. T.; CHANG, Y. T.; CHIANG, C. J.; YANG, D.J. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 515–52, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, p. 144-158, 1965.

SINGH, R. P.; MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.81-6, 2002.

SILVA, B. T.; ANJOS, C.; NOVO, S. M. F.; MATSUMOTO, L. S.; PEIXOTO, E. C. T. M.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. **Journal Bioscience**, v. 29, n. 4, p. 974-984, 2013.

SILVA, V. H.; AQUILANTI, V.; DE OLIVEIRA, H. C.; MUNDIM, K. C. Uniform description of non-Arrhenius temperature dependence of reaction rates, and a heuristic criterion for quantum tunneling VS classical non-extensive distribution. **Chemical Physics Letters**, v. 590, p. 201-207, 2013.

SILVA-CARVALHO, V. H.; AQUILANTI, V.; DE OLIVEIRA, H. C.; MUNDIM, K. C. Deformed transition-state theory: Deviation from Arrhenius behavior and application

to biomolecular hydrogen transfer reaction rates in the tunneling regime. **Journal of Computational Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 178-188, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, 2002.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9^a. Ed., v. 1 e 2. Editora LTC, 2009.

SOUSA, L. S.; MOURA, C. V. R.; OLIVEIRA, J. E.; MOURA, E. M. Use of natural antioxidants in soybean biodiesel. **Fuel**, v. 134, p. 420-428, 2014.

SOUSA DE SÁ, P. G.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; SIQUEIRA FILHO, J. A.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. R.; BRANCO, A.; SILVA ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M. Jr.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, A. T.; BENAZZI, T. L.; GRINGS, M. B.; CABRAL, V.; SILVA, E. A.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C. Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erithropappus* L.) oil using 92 supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 182-187, 2008.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**. v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H.; RAT, V.; KHACHATURYAN, M.; VLCEK, D. Solubility of squalene and dinolyl phthalate in CO₂ with entrainers. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 145-149, 1999.

SPACINO, K.; BORSATO, D.; BUOSI, G.; CHENDYNSKI, L. Determination of kinetic and thermodynamic parameters of the B100 biodiesel oxidation process in mixtures with natural antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 366-370, 2015.

STAVINOHA, L. L.; KLINE, K. S. Report, Oxidation Stability of Methyl Soyates - Modified ASTM D 5304 and D 6186 for Biodiesel B100. **Warren: U.S. Army, TACOM, TARDEC, National Automotive Center**, 2001.

STEINGASS, C. B.; GLOCK, M. P.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R. Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas Comosus* L.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MS (n) and CG-MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 6463-6479, 2015.

SUPRIYONO.; SULISTYO, H.; ALMEIDA, M. F.; DIAS, J. M. Influence of synthetic antioxidants on the oxidation stability of biodiesel produced from acid raw *Jatropha curcas* oil. **Fuel Processing Technology**, v. 132, p. 133–138, 2015.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, 2010.

TAPANES, N. L. C., ARANDA, D. A. G., PEREZ, R. S. P., CRUZ, Y. R. Biodiesel no Brasil: Matérias Primas e Tecnologias de Produção. **Acta Scientiae & Technicae**, v. 1, n. 1, p. 120-125, 2013.

TAVARES, M. L. A.; QUEIROZ, N.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. L.; CAVALCANTI, E. H. S.; BARROS, A. K. D.; ROSENHAIM, R.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA TAVARES, A. G. Use of P-DSC in the evaluation of antioxidant efficiency. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** v. 106, n. 2, p. 575, 2011.

TÁVORA, F. L. Biodiesel e proposta de um novo marco regulatório: obstáculos e desafios. **Núcleo de Estudos e Pesquisa do Senado**, v. 116, p. 43, 2012.

TRABER, M.G.; SIES, H. **Vitamin E in humans: Demand and Delivery. Annual Review of Nutrition**, v. 16, p.321 – 347, 1996.

TRIPATHI, N.; KUMAR, S.; RAKESH SINGH, K.; SINGH, C. J.; SINGH, P.; VARSHNEY, V. K. Isolation and Identification of - Sitosterol by GC-MS from the Leaves of *Girardinia heterophylla* (Decne). **The Open Bioactive Compounds Journal**, v. 4, p. 25-27, 2013.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

TULLOCH, A. P. Chemistry and biochemistry os Natural Waxes. New York: Elsevier, 1976. P. 235-287.

VALLE, M. L. M.; LEONARDO, R. S.; DWECK, J. Comparative study of biodiesel oxidation stability using Rancimat, PetrOXY, and low P-DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 116, n. 1, p. 113-118, 2014.

VASAPOLLO, G.; LONGO, L.; RESTIO, L.; CIURLIA, L. Innovative supercritical CO₂ extraction of Lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, n. 1- 2, p. 87-96, 2004.

VECCHIO CIPRIOTI, S.; CHIAVARO, E. Introduction. In E. Chiavaro (Ed.), *Differential scanning calorimetry: Applications in fat and oil technology*, p. 15-18, 2014.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WERKMAN, C.; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W. D.; SAMPAIO, F. C.; BRANDÃO, A. A. H.; RODE, S. M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L (romã). **Revista Brasileira de Medicina**, v. 10, n. 3, p. 104-11, 2008.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 399-414, 1999.

YAAKOB, Z.; NARAYANAN, B. N.; PADIKKAPARAMBIL, S.; UNNI K. S.; AKBAR, P. M. A review on the oxidation stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 136–153, 2014.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZHOU, J.; XIONG, Y.; & XU, S. (2016). Evaluation of the oxidation stability of biodiesel stabilized with antioxidants using the PetroOXY method. **Fuel**, v. 184, p. 808–814, 2016.

ZULETA, E. C.; BAENA, L.; RIOS, L. A.; CALDERÓN, J. A. The oxidative stability of biodiesel and its impact on the deterioration of metallic and polymeric materials: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 12, p. 2159-2175, 2012.