

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

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS NA ESTABILIDADE TERMO-
OXIDATIVA DO BIODIESEL E ANTIMICROBIANA NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

DANIELLA MARIZ DE SOUSA

**TOLEDO
2019**

DANIELLA MARIZ DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS NA ESTABILIDADE TERMO-
OXIDATIVA DO BIODIESEL E ANTIMICROBIANO NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra Maria Luiza Fernandes Rodrigues

**TOLEDO
2019**

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

Mariz de Sousa, Daniella

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS NA ESTABILIDADE TERMO-
OXIDATIVA DO BIODIESEL E ANTIMICROBIANA NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA / Daniella Mariz de Sousa; orientador(a), Edson
Antonio da Silva; coorientador(a), Maria Luiza Fernandes
Rodrigues, 2019.
128 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia,
2019.

1. Estabilidade Oxidativa. 2. Potencial Antimicrobiano.
3. Biodiesel. 4. Etanol. I. Antonio da Silva, Edson. II.
Luiza Fernandes Rodrigues, Maria III. Título.

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

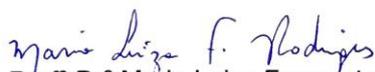
Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por DANIELLA MARIZ DE SOUSA perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 19 de fevereiro de 2019

COMISSÃO JULGADORA

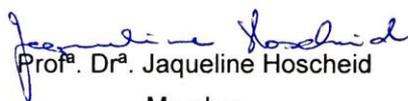


Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Orientador



Profª Drª Maria Luiza Fernandes Rodrigues
Coorientadora



Profª Drª Jaqueline Hoscheid

Membro



Profª Drª Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

Membro

Dedico esse trabalho a minha mãe, meu maior exemplo, seu cuidado e dedicação foram o que me deram em alguns momentos, a esperança para seguir. E aos meus irmãos, em que a presença de cada um significou segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo, à minha família: Pai (*in memoriam*), Mãe, Irmãos e cunhados. Os quais lutaram sempre pela minha educação e foram capazes de priorizá-la. Não sei o que seria sem eles, mas com certeza o que eu não sou hoje.

A minha grande amiga e companheira de mestrado Ana Paula Becker Viana que compartilhou sofrimentos, apreensões, aflição, dúvidas e alegrias nessa etapa. Agradeço ao Lucas Berta por todo suporte, companheirismo e motivação nas horas difíceis.

E aos meus amigos de vida, Jéferson Tiago Pontille, Mayara Caroline Pavan, Tainara Binotto, Elton Calsavara, Giovani Piovan, Gustavo Pimentel e ao Leonardo Rodrigues, que apesar de não terem ajudado diretamente na realização desse trabalho, foram fundamentais para eu ser o que hoje sou.

Agradeço a todos os professores da Unioeste pelo acolhimento, e por todo o conhecimento agregado ao longo desse período. Em especial ao meu professor e orientador Edson A. da Silva, que foi fundamental na elaboração e execução deste trabalho e a co-orientadora Maria Luiza Fernandes.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato e aos estagiários do Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LPAC) da Universidade Estadual de Londrina pelo auxílio no desenvolvimento dos testes de estabilidade oxidativa. E a Prof^a Jaqueline Hoscheid da Unipar pelo auxílio na parte microbiológica.

Ao estagiário Leandro Couto da Central Analítica da Unioeste pelo auxílio nas análises de Calorimetria Diferencial Exploratória - DSC. Aos técnicos do GERPEL por cederem o espaço e os equipamentos necessários para as extrações.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Meu agradecimento especial a Deus, pois Dele provém todos os recursos com que alimento minha alegria e minhas vitórias. E, finalmente, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que eu completasse essa etapa. Deixo aqui um agradecimento geral.

“A tarefa não é ver o que ninguém viu ainda, mas pensar aquilo que ninguém pensou a respeito daquilo que todo mundo vê.”

(SCHOPENHAUER, 2010).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Energia	5
3.2 História do Biodiesel.....	6
3.3 Biodiesel.....	9
3.3.1 Matérias-Primas para Produção de Biodiesel	10
3.3.2 Produção de Biodiesel.....	12
3.3.3 Propriedades do Biodiesel.....	14
3.4 Estabilidade Oxidativa do Biodiesel.....	16
3.4.1 Método Rancimat	17
3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	19
3.5 Substâncias Antioxidantes	20
3.5.1 Classificação e Mecanismo De Ação	21
3.5.2 Antioxidantes Sintéticos	22
3.5.3 Antioxidantes Naturais.....	24
3.6 História do Etanol	27
3.7 Etanol	28
3.7.2 Produção de Etanol	31
3.7.3 Fermentação Alcoólica.....	33
3.8 Contaminação Bacteriana	36
3.9 Microrganismos	37
3.10 Substâncias Antimicrobianas	38
3.10.1 Classificação e Mecanismo de Ação.....	39
3.10.2 Resistência Microbiana	40
3.11 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	41
3.12 Extração de Compostos Naturais.....	42
3.12.1 Extração Convencional.....	43

3.12.2 Extrator de Óleos e Gorduras – Goldfish.....	44
3.13 Plantas Antioxidantes e Antimicrobianas.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Matérias-primas.....	48
4.1.1 Preparo das Matérias-primas	48
4.2 Caracterização das Matérias-primas	49
4.2.1 Determinação do Diâmetro Médio das Partículas (Ds).....	49
4.2.2 Umidade das Matérias-primas.....	49
4.3 Obtenção dos Extratos	50
4.3.1 Extração Convencional.....	50
4.4 Caracterização dos Extratos	52
4.4.1 Testes Fitoquímicos Preliminares: Colorimetria, Precipitação.....	52
4.4.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TFT) pelo Método Folin-Ciocalteu	54
4.4.3 Determinação da Atividade Antioxidante Pelo Método DPPH•.....	55
4.5 Obtenção do Biodiesel	56
4.5.1 Caracterização do Biodiesel.....	57
4.6 Teste de Estabilidade Oxidativa do Biodiesel.....	58
4.6.1 Aditivção do Biodiesel para o teste DSC	58
4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	59
4.7 Rancimat	59
4.8 Atividade Antimicrobiana da Fermentação Alcoólica.....	60
4.8.1 Análise Microbiológica dos Caldos	60
4.8.2 Coloração de Gram	62
4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	62
4.9.1 Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
5.1 Caracterização das Matérias-primas	65
5.1.1 Granulometria das Amostras	65
5.1.2 Umidade das Amostras	66
5.2 Extração convencional – Goldfish	67

5.3.2 Determinação do Teor de Compostos fenólicos totais (TFT) método FolinCiocalteau.....	69
5.3.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•	71
5.4 Caracterização do Biodiesel	73
5.5 Estabilidade oxidativa do Biodiesel	75
5.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC.....	75
5.5.2 Rancimat	79
5.6 Atividade Antimicrobiana da Fermentação Alcoólica.....	83
5.6.1 Análise Microbiológica dos Caldos	83
5.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Classificação dos extratos naturais.....	86
6 CONCLUSÃO.....	92
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais Matérias-Primas Empregadas na Produção de Biodiesel no Brasil.	12
Figura 2 - Reação geral para transesterificação de triglicerídeos.	13
Figura 3 - Esquema do mecanismo da oxidação lipídica.	17
Figura 4 - Princípio de funcionamento de equipamento Rancimat e seus componentes.	18
Figura 5 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários.	21
Figura 6 - Estrutura fenólica de antioxidantes sintéticos.	23
Figura 7 - Molécula dos tocoferóis.	25
Figura 8 - Estrutura dos ácidos fenólicos.	26
Figura 9 - Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica.	35
Figura 10 - Guaxupita.	45
Figura 11 - Aparelho extrator de gordura - Goldfish.	51
Figura 12 - Fluxograma da extração convencional.	52
Figura 13 - Esquema de diluições seriadas para o plaqueamento.	61
Figura 14 - Biodiesel de soja.	74
Figura 15 - Perfil cromatográfico do biodiesel de soja.	75
Figura 16 - Curva referente à análise DSC para o biodiesel comercial puro, aditivado com os antioxidantes sintéticos e com os extratos da Guaxupita.	77
Figura 17 - Gráfico da condutividade em função do tempo, da avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel comercial (controle) sem adição de antioxidantes.	79
Figura 18 - Gráfico que indica o tempo de indução do biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificação do Biodiesel.....	14
Tabela 2: Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração convencional.	50
Tabela 3: Classificação de Gram.	63
Tabela 4: Concentrações (mg/mL) dos extratos etanólicos nos poços das microplacas.	63
Tabela 5: Concentrações (mg/mL) dos extratos acetato de etila e hexano nos poços das microplacas.	64
Tabela 6: Distribuição granulométrica das folhas após secagem e moagem.	65
Tabela 7: Rendimento global das extrações convencionais com extrator de gordura - Goldfish.....	67
Tabela 8: Triagem fitoquímica.	68
Tabela 9: Teor de fenólicos totais para os extratos.....	70
Tabela 10: Atividade antioxidante dos extratos na concentração de 1000 µg.mL ⁻¹ e a capacidade de redução de 50% do radical DPPH• (EC ₅₀).	72
Tabela 11: Caracterização do Biodiesel.	73
Tabela 12: Resultados encontrados para as análises DSC no biodiesel aditivado com os extratos naturais.	76
Tabela 13: Tempo de indução obtido na análise Rancimat para as amostras de biodiesel aditivadas com os extratos das folhas da Guaxupita.	81
Tabela 14: Contagem das placas (UFC).	83
Tabela 15: Aspectos das colônias e coloração de Gram.....	85
Tabela 16: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos extratos das folhas de Guaxupita.....	86
Tabela 17: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos extratos das folhas do Sabugueiro.....	87
Tabela 18: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos extratos das folhas do Abacateiro.	88

Tabela 19: Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática dos extratos das folhas de Guaxupita.....	89
Tabela 20: Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática dos extratos das folhas de Sabugueiro.....	89
Tabela 21: Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática dos extratos das folhas de Abacateiro.....	90

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
EM	Committee 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

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS NA ESTABILIDADE TERMO- OXIDATIVA DO BIODIESEL E ANTIMICROBIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

AUTOR: DANIELLA MARIZ DE SOUSA

ORIENTADOR: PROF. Dr. EDSON ANTONIO DA SILVA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 19 de fevereiro de 2019. 129 p.

RESUMO

Os combustíveis fósseis são fontes não renováveis de energia, o que motiva a busca por novas alternativas que além de limpas e renováveis, devem apresentar boa qualidade e rendimento. O biodiesel e o etanol são os principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil. O biodiesel tem em sua estrutura ácidos graxos insaturados que facilitam processos de oxidação acelerado pela temperatura e umidade. Já o etanol é produzido por processos fermentativos, devido à ação biológica das leveduras. Sendo os microrganismos contaminantes uma das condições responsáveis pela inibição e queda da viabilidade das leveduras, além de diminuir o rendimento da fermentação. Com o intuito de aumentar a estabilidade oxidativa do biodiesel e controlar os microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica do etanol, os extratos naturais podem ser usados como alternativa na substituição dos agentes sintéticos. Foram testados os extratos das folhas do *Persea americana*, *Sambucus nigra* e *Esenbeckia grandiflora* extraídos com o extrator de gorduras – Goldfish, utilizando como solventes álcool etílico, acetato de etila e hexano na concentração de 1:10 massa/volume. Avaliou-se o efeito dos extratos na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de soja metílico, pela técnica de Calorimetria Diferencial Exploratória

(DSC), o extrato que apresentou o melhor resultado foi submetido ao teste de Oxidação Acelerada Rancimat. Para a contaminação microbiológica foi determinada a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Caldo absoluto, Caldo Tratado e do Caldo Fermentado e identificado o Gram das bactérias. Determinando as concentrações mínimas inibitórias (CIM) dos extratos, classificando-os de acordo com seu potencial bactericida e bacteriostático. A partir dos resultados conseguidos com o DSC e confirmados pelo método Rancimat, nota-se que as folhas da *E. grandiflora* podem ser utilizadas para obtenção de extratos com atividade antioxidante, considerando-o um possível substituinte dos antioxidantes sintéticos. No processo fermentativo as bactérias Gram-positivas foram predominantes, com níveis de contaminação superiores a 10^7 UFL/mL, resultado esse que acarreta a prejuízos significativos. Os extratos naturais mostraram-se eficientes inibindo a maioria dos microrganismos. As folhas da *E. grandiflora* apresentou-se eficientes em todos os microrganismos analisados, tendo ação bacteriostática em todas variações das concentrações. As folhas do *P. americana* extraído com os solventes acetato de etila e hexano apresentaram a menor CIM de 1,25 mg/mL frente a bactéria *Lactobacillus casei*, sendo os únicos com ação bactericida. Esses extratos apresentam alta capacidade para serem usados como substituintes dos antimicrobianos sintéticos. No entanto, tornam-se necessários mais testes para essa finalidade.

Palavras-chave: *Esenbeckia grandiflora*. Goldfish. Rancimat.

EVALUATION OF NATURAL EXTRACTS IN THE THERMO-OXIDATIVE STABILITY OF BIODIESEL AND ANTIMICROBIAL IN ALCOHOLIC FERMENTATION

AUTHOR: DANIELLA MARIZ DE SOUSA

SUPERVISOR: PROF. Dr. EDSON ANTONIO DA SILVA

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on February, 19th 2019. 129 p.

ABSTRACT

The fossil fuels are non-renewable sources of energy, which motivates the search for new alternatives that besides clean and renewable it should present good quality and performance. Biodiesel and ethanol are the main liquid biofuels used in Brazil. Biodiesel has unsaturated fatty acids in its structure that facilitate processes of accelerated oxidation by temperature and humidity. Ethanol, on the other hand, is produced by fermentation processes, due to the biological action of yeasts. Contaminant microorganisms are one of the conditions responsible for the inhibition and decrease of yeast viability, besides reducing the fermentation yield. In order to increase the oxidative stability of biodiesel and control the contaminating microorganisms of ethanol's alcoholic fermentation, natural extracts can be used as an alternative to synthetic agents. The extracts from the leaves of *Persea americana*, *Sambucus nigra* and *Esenbeckia grandiflora* extracted with the fat extractor - Goldfish were tested, using ethylic alcohol, ethyl acetate and hexane as solvents at a concentration of 1:10 mass/volume. The effect of the extracts on the thermo-oxidative stability of methyl soy biodiesel was evaluated by the Differential Exploratory Calorimetry (DSC) technique, the extract that presented the best result was submitted to the Rancimat Accelerated Oxidation test. For

microbiological contamination, the quantity of colony forming units (CFU/mL) of absolute broth, treated broth and fermented broth was determined and the bacteria Gram was identified. Determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) of extracts, classifying them according to their bactericidal and bacteriostatic potential. From the results obtained with the DSC and confirmed by the Rancimat method, it is noted that the *E. grandiflora* leaves can be used to obtain extracts with antioxidant activity, considering it a possible substitute for synthetic antioxidants. In the fermentation process, Gram-positive bacteria were predominant, with contamination levels higher than 10^7 UFL/mL, which results in significant losses. The natural extracts were shown to be efficient in inhibiting most microorganisms. The leaves of *E. grandiflora* were efficient in all microorganisms analyzed, with bacteriostatic action in all concentration variations. The leaves of the *P.americana* extracted with the solvents ethyl acetate and hexane showed the lowest MIC of 1,25 mg/mL compared to *Lactobacillus casei* bacteria, being the only one with bactericidal action. These extracts have a high capacity to be used as substitutes for synthetic antimicrobials. However more tests are needed for this purpose.

Key words: *Esenbeckia grandiflora*. Goldfish. Rancimat.

1 INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia utilizada no mundo deriva-se dos combustíveis fósseis. No entanto, essas fontes são limitadas e estudos de prospecção revelaram o esgotamento no futuro. Além desse eventual esgotamento e dos reflexos que poderiam ocasionar na economia, também é necessário considerar os aspectos ambientais. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o uso de combustíveis fósseis é a principal causa do aumento da concentração de gases do efeito estufa, portanto, a busca por fontes alternativas de energia que sejam renováveis e limpas, como os biocombustíveis são de suma importância (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

O biodiesel e o etanol são os principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil, derivados da biomassa renovável, podem substituir parcial ou integralmente, compostos de origem fósseis em motores ou em outros tipos de geração de energia. Por serem biodegradáveis, e praticamente livres de enxofre e compostos aromáticos, não causam impactos elevados ao meio ambiente (ANP, 2016).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicomustível (ANP, 2018) o biodiesel pode ser definido como sendo um composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, conseguido a partir do processo de transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de óleos ou gorduras de origem vegetal (oleaginosas) ou animal.

Os ácidos graxos insaturados presentes nas matérias-primas usadas para a produção do biodiesel, facilitam processos de oxidação, tornando-o mais sensível à degradação por oxidação que os combustíveis fósseis (FOCKE; WESTHUIZEN; OOSTHUYSEN, 2012). Além desse, outros fatores como a temperatura e umidade podem alterar suas propriedades. Também, quando exposto a ação do ar e da luz, está sujeito à degradação, por autooxidação e foto-oxidação (BORSATO *et al.*, 2010).

Com o propósito de aumentar a estabilidade do biodiesel são utilizados antioxidantes sintéticos ou naturais capazes de impedir ou atrasar a formação de

compostos que prejudicam as propriedades desse biocombustível (REGINATO-NETO *et al.*, 2013). O uso de extratos naturais encontrados em plantas que apresentam atividade antioxidante é uma alternativa para substituir os de origem sintética o que acarreta na diminuição no custo final do produto. Esses compostos podem ser extraídos por diferentes técnicas como por meio de extração convencional, utilizando solventes orgânicos ou água e, extração utilizando fluidos supercríticos, como o CO₂. Essa extração é feita em alta pressão, quando utilizada em baixas temperaturas previne a degradação dos compostos antioxidantes presentes nas plantas (SANTOS, 2014).

De acordo com a resolução ANP no 45/2014 a estabilidade à oxidação do biodiesel é de 110° C é de 8 horas (ANP, 2014). Essa estabilidade oxidativa pode ser melhorada tanto adicionando antioxidantes naturais ou sintéticos. Dentre os antioxidantes sintéticos, comercialmente mais utilizados são TBHQ (Terc-butil-hidróxi-quinona), BHT (Butil-hidróxi-tolueno), BHA (Butil-hidróxi-anisol) e PG (Propil Galato) que corroboram com aumento no tempo de indução a oxidação (KARAVALAKIS; STOURNAS, 2011). Quando comparados com os antioxidantes sintéticos, os naturais podem ser tão eficientes quanto eles (BALL, 2006).

Já o etanol é produzido por processos fermentativos, devido à ação biológica das leveduras, que transformam os açúcares presentes no mosto, em etanol, gás carbônico e compostos secundários. No entanto, as leveduras necessitam de condições favoráveis para que suas atividades metabólicas sejam apropriadas (BADIN, 2010). O alto índice de microrganismos contaminantes durante os processos fermentativos é uma das condições responsáveis pela inibição e queda da viabilidade das leveduras. Além de causarem prejuízos no consumo de açúcar, formação de goma e floculação do fermento o que conseqüentemente diminui o rendimento da fermentação (NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007).

Para reduzir essa contaminação são utilizados antibióticos sintéticos, que possuem propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Contudo o uso contínuo desses produtos sintéticos favorece o desenvolvimento de linhagens resistentes, tornando-as cada vez menos sensíveis

à sua ação, causando um alto custo do processo de produção, além de possibilitar a incorporação de resíduos no produto final obtido. Por questões de saúde pública, o uso de produtos de origem natural é uma alternativa segura, eficaz e de baixo custo (BREGAGNOLI, 2006).

Os extratos naturais estão sendo empregados com amplo sucesso tanto na estabilidade oxidativa do biodiesel quanto no controle de microrganismos contaminantes da fermentação do etanol, mas os resultados ainda são demonstrados de forma isolada (BERTUCCI, 2009). Tendo em vista a ampla distribuição e a exiguidade de trabalhos que relatam essas atividades, torna-se evidente a necessidade de avaliar extratos naturais e padronizá-los para o uso em larga escala, assim diminuindo o custo na produção e aumentando a qualidade do produto final.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade termo-oxidativa do biodiesel (B100) e a atividade antimicrobiana na fermentação alcoólica do etanol utilizando extratos naturais obtidos das folhas do Abacateiro (*Persea americana*), Sabugueiro (*Sambucus nigra*) e Guaxupita (*Esenbeckia grandiflora*). Conseguídos pelo método convencional de extração (Goldfish) variando o solvente conforme sua polaridade.

2.2 Objetivos Específicos

- Os extratos das folhas Abacateiro, Sabugueiro e Guaxupita foram obtidos pelo método convencional de extração utilizando o extrator de óleos e gorduras - Goldfish variando o solvente conforme sua polaridade (Etanol, Acetato de Etila e Hexano).
- Avaliar o efeito dos extratos naturais na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de soja (B100), pela técnica de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), sendo que a espécie que apresentou os extratos com melhores resultados, esses foram submetidos ao teste de Oxidação Acelerada Rancimat.
 - Caracterizar os extratos naturais quanto a sua composição;
 - Determinar a quantidade microbiológica em unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do Caldo absoluto, Caldo Tratado e do Caldo Fermentado.
 - Identificar o Gram das bactérias oriundas dos Caldos.
 - Determinar as concentrações mínimas inibitórias (CIM) dos extratos;
 - Classificar os extratos de acordo com seu potencial bactericida e bacteriostático.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energia

A energia é uma das principais potências que impulsionam o desenvolvimento de um país, sendo fundamental nos processos produtivos, além de aumentar o bem-estar da população. Para atender à demanda energética crescente são necessários altos investimentos. Entretanto, o custo do sistema energético não se resume apenas aos valores monetários, mas, também, nos impactos ambientais, como o aquecimento global, intensificação do efeito estufa causados pelo consumo e produção. Além dos riscos de acidentes que podem ter consequências devastadoras tanto para o meio ambiente quanto para a sociedade. Ademais, as reservas de combustíveis fósseis são limitadas e o aumento no consumo é um dos motivos que estimula a busca por fontes alternativas de energias (PEREIRA *et al.*; 2014; SALUJA *et al.*; 2016).

Em 1973, ocorreu um marco na história energética do planeta. Época em que a dependência da sociedade por fontes de energia fóssil crescia desordenadamente, desde então o homem começou a buscar fontes de energia alternativas. Diante desse cenário de valorização por essas fontes, criou-se um panorama propício para a ascensão dos biocombustíveis. Porém, é necessário um planejamento energético que possibilite o atendimento da demanda de energia de forma eficiente, econômica, segura, confiável e que causem o menor impacto à natureza (FURTADO, 1985).

O Brasil dispõe de uma matriz energética de origem predominantemente renovável. Dados do Balanço Energético Nacional (BRASIL, 2018) mostraram que em 2018, essas fontes representaram 82% da oferta interna de energia do país. Entretanto, o crescimento da demanda por energia vai exigir que o país utilize todas as fontes disponíveis para garantir o suprimento à população. Nesse sentido, há vários caminhos que podem ser seguidos, dada a disponibilidade de recursos energéticos no país (FURTADO, 1985).

A geração e o consumo de combustíveis derivados de matérias-primas renováveis, como o álcool e o biodiesel, exibiu crescimento relevante no Brasil em 2018. De janeiro a agosto, o aumento na produção de biodiesel foi de 26% e a alta no consumo de etanol automotivo chegou a 14%, em comparação com o mesmo período do ano anterior. Os índices seguem a expectativa mundial de substituir gradativamente os combustíveis fósseis por biocombustíveis com menores emissões de gases nocivos (ANP, 2018).

Os dados divulgados pelo Ministério de Minas e Energia (MME) apontam que as fontes renováveis representaram 44% na matriz energética do país em 2018, com acréscimo de 1% em relação ao ano anterior. O Brasil segue em segundo lugar como produtor de etanol, até novembro de 2018, cerca de 200 milhões de barris foram produzidos. E o terceiro lugar na produção e consumo de biodiesel B100, com cerca de 30 milhões de barris produzidos até novembro de 2018.

Esses biocombustíveis vêm sendo amplamente estudados para substituição parcial ou integral dos combustíveis de origem fóssil, por serem derivados de fontes naturais e renováveis principalmente de vegetais, fato que tem aumentado interesse nas pesquisas nos últimos anos (KANNAN; VAKEESAN, 2016). Ambos são considerados promissores, devido sua capacidade de queima fácil, eficiências na produção de energia e menor impacto ambiental com baixa taxa de poluentes em comparação com os combustíveis de origem do petróleo (GUILLÉN; CABO, 2001; BUOSI *et al.*, 2016; KANNAN; VAKEESAN, 2016).

3.2 História do Biodiesel

No final do século XIX Rudolf Diesel e Henry Ford, realizaram os primeiros testes com óleo de amendoim em motores a diesel, encontrando nos óleos vegetais grande potencial para se tornar um combustível. A partir dessa descoberta, diversos combustíveis puderam ser utilizados em motores, entre eles o álcool produzido a partir de biomassa. Embora nesse período tivessem suas

pesquisas adiadas pelo acelerado avanços da indústria do petróleo deixaram o caminho para pesquisas futuras (CABRAL; MURPHY, 2009).

Algumas décadas depois, a junção dos óleos vegetais com o álcool, produzidos a partir do processo químico de transesterificação, pode propiciar um novo combustível de origem renovável, o éster de óleo vegetal, conhecido como biodiesel. A produção desse biocombustível sofreu um longo e lento processo de evolução. No entanto, as tentativas de utilização de óleos e mesmo álcool de cana-de-açúcar, puderam ser identificados como precursores dos tipos de biodiesel modernos (BRASIL, 2006).

Pioneiro na América Latina em 1903, já se discutia no Brasil o uso de biocombustíveis para funções energéticas. Mas foi em 1937 na Bélgica que ocorreu a primeira concessão de patente aos combustíveis obtidos a partir de óleos vegetais. No entanto, foi a partir de 1920 que iniciou a trajetória do biodiesel no Brasil, com incentivo do Instituto Nacional de Tecnologia. Mas, somente no final da década de 1970 que foi criado o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Proóleo), mediante a crise energética internacional (CABRAL; MURPHY, 2009).

Em 1983, o Governo Brasileiro, motivado pelo aumento do preço do petróleo, definiu a implantação do Programa de Óleos Vegetais (Projeto OVEG) antes chamado de Proóleo, no intuito de testar o uso do biodiesel puro e em diferentes níveis de mistura ao diesel mineral (TÁVORA, 2012). Coordenado pelo antigo Ministério da Indústria e Comércio, essa iniciativa teve a participação das indústrias automobilísticas, de autopeças, de óleos vegetais, de combustíveis e lubrificantes, além de diferentes centros de pesquisa.

No ano de 2002, a etanolise de óleos vegetais foi considerada como a rota principal para um programa nacional de substituição do diesel de petróleo, batizado de PROBIODIESEL na Portaria MCT nº 702 de 30 de outubro de 2002. No entanto, este programa foi descontinuado por não priorizar a agricultura familiar, o que veio a se tornar uma prioridade na readequação dos objetivos do programa (RABELO, 2001).

Em julho de 2003, a Presidência da República designou a Comissão Executiva Interministeriais do Biodiesel (CEIB) e do Grupo Gestor incumbidos de apresentar estudos sobre a viabilidade da utilização do biodiesel como fonte alternativa de energia automotiva. Como resultado, foi elaborado um relatório que serviu como base para a elaboração do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), com o objetivo inicial de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. A implantação do PNPB foi fundada por meio de Decreto em 23 de dezembro de 2003, sendo que o lançamento oficial do PNPB se deu em 6 de dezembro de 2004 (RAMOS; WILHELM, 2005)

Em 24 de novembro de 2004, foi divulgada a Resolução da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº 42, que determinou a especificação nacional do biodiesel que poderia ser adicionado ao óleo diesel na proporção de 2% em volume (B2) em caráter experimental. Em 13 de janeiro de 2005, a Lei 11.097/2005 dispôs sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo CNPE até o atual percentual de 10% em março de 2018 (ANP, 2018; RAMOS; WILHELM, 2005).

A caracterização do biodiesel tem sido aperfeiçoada constantemente ao longo dos anos, o que tem contribuído para a sua conformação com as normas internacionais e adaptação da sua qualidade às condições do mercado brasileiro, garantindo maior segurança e expectativa aos agentes econômicos. Deste modo, o biodiesel já é uma realidade no País e garante ao Brasil uma posição destacada internacionalmente. Juntos, etanol e biodiesel fortalecem a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional e a imagem do Brasil como país que prioriza e aproveita a diversidade de fontes renováveis e limpas de energia (ANP, 2018).

3.3 Biodiesel

Devido à elevada demanda energética e os problemas ambientais, surge a necessidade do uso de fontes de energias renováveis e que causem o menor impacto possível ao meio ambiente. O biodiesel aparece como uma das alternativas para substituir o óleo diesel minimizando as dependências de importações de petróleo e reduzindo a poluição através da diminuição das emissões de gases poluentes (GERIS *et al.*, 2007).

O biodiesel é um biocombustível produzido, principalmente, a partir da reação de transesterificação de um óleo ou gordura, que ocorre somente na presença de um catalisador e de um álcool. Existem outros processos para produção do biodiesel, como craqueamento e esterificação que são menos utilizados pela indústria (OLIVEIRA, 2012; SILVA; FREITAS, 2008).

A molécula do biodiesel apresenta ésteres de ácidos graxos insaturados que são responsáveis por processos oxidativos. No entanto, a estabilidade oxidativa não depende exclusivamente da sua composição química, como também das condições as quais o produto foi submetido durante o processamento, do meio e maneira de estocagem. O grau de oxidação do biodiesel durante o período de armazenamento influencia diretamente no potencial do combustível e esse não têm homogeneidade na queima, o que acarreta em um atraso na ignição para os motores de ciclo diesel (OLIVEIRA, 2012).

Este biocombustível pode ser utilizado puro ou em misturas ao óleo diesel derivado do petróleo, em diferentes proporções. Quando o combustível provém da mistura do óleo diesel e o biodiesel, recebe o nome da percentagem de participação do biodiesel, sendo B2 quando possui 2% de biodiesel, B20 quando possui 20%, até chegar ao B100, que é o biodiesel puro (OLIVEIRA, 2012; SILVA; FREITAS, 2008).

No Brasil essa mistura passou a ser de 10%, em volume, a partir de março de 2018, conforme Lei 13.263/2016. No mesmo ano a produção de B100 no país cresceu mais de 13% em relação ao ano anterior, utilizando como principais

matérias-primas o óleo de soja (65%), seguido do sebo bovino (12%). A estimativa é que a produção do biodiesel brasileira passe de 5,4 para mais de 10 bilhões de litros anuais com a proposta de aumento gradativo do percentual obrigatório de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, que pode chegar até 15% (B15) entre 2018 e 2023. Esse crescimento representa um aumento de 85% da demanda doméstica, o que deve consolidar o Brasil como um dos maiores produtores de biodiesel no mundo (ANP, 2018).

3.3.1 Matérias-Primas para Produção de Biodiesel

Várias fontes são disponíveis para a geração de energias renováveis, os óleos vegetais se destacam não só pela adequação das suas propriedades, mas também por representarem forte apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida, sendo possível um aproveitamento eficaz de cada região e assim oferecendo alternativas a problemas econômicos e socioambientais (PARENTE, 2003).

Segundo Câmara (2006), existem muitas matérias-primas potenciais no Brasil que podem ser usadas na produção do biodiesel, e podem ser divididas por classes de fontes renováveis:

- a) Óleos vegetais: líquidos à temperatura ambiente, como os óleos de soja, algodão, amendoim, babaçu, canola, dendê, girassol, mamona;
- b) Gorduras animais: pastosas ou sólidas à temperatura ambiente, como o sebo bovino, óleo de peixe, banha de porco, óleo de mocotó;
- c) Óleos e gorduras residuais: matérias-primas relacionadas ao meio urbano, como óleos residuais originários de cozinhas domésticas e industriais (óleo de fritura); gordura sobrenadante (escuma) de esgoto; óleos residuais de processamentos industriais

Devido a sua vasta extensão territorial, o Brasil apresenta uma grande diversidade de matérias-primas de origem vegetal para a produção de biodiesel. Porém, a viabilidade de cada matéria-prima dependerá de suas propriedades técnicas, sua competitividade econômica e seus benefícios socioambientais,

contemplando aspectos como: teor de óleo; produtividade agrícola (produção por unidade de área); equilíbrio agrônômico; diferentes sistemas de produção; ciclo cultural (sazonalidade); adaptação regional; e impacto socioambiental de seu desenvolvimento. A análise desses aspectos é de extrema importância para definir estratégias de produção e exploração do potencial energético dos recursos naturais disponíveis de forma sustentável e eficiente (SALLET, 2011).

Quanto aos estudos desenvolvidos para utilização na produção nacional de biodiesel, as espécies de plantas oleaginosas mais pesquisadas são: a soja, o girassol, a mamona, o milho, o pinhão-manso, o caroço de algodão, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê e o amendoim (PARENTE, 2003, RAMOS *et al.*, 2003).

Segundo a ANP, dados de novembro de 2018, a principal matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel no Brasil é o óleo de soja, contribuindo com 66,97% da produção, em segundo lugar está a gordura bovina com 12,59%, em terceiro outros materiais graxos que são a mistura de matérias-primas tradicionais em tanque e reprocessamento de subprodutos gerados na produção de biodiesel com 12,17%, em quarto outras matérias primas correspondem a 5,81% sendo respectivamente óleo de algodão 1,85%, óleo de fritura 1,37%, gordura de porco 1,96%, gordura de frango 0,31%, óleo de canola 0,21% e óleo de milho 0,01%. E o restante é composto pelo óleo de palma/dendê com 2,45%, tais informações são ilustradas na figura 1.

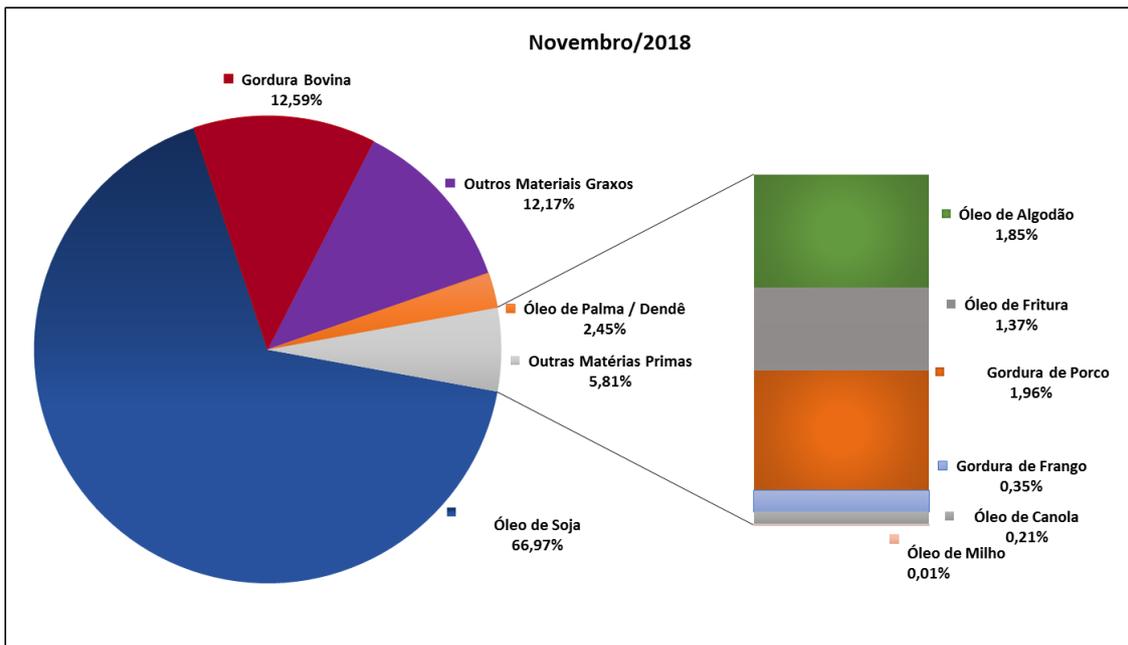


Figura 1 - Principais Matérias-Primas Empregadas na Produção de Biodiesel no Brasil.
 Fonte: ANP, 2018.

Conforme Sallet (2011), o óleo de soja surgiu como um subproduto do processamento do farelo de soja e, atualmente, tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos vegetais. Pela importância que o agronegócio da soja representa para o mercado brasileiro, é relativamente fácil identificar que essa oleaginosa detém o maior potencial para servir como paradigma no desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel. Segundo o Boletim anuário de 2018 da ANP, a soja continuou sendo a principal matéria-prima para a produção de biodiesel (B100), equivalente a 71,6% do total, com um aumento de 1,7% em relação a 2016. A segunda matéria-prima no ranking de produção das usinas foi à gordura animal (16,8% do total), após elevação de 15,6% em relação a 2016, seguida por outros materiais graxos (11,3% do total) e óleo de algodão 0,3% de participação.

3.3.2 Produção de Biodiesel

O biodiesel pode ser obtido pelo processo de esterificação de ácidos graxos com monoálcoois de cadeia curta, porém o principal método de produção

do biodiesel é a transesterificação. Nesse processo, um mol de triacilglicerol reage com três mols de álcool, comumente o metanol ou o etanol, na presença de um catalisador, que pode ser homogêneo, heterogêneo ou enzimático (Figura 2). O catalisador mais utilizado é o hidróxido de sódio (NaOH), amplamente conhecido como soda cáustica. Também pode ser utilizado o hidróxido de potássio (KOH) (KAUSHIK; KUMAR; KUMAR, 2007).

Geralmente, a transesterificação compõe o processo químico para modificação da estrutura molecular do óleo ou gordura, tornando-a praticamente idêntica ao óleo diesel e por consequência com características físico-químicas iguais (DANTAS, 2006; LIMA *et al.*, 2007). Um dos motivos pelos quais a reação de transesterificação é a mais usada no Brasil, é porque essa reação leva à redução da viscosidade, da densidade e do ponto de fulgor do combustível (SHRID; JAMAL, 2007; ALBURQUEQUE *et al.*, 2008).

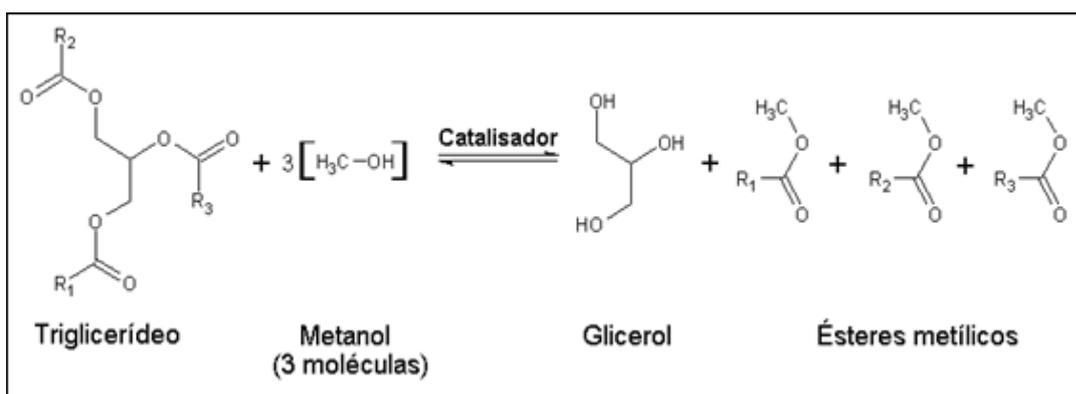


Figura 2 - Reação geral para transesterificação de triglicerídeos.
Fonte: GERPEN, 2005.

A reação de transesterificação deve ser conduzida sob agitação. A temperatura do processo pode ser ambiente ou até 70 °C, para que não haja desprendimento do álcool por evaporação. Quanto maior a temperatura, menor é o tempo de reação (BHANGU *et al.*, 2017).

Após a reação de transesterificação, ocorre a decantação da mistura para que aconteça a separação dos produtos obtidos. A fase superior corresponde ao produto principal, o biodiesel. E na fase inferior, encontra-se glicerina (subproduto da reação), resíduo de catalisador, excesso de álcool que não reagiu, água,

sabão formado durante a reação e alguns traços de ésteres e glicerídeos (PLÁ, 2002).

O biodiesel obtido deve ser purificado para remoção de resíduo de catalisador. Uma alternativa é a lavagem com água quente para a remoção de impurezas. Quando o catalisador utilizado é básico, a lavagem com água acidificada (0,5% ácido clorídrico) neutraliza o catalisador. A fase aquosa pode ser separada dos ésteres por decantação e posterior aquecimento para secagem e remoção da umidade (BHANGU *et al.*, 2017).

3.3.3 Propriedades do Biodiesel

As características físicas-químicas de qualidade para biodiesel variam de acordo com a matéria-prima utilizada para a obtenção do combustível. No entanto, conforme a Resolução ANP 07/2008, o biodiesel puro (B100) a ser misturado ao diesel de petróleo deve atender às especificações descritas DE acordo com cada norma apresentada na Tabela 1 (ANP, 2008). Bem quando, enquadrados nesses limites, o biodiesel poderá ser usado na maioria dos motores mantendo sua eficiência.

Tabela 1: Especificação do Biodiesel.

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISSO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	(2)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662 NBR 15995
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono, máx. (4)	% massa	0,050	15586	4530	-

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISSO
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	(7)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (8) 15771 -	6584 (8) -	EN 14105 (8) EN 14106 (8)
Glicerol total, máx. (9)	% massa	0,25	15344 15908	6584 (8) -	EN 14105 (8)
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,80	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	EN 14105 (8)
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	EN 14105 (8)
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 (8) 15344 15908	6584 (8)	EN 14105 (8)
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110 (8)
Índice de lodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (8)
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín. (10)	H	6	-	-	EN 14112 EN 15751 (8)

Fonte: ANP, 2008.

A aceitação do biodiesel no mercado precisa ser assegurada e, para isso, é indispensável que esse produto esteja dentro das especificações aceitas para uso. A viscosidade e a densidade são propriedades fundamentais de combustível (ALPTEKIN; CANAKC, 2008). Mas, também outras qualidades são determinantes para verificar a qualidade do biodiesel, incluem ponto de fulgor, teor de água e

sedimentos, teor de cinzas, teor de enxofre, número de cetano, ponto de névoa, número de acidez, estabilidade à oxidação, teor de glicerina livre e total, cor e aspecto (ANP, 2008).

3.4 Estabilidade Oxidativa do Biodiesel

A estabilidade oxidativa é definida como a resistência da amostra à oxidação e é expressa pelo período de indução, tempo entre o início da medição e o momento em que ocorre um aumento brusco na formação de produtos da oxidação (ANTONIASSI, 2001). O biodiesel é mais sensível à degradação por oxidação do que os combustíveis de origem fósseis em virtude de sua composição química (FOCKE; WESTHUIZEN; OOSTHUYSEN, 2012). Ao longo dessa oxidação, ocorrem quebras dos compostos indesejáveis, como os aldeídos, cetonas, ácidos, peróxidos, polímeros e ésteres de cadeia curta, que diminuem a qualidade do biocombustível, afetando assim, o funcionamento dos motores. Portanto, a estabilidade oxidativa deve ser entendida como parâmetro essencial no controle da qualidade do biodiesel (DANTAS *et al.*, 2011).

A reação química de transesterificação converte a matéria-prima (óleos vegetais e/ou gorduras animais) em glicerol e biodiesel. Esse biodiesel é composto por ésteres monoalquílicos de ácidos graxos que apresentam insaturações, ou seja, quanto maior os níveis de insaturações desses compostos mais vulneráveis serão a oxidação devido às ligações duplas que apresentam alta reatividade com o oxigênio (YAAKOB *et al.*, 2014; SUPRIYONO *et al.*, 2015). Porém, a estabilidade do biodiesel não depende apenas da composição química, mas também reflete as condições de manuseio, processamento e estocagem do produto (GARCIA *et al.*, 1993).

A oxidação lipídica é favorecida também pela temperatura, luz, metais e outros iniciadores da oxidação. O processo oxidativo pode ser dividido em três etapas: foto-oxidação, oxidação térmica e auto-oxidação, (JAIN; SHARMA, 2010).

De acordo com Ramalho e Jorge (2006) a foto-oxidação é um processo causado pela presença da luz e de oxigênio promovendo a oxidação de ácidos

graxos insaturados. Já a oxidação-térmica é a taxa de oxidação constatada pelo aumento da massa do óleo ou gordura devido à exposição a altas temperaturas.

Dentre os processos oxidativos, o de auto-oxidação é o mais comum que ocorre quando um lipídio, em geral um ácido graxo, é atacado por um oxigênio alterando a sua estrutura química. Essa reação em cadeia envolve três etapas: iniciação, propagação e terminação (RAMALHO; JORGE, 2006).

A etapa de iniciação ocorre à retirada de um hidrogênio de um lipídio insaturado (RH) pela presença de íons metálicos, luz, radiação, calor, etc., acarretando na formação de radicais livres. O intermediário formado é um radical lipídico (R•), que apresenta um par de elétrons não emparelhados. Este intermediário é uma estrutura instável e tende a reagir rapidamente, na etapa de propagação, para formar um radical peróxido (ROO•) que reage com um outro lipídio insaturado (RH) resultando na formação de um hidroperóxido (ROOH), acarretando numa reação em cadeia, já que acaba por formar novos radicais livres (R•). Na última etapa, a terminação, os radicais livres reagem entre si e formam compostos estáveis. O esquema abaixo mostra esse mecanismo de oxidação do Biodiesel (JADHAV *et al.*, 1996).

Iniciação	$RH \rightarrow R \cdot + H \cdot$
Propagação	$R \cdot + O_2 \rightarrow ROO \cdot$ $ROO \cdot + RH \rightarrow ROOH + R \cdot$
Término (Produtos Estáveis)	$ROO \cdot + R \cdot \rightarrow ROOR$ $ROO \cdot + ROO \cdot \rightarrow ROOR + O_2$ $R \cdot + R \cdot \rightarrow RR$

Figura 3 - Esquema do mecanismo da oxidação lipídica.

Fonte: adaptado de RAMALHO; JORGE, 2006.

3.4.1 Método Rancimat

O método instrumental Rancimat, é frequentemente, utilizado para avaliar a estabilidade ou susceptibilidade à oxidação do biodiesel, óleos e gorduras de

origem animal e vegetal (FOCKE; WESTHUIZEN; OOSTHUYSEN, 2012). Para esse método a especificação estabelecida pela Norma EN 14112 indica que o período de indução mínimo deve ser de 8 horas, a 110 °C (ARAÚJO *et al.*, 2011).

A determinação da estabilidade oxidativa baseia-se no aumento da condutividade elétrica utilizando o equipamento Rancimat. A análise consiste em passar um fluxo de ar constante pela amostra, numa temperatura de 110 °C, onde ocorre, de forma gradativa, a sua oxidação. O tempo de indução medido é diretamente proporcional à condutividade da amostra, que aumenta devido à formação de produtos provenientes do processo oxidativo absorvidos em um vaso que contém água ultrapura. O término da análise é constatado pelo aumento súbito da condutividade, período em que ocorreu a formação de produtos voláteis do processo oxidativo (JAIN; SHARMA 2011). A Figura 4 mostra o princípio da determinação do tempo de indução utilizando este método e os seus componentes.

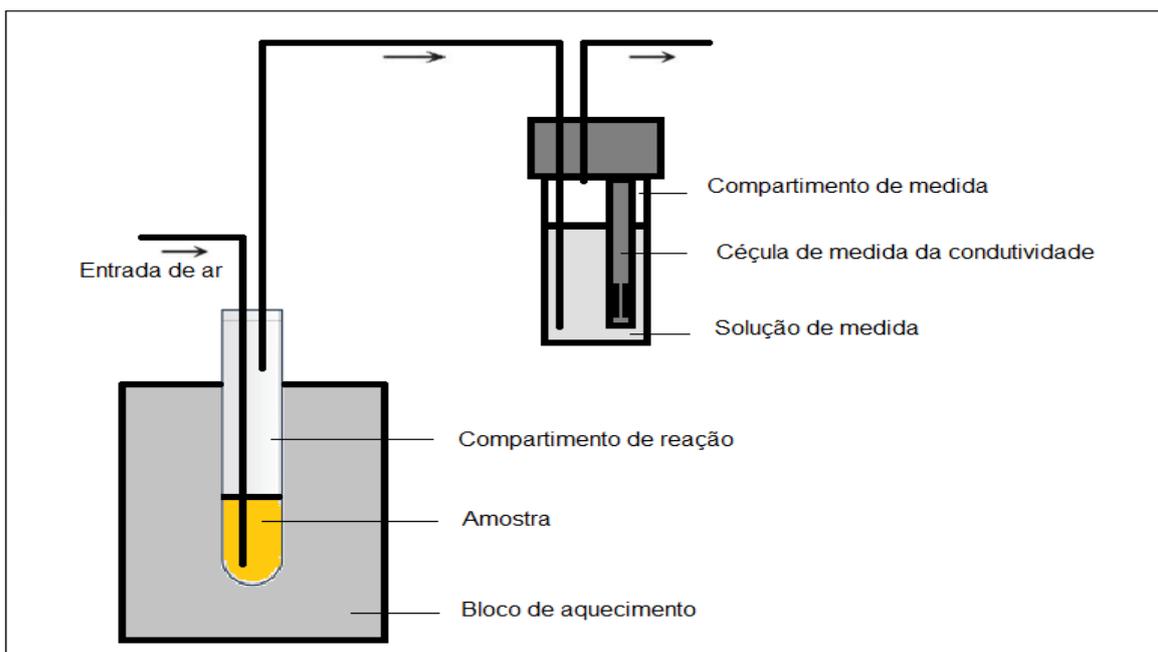


Figura 4 - Princípio de funcionamento de equipamento Rancimat e seus componentes.
Fonte: adaptado de JAIN; SHARMA, 2010.

Assim como a condutividade da solução é registrada continuamente, há a formação de curva de oxidação, dos quais os pontos de inflexão, conhecidos

como IP, pode ser calculado através do ponto de intersecção de duas tangentes (JAIN; SHARMA, 2010).

3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é a técnica de análise térmica, na qual se mede a diferença de energia absorvida em um processo físico ou químico em função da temperatura ou tempo (WENDLANDT, 1986). Deste modo, o equipamento de DSC mede a variação de energia entre a amostra e uma determinada referência em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO, 1986).

O DSC consiste de três principais componentes: o primeiro componente é o módulo que inclui a base e a célula, o segundo é o controlador (software de análise de dados) e o terceiro é o acessório de resfriamento.

A técnica de DSC fornece medidas sobre as mudanças que envolvem processos endotérmicos ou exotérmicos. Através dessa técnica acompanham-se os eventos térmicos que geram modificações em curvas de DSC podem ser basicamente transições de primeira e de segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variações de endotérmica ou exotérmica que dão origem à formação de picos. Os eventos endotérmicos e exotérmicos são representados por um desvio da linha base na curva térmica diferencial. De maneira geral, transição de fase, fusão, desidratação, redução e algumas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto cristalização, oxidação e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (DANTAS, 2006). As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia (IONASHIRO, 1986).

Um dos primeiros relatos sobre a oxidação de ésteres metílicos de ácidos graxos utilizando DSC convencional, foi feito por Raemy *et al.*, (1987), no qual, constatou o aumento da temperatura ou o grau de insaturação dos ésteres, reduziu o período de indução medido. Sendo assim, a técnica foi considerada

muito eficiente para controlar as reações de oxidação em biodiesel (TAVARES *et al.*, 2011).

O procedimento de avaliação pode ser efetuado de maneira isotérmica, no qual é possível constatar o tempo de indução para detectar uma reação exotérmica na amostra. Contudo, a prática não-isotérmica é capaz de verificar a temperatura em que ocorre o pico exotérmico e a temperatura de oxidação. A modificação dessa temperatura de oxidação pode ser empregada para validar a estabilidade oxidativa do biodiesel (JAIN; SHARMA, 2010).

3.5 Substâncias Antioxidantes

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias capazes de inibir ou retardar as reações de oxidação em combustíveis, alimentos, cosméticos, gorduras e óleos (SHAHIDI; NACZK, 2003), bloqueando a formação de radicais livres, promovendo inibição da lipoperoxidação e quelação de íons metálicos (HALLIWELL *et al.*, 1995). O termo antioxidante tem como definição impedir a oxidação de outras substâncias químicas, que ocorrem nas reações metabólicas ou por fatores exógenos, como as radiações ionizantes. São obtidos pelos alimentos, sendo encontrado na sua maioria em vegetais, o que explica parte das ações saudáveis que as frutas, legumes, hortaliças e cereais integrais exercem sobre o organismo (BAILEY, 1996).

No Biodiesel, os antioxidantes são utilizados para modificar 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 vigentes (ZHOU *et al.*, 2017), levando em consideração a eficiência em baixas concentrações (10 e 1000 ppm), estabilidade nas condições de processamento e armazenamento (BAILEY, 1996). 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).

Essas substâncias antioxidantes são divididas em dois tipos, os que possuem atividade enzimática e atuam inibindo a oxidação através da remoção

de espécies reativas de oxigênio. Ou aqueles que não possuem atividade enzimática reagem com o radical e são consumidos durante a reação (MAIA *et al.*, 2011). Sendo esses, compostos antioxidantes sintéticos e naturais.

3.5.1 Classificação e Mecanismo De Ação

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, secundários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. O mecanismo de ação deste tipo de antioxidante está representado pela Figura 5.

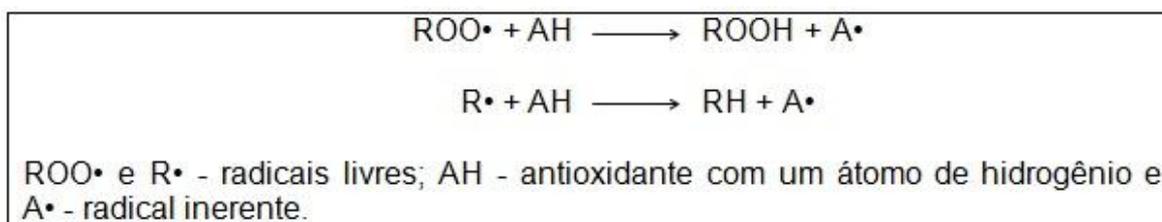


Figura 5 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários.

Fonte: DECKER, 1998.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é assimilado pelos radicais livres R• e ROO• mais facilmente do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas, promovendo a remoção ou a inativação dos radicais livres. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A•), encerrando a reação em cadeia (ADEGOKE *et al.*, 1998).

Os principais antioxidantes desse grupo são os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos e os tocoferóis que são naturais. Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes secundários têm como função desenvolver condições não radicais ou desativar o oxigênio, atua no sequestro de oxigênio e na decomposição de hidroperóxidos. As ubiquinona e A-tocoferolquinona, são exemplos de antioxidantes secundários (DECKER, 2002; DEL RÉ; JORGE, 2010; ZULETA *et al.*, 2012).

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Os antioxidantes removedores de oxigênio atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-os, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação (DECKER, 2002).

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 antioxidantes biológicos são enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases que agem removendo o oxigênio ou compostos altamente reativos dos sistemas alimentícios (ZULETA *et al.*, 2012)

Os agentes quelantes ou sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura causa a ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA). Finalmente, são considerados antioxidantes mistos as proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico). Eles compreendem os compostos de plantas e animais amplamente utilizados como antioxidantes em alimentos (BAILEY, 1996).

3.5.2 Antioxidantes Sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são compostos que exibem estrutura fenólica, voláteis, capazes de aumentar a vida útil de produtos que contem lipídios em sua

composição (ANDREO; JORGE, 2006). Grande parte dos antioxidantes utilizados nas indústrias são os sintéticos, os quais podem ser econômicos e eficazes. Todavia, o consumo desses compostos tem sido associado ao desenvolvimento, de alguns tipos de câncer. Devido suas propriedades carcinogênicas os níveis de segurança vêm sendo questionados e pesquisados, fazendo com que a indústria reduza seu uso, aumentando, assim a tendência de substituição, ainda que parcial, por antioxidantes naturais (BONILLA, 1999).

Dentre os antioxidantes mais usados estão o butilhidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o terc-butilhidroquinona (TBHQ) e o propil Galato (PG), cujas estruturas fenólicas destes compostos estão apresentadas na Figura 6, onde são identificados grupos aromáticos capazes de estabilizar um radical livre na sua estrutura (OLIVEIRA, 2004).

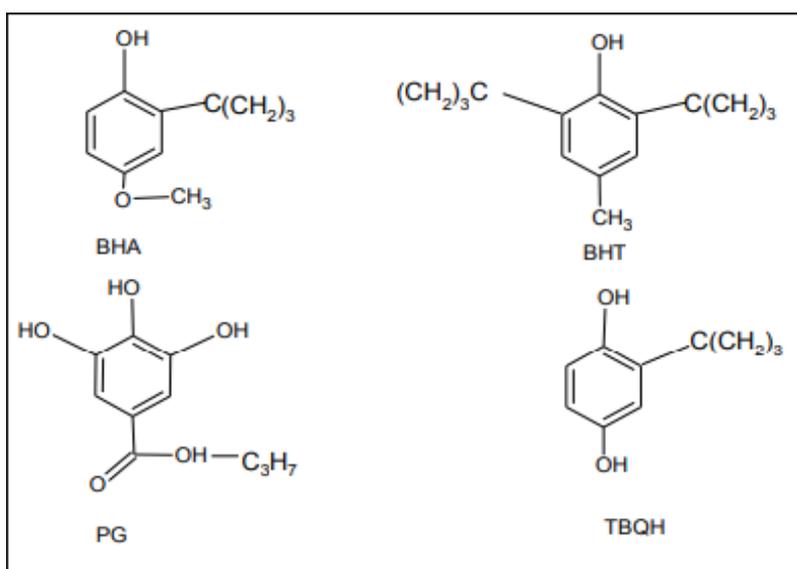


Figura 6 - Estrutura fenólica de antioxidantes sintéticos.

Fonte: DECKER, 1998.

De modo geral, a estrutura fenólica desse composto possibilita a doação de próton a um radical livre, reestruturando a molécula de acilglicerol e cessando o mecanismo de oxidação por radicais livres. Sendo assim, os derivados fenólicos se transformam em radicais livres. No entanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (BONILLA, 1999).

O BHA é um antioxidante que apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas e sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como aqueles contidos em óleo de coco e palma (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

O BHT é um composto orgânico lipossolúvel e antioxidante. Utilizado principalmente como conservante alimentar, mas também em cosméticos, remédios, combustível, borracha e taxidermia. É produzido a partir do cresol e do isobutileno. Reage com os radicais livres, interrompendo a oxidação e mantendo as características do produto (BONILLA, 1999).

O BHA possui propriedades similares ao BHT, porém, diferem na forma de agir, enquanto o BHA atua como sequestrante de radicais peróxidos, o BHT age como sinergista ou regenerador de radicais BHA. Ambos ainda podem conferir odor em alimentos quando aplicados em altas temperaturas em condição de fritura, por longo período (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

O PG é um éster de 3,4,5 ácido triidroxibenzóico, que possui uma excelente atividade como antioxidante e, quando usado em níveis elevados pode agir como pró-antioxidante (OLIVEIRA, 2004).

O TBHQ é um pó cristalino branco e brilhoso, brandamente solúvel em óleos e gorduras e não se complexa com íons de cobre e ferro. De modo geral, é considerado mais eficaz do que o BHA, BHT ou PG (FERRARI; SOUZA, 2009), pois apresenta propriedades resistentes ao calor, possibilitando uma extraordinária estabilidade oxidativa. Juntamente com BHA são os antioxidantes mais utilizados na conservação de óleos vegetais estocados e biodiesel (SHAHIDI; NACZK, 1995).

3.5.3 Antioxidantes Naturais

As evidências dos efeitos negativos ocasionados pelos antioxidantes sintéticos, em altas concentrações, fizeram com que impulsionassem os estudos de compostos naturais, na possível substituição, parcial ou integral, dos

compostos sintéticos (DURÁN; PADILLA, 1993). Dentre os antioxidantes naturais mais utilizados, destacam-se os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas (RAMALHO; JORGE, 2006).

O tocoferol é o principal antioxidante natural amplamente usado como inibidor oxidativo dos óleos e gorduras, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (JORGE; GONÇALVES, 1998). Existem quatro tipos de moléculas segundo a localização dos grupos metila no anel: alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ) como na figura 7. A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia.

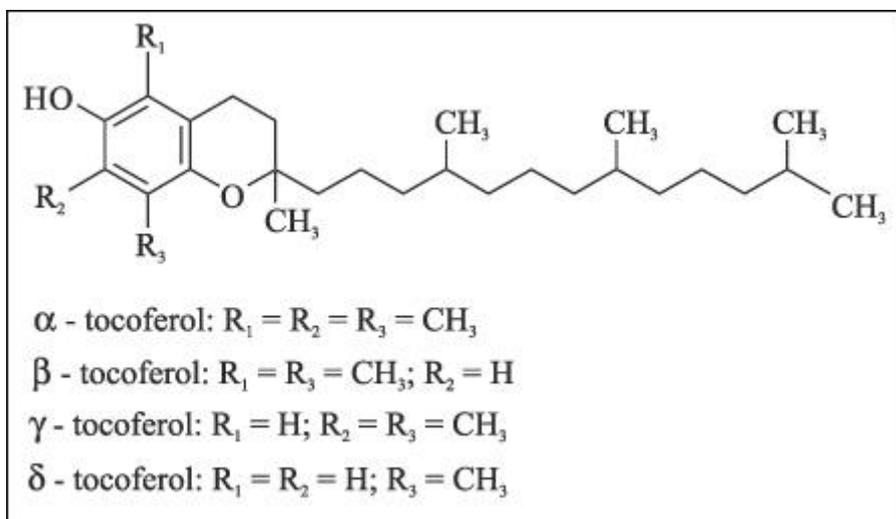


Figura 7 - Molécula dos tocoferóis.

Fonte: FILHO, 2010.

A atuação antioxidante relativa dos tocoferóis depende de vários fatores, incluindo temperatura, composição, forma da gordura (líquida, emulsão) e concentração de tocoferóis (DURÁN; PADILLA, 1993).

O γ e o α -tocoferol são os mais abundantes dentre os quatro tocoferóis. O α -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante dependendo do sistema testado, da concentração, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação. A concentração de tocoferol utilizada para otimizar a estabilidade oxidativa de óleo de soja é entre 400 e 600 mg/kg (FRANKEL, 1996).

Os ácidos fenólicos destacam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que cominam características antioxidantes. São arranjados em três grupos: o primeiro é combinado pelos ácidos benzóicos, que apresentam sete átomos de carbono (C6 – C1), representadas na figura 8a. O segundo grupo é composto derivados dos ácidos cinâmicos, que dispõem nove átomos de carbono (C6 – C3), sendo sete compostos mais frequentemente encontrados no reino vegetal (fig. 8b). Já cumarinas são decorridas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico como ilustrados na figura 8c.

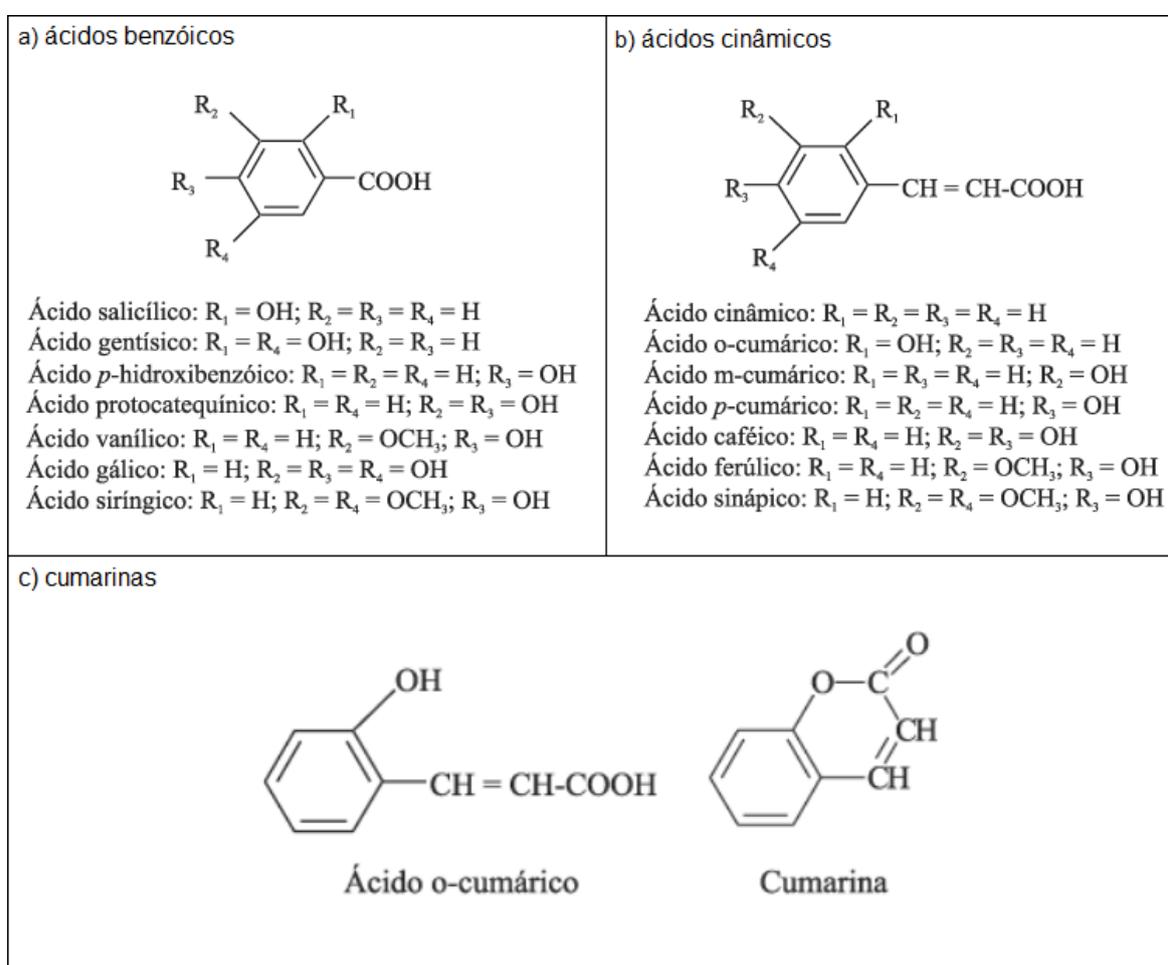


Figura 8 - Estrutura dos ácidos fenólicos.

Fonte: NAWAR, 1985.

O uso dos extratos naturais que apresentam esses componentes antioxidantes tem revelado o grande potencial que estimula na substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais.

3.6 História do Etanol

Em meados do século XIX o engenheiro alemão Nikolaus August Otto usou pela primeira vez o álcool como combustível para um de seus motores de combustão conhecido como ciclo Otto. O que impulsionou, na América do Norte, Henry Ford a projetar seu primeiro automóvel, um quadriciclo, movido unicamente a etanol em 1896 (GOETTEMOLLER; GOETTEMOLLER, 2007).

A história do etanol no Brasil teve início no século XX, ocorreram às primeiras ações de introdução do etanol na matriz energética brasileira. Especificamente na década de 1920, quando as primeiras experiências de desenvolvimento de álcool combustível foram realizadas. O etanol surgiu no Brasil, basicamente para amenizar as consecutivas crises do setor açucareiro e a tentativa de reduzir a dependência do petróleo. Em 1925, surgiu a primeira experiência brasileira com etanol combustível. Em 1933, o governo de Getúlio Vargas criou o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), pela Lei nº 737, tornou obrigatória a mistura de etanol na gasolina (BRASIL, 2003).

Em 1975, foi lançado o Programa Nacional do Alcool (Proálcool), um dos passos mais importantes para a evolução da produção de álcool combustível no Brasil, cujo objetivo era a redução da dependência nacional em relação ao petróleo. Período no qual o país importava, cerca de 80% do petróleo consumido, o que correspondia a cerca de 50% da balança comercial. Nessa época, ainda não havia a preocupação na emissão de gases poluentes. Embora cientistas já viessem alertando a população e os governos quanto às consequências (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000).

Apesar dos aumentos contínuos do preço internacional do petróleo, o etanol não era economicamente competitivo, necessitando de subsídios para sua entrada no mercado nacional. Em 1975, o governo brasileiro decidiu impulsionar a

produção de etanol derivado da cana-de-açúcar em substituição à gasolina pura, buscando minimizar as importações de petróleo. Nessa época, o açúcar tinha cotação baixa no mercado internacional e vinha decaindo de maneira brusca, fazendo com que o álcool fosse produzido em lugar do açúcar (BRASIL, 2003).

Esses incentivos duraram, basicamente, até o fim do regime militar, em 1984. A partir de 1985, iniciou-se um novo período, sem subsídios, quando o Governo tentou diminuir seu papel no setor. Em 1990, durante o governo Collor, extinguiu-se o IAA e os subsídios à produção de açúcar foram retirados (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000).

Atualmente, o Brasil é considerado um grande produtor de etanol, a produtividade média de geração do etanol por hectare de plantação de cana-de-açúcar é superior a 7.500 litros. Além de ter se tornando uma potência em exportação, também destina parte considerável de sua produção ao mercado interno (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994).

3.7 Etanol

A produção do etanol é uma das mais importantes atividades agroindustriais, atualmente, ocorre em larga escala, e o país é o segundo maior produtor mundial de álcool combustível, atrás apenas dos Estados Unidos. No entanto, diferentemente dos norte-americanos, que o etanol é produzido a partir do milho, o etanol brasileiro é produzido principalmente do beneficiamento da cana-de-açúcar. O milho considerado menos eficiente por exigir uma maior área de plantio. O etanol pode ser alcançado por processo químico e bioquímico. No processo químico, a via de obtenção é sintética, já no processo bioquímico, a via é fermentativa (BERTRAND, *et al.*, 2008).

O etanol pode ser usado como combustível de veículos em três maneiras: etanol comum, etanol aditivado e etanol misturado à gasolina. O etanol comum é o álcool hidratado, combinação de álcool e água que precisa ter de 95,1% a 96% de graduação alcoólica. O etanol aditivado é o álcool hidratado com aditivos que proporcionam melhor rendimento e um desgaste menor do motor. Já o etanol

misturado à gasolina é álcool anidro, álcool com graduação alcoólica de no mínimo 99,6%, praticamente álcool puro. Atualmente, a proporção de álcool anidro misturada à gasolina brasileira está estipulada em 20%. Os três tipos de etanol são derivados da mesma substância (C_2H_6O), alterando apenas a graduação alcoólica (ANP, 2016).

Em algumas situações, acontece ainda à adulteração do álcool comum com conteúdos que tornam o produto mais barato, chamado de etanol adulterado. Comercializar etanol adulterado é ilegal e o uso dele no veículo pode causar múltiplos danos ao motor e ao meio ambiente (ANP, 2003).

3.7.1 Matérias-Primas para Produção de Etanol

Hoje o etanol pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, no Brasil, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais viável técnico-economicamente para a produção de etanol e, por isso, é a mais utilizada. Mas alguns países utilizam também a beterraba, milho, madeira, mandioca, aveia, arroz, cevada, trigo e o sorgo (GUO *et al.*, 2015).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol proveniente da cana-de-açúcar. Devido às grandes áreas necessárias para a produção da cana, pesquisadores estão buscando novas fontes energéticas para a produção de etanol (RFA, 2014).

O etanol proveniente da cana-de-açúcar constitui o principal componente da matriz brasileira de biocombustíveis, mas existem estudos conduzidos pela Embrapa e outras instituições de pesquisa no país e no exterior, sobre fontes alternativas para obtenção do etanol, como o etanol amido e a celulose proveniente de resíduos agrícolas e do bagaço e palha da cana-de-açúcar, que aumentarão a sustentabilidade e consolidarão o programa de energia renovável brasileiro (DURÃES, 2011).

Diversos tipos de matérias-primas podem ser utilizados para a produção de etanol. Basicamente todas as fontes de açúcares, direta ou indiretamente, fermentescíveis podem ser utilizadas para produzir etanol. A característica mais

importante na matéria-prima é que esta permita ser transformada em álcool, da forma mais simples, econômica e eficiente possível (GUO *et al.*, 2015).

A extração da cana-de-açúcar consiste no processo físico de separação de fibra (bagaço), podendo ser feito por moagem, processo onde a separação é feita por pressão mecânica dos rolos da moenda sobre o colchão de cana desfibrada, e por difusão, onde a separação é feita pela lavagem da sacarose absorvida ao colchão de cana. Do milho, o etanol é obtido após a hidrólise do amido liberando as moléculas de açúcares que são transformados em álcool pelo processo de fermentação. Da beterraba, é extraído o açúcar, que é fermentado para produzir o álcool. A partir da beterraba o processo é mais simples porque o açúcar já está livre para ser fermentado. Já da madeira, a celulose é hidrolisada para liberar os açúcares que são submetidos ao processo de fermentação para a produção. Na madeira temos as ligninas que são resinas difíceis de serem tratadas (MATSUOKA *et al.*, 2012).

Outra opção que está ainda na fase de testes e estudos, é o etanol celulósico, extraído da celulose proveniente das paredes celulares da planta, tais como o bagaço, o caule e as folhas, usadas aí como matérias-primas. Esse etanol é produzido através de um processo químico que quebra a celulose, e adiciona após sua redução a componentes básicos, levedura, sendo após tal adição o produto fermentado com álcool. Depois de refinado, o etanol produzido pode ser usado como combustível, e apresenta certas vantagens em relação aos etanóis produzidos através de outras matérias-primas (DURÃES, 2011).

Pesquisadores descobriram que cada unidade de energia usada na produção de etanol celulósico produzia 10 vezes mais energia, o que o torna mais rentável que o etanol produzido da cana-de-açúcar; descobriram também que o etanol celulósico pode precisar de 70% menos combustível fóssil para ser produzido, o que reduzirá em altas proporções a emissão de gases poluentes ao meio ambiente (GUO *et al.*, 2015).

3.7.2 Produção de Etanol

O álcool combustível é chamado também de etanol etílico ($\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 - \text{OH}$). Trata-se do composto mais conhecido do grupo orgânico dos álcoois. É caracterizado pela presença de uma hidroxila (OH) diretamente ligada a um carbono. É formado por um líquido transparente de cheiro forte, cuja característica principal é a capacidade de entrar em combustão. A queima do álcool dá origem aos produtos água, gás carbônico e muita energia.

A produção de etanol por base de açúcares, como é o caso da cana-de-açúcar, é mais simples do que quando comparada com a produção por meio de materiais amiláceos, como o trigo e o milho, e celulósica, como o bagaço da cana. Nos casos de matérias amiláceas ou celulósicas, há a necessidade da transformação da matéria-prima em açúcares simples por ações enzimáticas, enquanto na cana os açúcares já estão disponíveis na biomassa (BNDES; CGEE, 2008). O álcool pode ser produzido por três vias: destilatória (a partir de fermentações de resíduos semissólidos das vinícolas), por via sintética (a partir dos hidrocarbonetos instaurados) e a via fermentativa (MOREIRA *et al.*, 2009).

No Brasil, a fabricação comercial do etanol é exclusivamente feita por via fermentativa, chamada também de primeira geração, baseia-se no aproveitamento do melaço das usinas, na utilização direta da cana de açúcar ou ainda na produção pela inversão do açúcar. Nessa via, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação do substrato e conseqüente produção de álcool. A técnica consiste em, basicamente, adicionar ao caldo da cana-de-açúcar microrganismos que quebram moléculas de açúcar ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), transformando elas em duas moléculas de etanol ($2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) mais duas moléculas de gás carbônico (2CO_2) (MOREIRA *et al.*, 2009). Esse mecanismo de fabricação, conforme Stupielo (1987) se divide nas operações de extração do caldo, preparo do mosto, preparo do fermento, fermentação, destilação, retificação e desidratação.

O processo produtivo do etanol inicia-se logo com a chegada da matéria prima à indústria, onde amostras de cana são colhidas e levadas para análise. A

cana é então é limpa, picada, desfibrada e encaminhada por uma esteira a um conjunto de moendas (ternos de moendas) para a moagem ou para um difusor. Durante esse processo, ocorre à extração do caldo, por pressão mecânica dos rolos, no caso dos termos de moendas, ou por lixiviação, quando a fábrica utiliza a difusão (PAYNE, 1989).

O bagaço proveniente deste processo ainda contém uma quantidade de caldo que é constituído por água e sólidos voláteis. Assim, muitas vezes é empregado o processo de embebição, que consiste em adicionar água ou mesmo o caldo diluído ao bagaço entre uma moenda e outra, com a finalidade de diluir a sacarose que ainda exista neste bagaço (SANTOS, 2010). O caldo extraído é encaminhado a um processo prévio de tratamento em que ocorre a decantação, este recebe a adição de produtos químicos e é retirado parte da sua água (pré-*evaporação*) para iniciar o processo de fermentação. O bagaço, resultado do processo de extração, é direcionado para a cogeração de energia da fábrica (BNDES; CGEE, 2008).

Por seguinte, o caldo é aquecido para aumento da sua concentração, adiciona-se levedura e a mistura entra em um processo de fermentação alcoólica em que ocorre a transformação dos açúcares em etanol. Depois de fermentado, recupera-se a levedura da mistura e o mosto resultante é encaminhado aos aparelhos de destilação para separar o etanol do restante da mistura. A destilação pode dar origem a vários subprodutos, como a vinhaça, responsável por graves problemas ambientais e o óleo fúsel. Há pelo menos três etapas são fundamentais para a produção de etanol pela rota de primeira geração: moagem (pré-tratamento físico ou mecânico), fermentação e destilação, essas são utilizadas de maneira muito parecida para ambas às rotas de primeira e de segunda geração (ALCARDE, 2007).

O biocombustível resultante da destilação encontra-se na forma hidratada, uma mistura binária álcool-água. Segundo BNDES e CGEE (2008), este etanol alcança um teor de 96° GL, que corresponde a 6% de água em peso devido à formação de uma mistura azeotrópica. O bioetanol hidratado pode ser utilizado como produto final, comercializado nos postos de combustíveis para o

abastecimento de veículos ou ainda pode seguir para o processo de desidratação para a produção de etanol na forma anidra (UNICA, 2007).

O etanol anidro possui pelo menos 99,6 °GL, e é amplamente utilizado na indústria química como matéria prima para a fabricação dos ésteres e dos éteres, de solventes, tintas e vernizes, de cosméticos, de pulverizadores. Além disso, também é utilizado como aditivo em combustíveis, segundo a Portaria nº 143 do Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento (MAPA, 2007).

3.7.3 Fermentação Alcoólica

A fermentação é um método de catabolismo anaeróbico no qual ocorre a degradação de moléculas de açúcar no interior das células do microrganismo (levedura), até a formação de etanol e CO₂, propiciando, liberação de energia química e térmica (VENTURINI FILHO; MENDES, 2008).

Tosetto (2002) destaca três principais maneiras para a condução da fermentação: a batelada, no qual o mosto e o inóculo (leveduras) são adicionados ao reator no início de cada batelada. A cada rodada o reator é limpo e preparado para outro ciclo, deixando o processo mais lento. O segundo maneira é a batelada alimentada ou *Melle-Boinot*, processo em que o substrato é adicionado, parceladamente ou de forma contínua ao reator, alimentando o inóculo, até atingir um valor limite. Nesse caso, há o reaproveitamento do inóculo que é separado do vinho por centrifugação. Por fim, o modo contínuo, no qual o produto é retirado, à mesma vazão de alimentação do reator, não sofrendo interrupções. O fluxo é contínuo, diminuindo assim, o efeito inibitório do etanol e do substrato.

A fermentação alcoólica começa, após a adição do fermento no mosto. Esse processo é caracterizado por três etapas: fase de adaptação dos microrganismos, onde começam a crescer, nesta fase, o mosto ainda contém uma determinada quantidade de oxigênio, para que ocorra o desenvolvimento das leveduras. Na segunda fase ocorre um crescimento exponencial dos microrganismos, liberação de gás carbônico, aumento da temperatura e do teor alcoólico. Na última fase, o alimento entra em escassez, o crescimento das

leveduras diminui, há diminuição de gás carbônico e precipitação do fermento. No final da fermentação o produto obtido é o vinho bruto, que irá apresentar 8 a 12% de álcool (SILVA *et al.*, 2008).

As leveduras são os microrganismos mais importantes na aquisição do álcool por via fermentativa. As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas e combustível geralmente são linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (VENTURINI FILHO; MENDES, 2008).

A célula de levedura possui no citoplasma celular um aparato enzimático, denominadas enzimas glicolíticas, que permite a transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO₂, envolvendo 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, como mostrado na figura 9 (LIMA, 2001).

componentes secundários, caracterizando as perdas de açúcares no processo (MUTTON, 2008).

3.8 Contaminação Bacteriana

A indústria sucroalcooleira representa um considerável gerador econômico. Como a maior parte da produção de álcool ocorre por via fermentativa, é essencial o conhecimento do processo fermentativo (ALTERTHUM *et al.*, 1984).

A presença de microrganismos ocorre desde a colheita da cana-de-açúcar até o processo de fermentação (GALLO, 1989). A infecção bacteriana na fermentação pode causar danos ao processo como: consumo de açúcar; formação de goma; floculação do fermento; formação de espumas; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (ALTERTHUM *et al.*, 1984).

Pesquisas realizadas na área de fermentação mostram que as bactérias do grupo Gram-positivo são os microrganismos contaminantes que predominam na fermentação alcoólica, tendo destaque os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*. Mas também são evidenciados outros gêneros de bactérias prejudiciais à produção alcoólica, tais como: *Acetobacter*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* e *Escherichia* (FERMENTEC, 2008). Todos esses microrganismos produzem quantidades apreciáveis de ácidos orgânicos (butírico, acético, fórmico, láctico) (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

Diversos autores verificaram a influência dos ácidos acético e láctico na inibição do crescimento e na queda da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Estudos revelam que a contaminação bacteriana leva a uma queda no rendimento fermentativo na faixa de 14 a 90%, quando a concentração de bactérias na fermentação atinge níveis de 10^8 a 10^9 células/mL, verificando ainda

quedas de 10 a 40% no rendimento, associados a níveis de 10^7 a 10^8 células/mL (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007; ALTERTHUM *et al.*, 1984).

Um dos fatores mais crítico da contaminação bacteriana para as fermentações, especialmente nas quais se extrai levedura para secagem, é a floculação. Esse fato ocorre quando há interação entre os microrganismos contaminantes e a levedura, potencializado por altas concentrações de cálcio no mosto. Tais condições levam as bactérias a se aderirem nas paredes das leveduras, por meio de ligações entre moléculas constituintes da superfície desses microrganismos, fazendo com que toda biomassa se precipite (FURTADO; ALCARDE, 2010). Outro dano que tem destaque pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras (OLIVA-NETO; 1995; FREDERICK, 1994).

Estudos realizados no Reino Unido, na Índia e na África do Sul indicam que 13% das perdas causadas pela contaminação bacteriana são devido à inversão, 25% à atividade de enzimas livres e 62% ao crescimento bacteriano.

Yokoya e Oliva-Neto (1989) ressaltam que é possível reduzir entre 17 e 35% das perdas de sacarose devido à presença de microrganismos contaminantes apenas com o uso de práticas adequadas de limpeza e uso correto de agentes antimicrobianos sintéticos ou naturais.

3.9 Microrganismos

Os microrganismos são uma forma de vida que não pode ser vista sem auxílio de um microscópio. Estes seres diminutos podem ser encontrados no ar, no solo, e inclusive, no homem. Com relação ao contato com o homem, pode ocorrer de forma positiva e indispensável à vida, ou bastante negativa, com efeitos prejudiciais à saúde (MÜLLER; MARTINI; MEDINA, 2010).

As bactérias têm uma estrutura reativamente simples uma vez que são organismos unicelulares. Visto que o material genético não é envolto por uma membrana nuclear, são classificadas como procariontes. A maioria das bactérias

varia de 0,2 a 2,0 μm de diâmetro e de 2 a 8 μm de comprimento. Elas possuem algumas formas básicas, tais como, cocos esféricos, bacilos e espirais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Em geral, a célula bacteriana é composta por capsula, parede celular, membrana celular, citoplasma, nucleoides, plasmídeos e flagelo (TRABULSI *et al.*, 2008).

Para melhor visualização da forma e do tipo de arranjo dos microrganismos, é frequente o uso de técnicas coloração. Um dos métodos utilizados é a coloração de Gram, desenvolvido pelo pesquisador dinamarquês Christian Gram, em 1884, que consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica. Essa técnica permitiu dividir as bactérias em dois grandes grupos, Gram positivas e Gram negativas além de determinar a morfologia e do tamanho das amostras analisadas (TRABULSI *et al.*, 2008).

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem (MÜLLER; MARTINI; MEDINA, 2010).

Uma das principais diferenças entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é a espessura da parede celular, que nas bactérias Gram-positivo que apresentam muitas camadas de peptidoglicano, formando uma estrutura mais espessa e rígida do que nas Gram-negativas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Apesar de apresentar tamanho inexpressível, os microrganismos, quando não controlados, podem causar impactos enormes e perdas irreparáveis na industrial, como no caso das sucroalcooleiras (INGRAHAM, J.; INGRAHAM, C., 2010).

3.10 Substâncias Antimicrobianas

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos (quimioterápicos) capazes de inibir o crescimento ou causar a morte do microrganismo (SÁEZ-

LLORENS, 2000). O principal objetivo do uso de um antimicrobiano é diminuir ou eliminar os organismos patogênicos, que causam prejuízos na indústria e também à saúde (WALSH, 2003).

Nos últimos anos, observou-se grande interesse pelo potencial antibacteriano dos extratos naturais, já que a resistência de microrganismos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado. A expressão resistência é a capacidade que esses microrganismos têm de resistir aos efeitos dos antimicrobianos ou antibióticos, causando diversos malefícios para saúde, além das perdas na qualidade de diversos produtos, como no etanol (SÁEZ-LLORENS, 2000).

Os microrganismos resistentes são cada vez mais difíceis de eliminar, exigindo doses mais elevadas dos compostos sintéticos ou alternativos, como os antibacterianos naturais. Essa situação tem forçado os pesquisadores a buscar novas alternativas para combaterem esses microrganismos. Os vegetais são excelentes fontes na busca dessas novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS *et al.*, 2007).

3.10.1 Classificação e Mecanismo de Ação

Os antimicrobianos podem ser classificados de várias maneiras, principalmente considerando sua ação biológica, espectro e o mecanismo de ação (TRABULSI *et al.*, 2008).

A ação biológica desses antimicrobianos é categorizada como agentes bactericidas, quando causam a morte da bactéria e bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano, no entanto, dependendo da concentração e da associação com outro composto, um bacteriostático pode ter ação bactericida (WALSH, 2003).

Já o espectro de ação relaciona-se à diversidade de organismos afetados pelo agente. Geralmente os antimicrobianos são de pequeno ou de amplo espectro. Ultimamente, uma série de laboratórios vem trabalhando em busca de

isolar e purificar antimicrobianos de espectro restrito, que atuam especificamente sobre um ou um pequeno número de microrganismos. No entanto, os antimicrobianos comercializados como antibióticos enquadram-se nas categorias de pequeno e amplo espectro de ação (TRABULSI *et al.*, 2008).

Por fim, o conhecimento dos mecanismos de ação destes agentes antimicrobianos permite entender sua natureza e o grau de toxicidade seletiva de cada composto. Reese, Betts e Gumustop (2002), organizam esse mecanismo em cinco divisões:

1) Inibição da síntese da Parede Celular: estes agentes antimicrobianos correspondem aos mais seletivos, provocando uma perda na rigidez ou degradação da parede celular.

2) Interferência nas funções da Membrana Citoplasmática: são agentes antimicrobianos que muitas vezes exibem menor grau de toxicidade seletiva e tem como função alterar a permeabilidade na membrana.

3) Inibição da síntese de ácidos: seletividade variável. Esses compostos atuam impedindo a replicação, transcrição e reparo do DNA.

4) Inibição da síntese das proteínas: geralmente promovendo erros na leitura do mRNA.

5) Antagonismo metabólico: comumente ocorre por um mecanismo de inibição competitiva.

3.10.2 Resistência Microbiana

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância para se entender como a bactéria pode vim a desenvolvê-la. A resistência bacteriana, muitas vezes, é compreendida como sendo um fenômeno ecológico, que ocorre como resposta da bactéria frente ao um estímulo ambiental. Esses seres possuem elevada capacidade de adaptação a condições adversas como os agentes químicos. Essa aptidão é contraída por meio de mutações e troca de material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes (VARGAS *et al.*, 2004).

As bactérias são capazes de transmitir os genes de resistência às suas descendências pela replicação ou por conjugação a outras bactérias. Esse é um processo natural, acentuado pelo abuso de antimicrobianos. De acordo com o Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo (2008), há pelo menos quatro mecanismos de resistência bacteriana, um deles é alteração de permeabilidade, que consiste na incapacidade do antimicrobiano de penetrar nas células bacterianas.

Outro mecanismo e um dos mais importantes é a alteração do sítio de ação antimicrobiano em que as bactérias podem manifestar um gene que codifica um novo produto resistente ao composto, trocando o alvo original e impedindo qualquer efeito bacteriostático ou bactericida. Já o bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, ejeta a agente para fora antes que possa se tornar eficaz, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. Finalmente, o mecanismo enzimático, nada mais é do que a degradação do antimicrobiano por enzimas (BRASIL, 2011).

3.11 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Determina-se agente antimicrobiano como sendo um composto natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de microrganismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003). A atividade antimicrobiana de uma substância pode ser medida determinando-se a menor quantidade que ela necessita para inibir o crescimento de um microrganismo-teste, sendo esta quantidade denominada concentração inibitória mínima (CIM) (TRABULSI *et al.*, 2008).

Usualmente, para a determinação da CIM, uma série de tubos de cultura são preparados pela adição de uma concentração diferente do agente em cada tubo, os quais são, em seguida, inoculados. Após a incubação, os tubos são examinados, verificando-se a ocorrência de um crescimento visível (turbidez). O tubo comportando a menor concentração do composto capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo-teste define a CIM. Esse

procedimento é comumente chamado de técnica da diluição em tubos (ANDREWS, 2001).

A CIM não é constante para um determinado agente antimicrobiano, uma vez que pode ser comprometida pela natureza do microrganismo testado, tamanho do inóculo, composição do meio de cultura, tempo e condições de incubação, como temperatura, pH e aeração (MADIGAN, MARTINKO, PARKER; 2003).

No momento em que todas as condições são padronizadas, é possível confrontar diferentes agentes antimicrobianos, determinando qual o mais eficiente contra determinado microrganismo, ou realizar a avaliação da atividade de um único agente contra uma variedade de microrganismos (ANDREWS, 2001).

3.12 Extração de Compostos Naturais

A extração é uma intervenção físico-química de transferência de massa, onde os sólidos solúveis e voláteis podem ser extraídos por manter-se em contato entre o solvente e os sólidos (CLARKE, 1985). O principal objetivo de se extrair compostos é que esses sejam capazes de melhorar a durabilidade de algum produto industrial (WONGKITTIPONG *et al.*, 2004).

Existem diferentes metodologias para extração dos compostos naturais, podendo ser classificados em métodos convencionais de extração usando solventes orgânicos como etanol, metanol, hexano, acetona, éter e água, e o método de extração supercrítica em altas pressões e temperaturas. A extração das plantas é comum na indústria de perfume, no setor farmacêutico, no campo do alimento e da produção de combustíveis. É desta maneira que alguns extratos vegetais, como óleos comestíveis ou industriais, oleoresina e pigmentos são obtidos (POIROT *et al.*, 2006).

O rendimento e a solubilidade dos extratos naturais são influenciados diretamente pelas condições em que ocorre processo de extração, como escolha do solvente, temperatura, tempo de extração e a ação mecânica (WONGKITTIPONG *et al.*, 2004). Ademais, a matriz vegetal apresenta estrutura

heterogênea e complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, o tamanho, localização e a ligação com outros componentes (PINELO *et al.*, 2004).

As características químicas do solvente e a estrutura e composição diversas do produto natural asseguram que cada sistema material-solvente mostra comportamento pelicular, o qual não pode ser previsto. Esse fato corrobora para a necessidade de seleção criteriosa do método de extração e qual o melhor solvente para determinada fonte natural facilmente (PINELO *et al.*, 2004).

3.12.1 Extração Convencional

A extração utilizando solventes orgânicos é o procedimento convencional de extração de compostos de plantas mais utilizados (PALLEROS, 1999). O método a ser utilizado na extração convencional é determinado pela família de compostos a ser extraída (TSAO; DENG, 2004). Os extratos obtidos são sempre uma mistura heterógena, ou seja, nesse composto pode conter diferentes classes fitoquímicas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

A solubilidade dos extratos está intimamente ligada com a polaridade do solvente escolhido (CAETANO, 2009). Analisando a diversidade de componentes químicos existentes nos vegetais, para que a extração seja eficiente é importante o uso de solventes com diferentes polaridades (CAETANO, 2009).

Delva e Schneider (2012) avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato metanólico da fruta da Acerola e obtiveram valores significantes, com o método de extração convencional realizada em equipamento Golfish.

3.12.2 Extrator de Óleos e Gorduras – Goldfish

O método de extração convencional em amostras vegetais em um sistema de refluxo contínuo, comumente, é realizado em equipamento Goldfish. Esse equipamento permite que a amostra, fique em contato com o solvente em um sistema de refluxo contínuo, sendo capaz de realizar a extração de várias amostras ao mesmo tempo, já que possui compartimentos acoplados (PALLEROS, 1999).

A metodologia de Goldfish é semelhante ao Soxhlet, com a diferença de que no Goldfish, o solvente quente é passado constantemente pela amostra, diminuindo o tempo de extração em relação a outros métodos de extração convencional como Soxhlet. Outra vantagem desse método é a possibilidade de recuperar até 80% do solvente utilizado, além de utilizar uma quantidade menor de solvente em relação q outros métodos de extração (PEARSON, 1977).

3.13 Caracterização Botânica das Amostras

O Abacateiro (*Persea americana*) pertence à família Lauraceae. É uma planta perene cultivada em quase todas as regiões tropicais e subtropicais, esta amplamente distribuída no Brasil. O abacateiro é uma árvore frutífera de grande porte, ultrapassando 20 metros de altura de acordo com a figura 10a. Das folhas, que exalam odor marcante de aniz quando maceradas, pode-se extrair óleo essencial com alto teor de metil chavicol, utilizado na aromatização de alimentos. Suas flores são pequenas, hermafroditas, organizadas em inflorescências terminais do tipo panícula. Com fruto tipo drupa piriforme ou ovóide (MEDINA *et al.*, 1978).

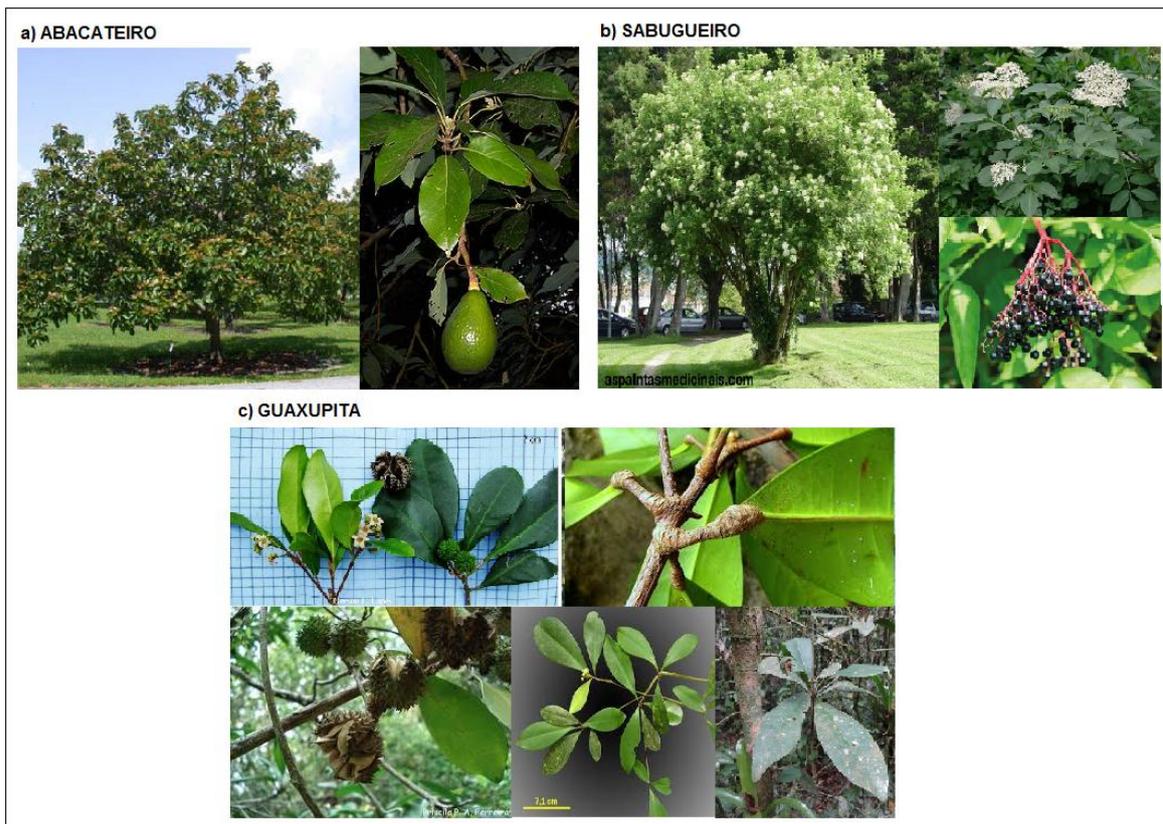


Figura 10 - Guaxupita.

Fonte: adaptado de GLOOGLE IMAGENS, 2019.

O fruto do abacate possui substâncias de interesse nutricional e comercial. Dentre elas, destacam-se ácidos graxos, principalmente ácido oléico e o linoléico (TANGO *et al.*, 2004; BORA *et al.*, 2001; MASSAFERA *et al.*, 2010), substâncias antioxidantes capazes de combater os radicais livres e antimicrobianos capazes de combater os microrganismos patogênicos (HIRASAWA *et al.*, 2008), no entanto não há relatos sobre o potencial das folhas.

Sabugueiro (*Sambucus nigra*) pertencente à família Adoxaceae, é uma planta encontrada principalmente na região Sul do Brasil. É uma planta arbustiva, de 2 a 4 metros. Flores pequenas, muito brancas. Exalam perfume agradável. Os frutos são pequenas bagas de cor negras e redondas, como ilustrado na figura 10 b. A folha do sabugueiro apresentam propriedades fitoterapêuticas de acordo com a crença popular, porém não existem relatos para essa espécie sobre seu potencial antioxidante e antimicrobiano (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Dentre os representantes da família Rutaceae, destaca-se *Esenbeckia grandiflora* popularmente conhecida como guaxupita pertencente à subfamília Rutoideae, é uma planta arbórea com ampla distribuição no Brasil na região Sul ocorre principalmente em floresta latifoliada semidecídua (JANUARIO *et al.*, 2009; PIRANI, 2010). A Figura 10c mostra a guaxupita e seu fruto.

É uma espécie arbórea com altura variando de 4-7 m, com tronco tortuoso de 20-30 cm de diâmetro, folhas simples, pecioladas, alternas e verdes. A madeira é indicada para o fabrico de cabos de ferramentas (LORENZI, 1992).

Segundo Januario *et al.* (2009), a literatura não registra qualquer atividade antioxidante e antimicrobiana para esta espécie. No entanto, ensaios biológicos preliminares realizados por Barros *et al.*, (2010) com extratos das folhas com acetato de etila em clorofórmios totais revelaram atividade antibacteriana por conter grande quantidade de fenóis, esse fato pode também corroborar para atuação como um bom antioxidante.

3.13 Plantas Antioxidantes e Antimicrobianas

Desde o primórdio, o homem busca na natureza recursos alternativos para melhorar sua qualidade de vida (LORENZI, 2002). No Brasil, a utilização das plantas teve início com a cultura da população indígena das diversas tribos que aqui habitaram (SIMÕES *et al.*, 1998).

De acordo com Maciel *et al.* (2002) o conhecimento sobre plantas com ação antimicrobianas simbolizaram o primeiro recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que de 60 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas como forma de diminuir ou eliminar estirpes de microrganismos patogênicos. Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos de esterilização microbiológica, desinfecção e prevenção utilizando extratos de plantas como romãzeira (VEIGA, 2005).

Existem várias plantas com compostos que apresentam atividade antioxidante e podem ser utilizados como aditivo para retardar reações de

oxidação em biodiesel, como, Sabugueiro (*Sambucus nigra*) e Abacateiro (*Persea americana*), são excelentes fontes de antioxidantes. Esses compostos de ocorrência natural não poluem o ambiente e são facilmente obtidos.

Barros *et al.*, (2010) estudaram diferentes extratos metanólicos preparados a partir das folhas, flores, pequenos galhos folhas e flores e frutos imaturos do Malva Santa (*Malva sylvestris*). Os resultados obtidos mostraram que o extrato metanólico das folhas de Malva possui atividade antioxidante mais significativa.

A literatura mostra uma grande variedade de espécies de plantas que são pesquisadas quanto a sua capacidade antioxidante e antimicrobiana. Dentre elas podemos citar a Malva (*Malva sylvestris*); Carqueja (*Baccharis trimera*); Louro (*Laurus Nobilis*); Camomila (*Matricaria chamomilla*); Orégano (*Origanum vulgare*); Própolis (*Apis mellífera*), Romã (*Punica granatum*), Copaíba (*Copaiba reticulata*) entre várias outras plantas que compartilham dessas condições. Várias pesquisas foram realizadas nesse grupo de plantas verificando a capacidade antioxidante em biodiesel e antimicrobiana em processos fermentativos na produção de etanol (ELDIN; DUNFORD, 2001; BARROS *et al.*, 2010; WITT; BAUMGARTNER; SILVA, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

Para a obtenção dos extratos as amostras das folhas do abacateiro (*Persea americana*), folhas do sabugueiro (*Sambucus nigra*) e folhas da guaxupita (*Esenbeckia grandiflora*) foram coletadas em abril de 2018 no município de Formosa do Oeste, Paraná – Zona Rural – Mata Ciliar, Estrada Piauí lote 70, 24°16'44.4"S 53°19'41.6"W -24.278988, -53.328225. Suas identidades botânica foram confirmadas através de comparação com as espécies que encontram-se disponível no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP).

As amostras coletadas foram armazenadas, inicialmente, em sacos plásticos e transportadas ao laboratório LPS (Laboratório de Processos de Separação – *Campus UNIOESTE*).

4.1.1 Preparo das Matérias-primas

Para a obtenção dos extratos as folhas do Abacateiro, Sabugueiro e da Guaxupita foram completamente desidratadas em estufa de ar circulante a temperatura de 40 °C, trituradas em liquidificador comercial até sua transformação em pó fino e armazenadas em sacos plásticos mantidos refrigerados à -5 °C.

O material triturado foi classificado de acordo com a série padrão de peneiras Tyler de 20, 24, 48, 60 e 100 mesh utilizando um agitador de peneiras para padronizar o tamanho das partículas. O material retido entre as peneiras de 24 e 60 mesh foram utilizados nas extrações.

4.2 Caracterização das Matérias-primas

4.2.1 Determinação do Diâmetro Médio das Partículas (Ds)

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). Para a análise dos dados foram calculados o tamanho médio das partículas pelo método aritmético, conforme a Equação 1. Foi utilizada a seguinte expressão dada por Gomide (1983) para o cálculo do diâmetro médio das partículas:

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

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (2)$$

Em que:

\bar{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

4.2.2 Umidade das Matérias-primas

A umidade da matéria-prima foi definida através do método gravimétrico, em triplicata, onde 5g das folhas foram pesados em balança analítica (AUX220 - Shimadzu), acondicionadas em placa de Petri e levados a estufa a 105 °C por 24 horas. Percorrido o tempo as amostras foram retiradas da estufa e transferidas 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 3:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

Mu: massa da amostra úmida;

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

4.3 Obtenção dos Extratos

Os extratos das folhas do Abacateiro, Sabugueiro e Guaxupita foram obtidos por extração convencional com solventes líquidos etanol (Neon P.A), acetato de etila (Anidrol, P.A) e Hexano (Anidrol, P.A), os quais apresentam índices de polaridade distintos como indicado na Tabela 2.

Tabela 2: Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração convencional.

SOLVENTES	ÍNDICE DE POLARIDA
Hexano	0
Acetato de Etila	4,4
Etanol	5,2

Fonte: adaptado de BYERS, 2009.

4.3.1 Extração Convencional

A extração foi realizada com o extrator de gorduras – Goldfish no Laboratório de Grupo de Pesquisa em Recursos Pesqueiros e Limnologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo/Pr. Neste tipo de extração o solvente fica em contato com a amostra, por um período

de 3 horas. Foi empregado a razão de 1:10 massa/volume (10 g de amostra seca para 100 mL).

O início da extração foi contabilizado a partir do início da fervura do solvente, após aquecimento contínuo a 100 °C durante 1h30min, em seguida suspensão reboiler e gotejamento do solvente aquecido a 130 °C durante 1 hora, por fim a recuperação do solvente foi realizada durante 30 minutos com o fechamento da válvula (figura 11).

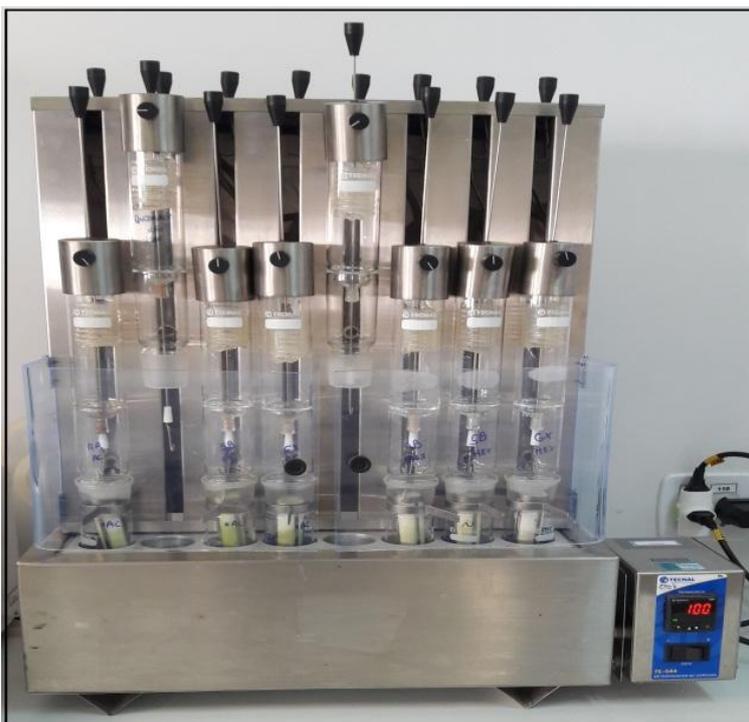


Figura 11 - Aparelho extrator de gordura - Goldfish.

Fonte: a autora, 2019.

Após a extração, os extratos foram secos em estufa a 60 °C até evaporação total do solvente restante, foram armazenados em fracos âmbar e mantidos sob refrigeração. Os rendimentos das extrações feitas no extrator de gordura Goldfish foram calculados Equação (4), a partir da razão entre a massa do extrato e a massa inicial da matéria-prima utilizada.

$$R(\%) = \frac{m \text{ extrato}}{m \text{ massa amostra}} \times 100 \quad (4)$$

Em que:

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

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

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

Nesta etapa foram obtidos nove extratos (figura 12): Guaxupita/Etanol (GxEt), Guaxupita/ Acetato de etila (GxAe), Guaxupita/Hexano (GxHex), Sabugueiro/Etanol (SbEt), Sabugueiro/Acetato de etila (SbAe), Sabugueiro/Hexano (SbHex), Abacateiro/Etanol (AbEt), Abacateiro/Acetato de etila (AbAe) e Abacateiro/Hexano (AbHex).

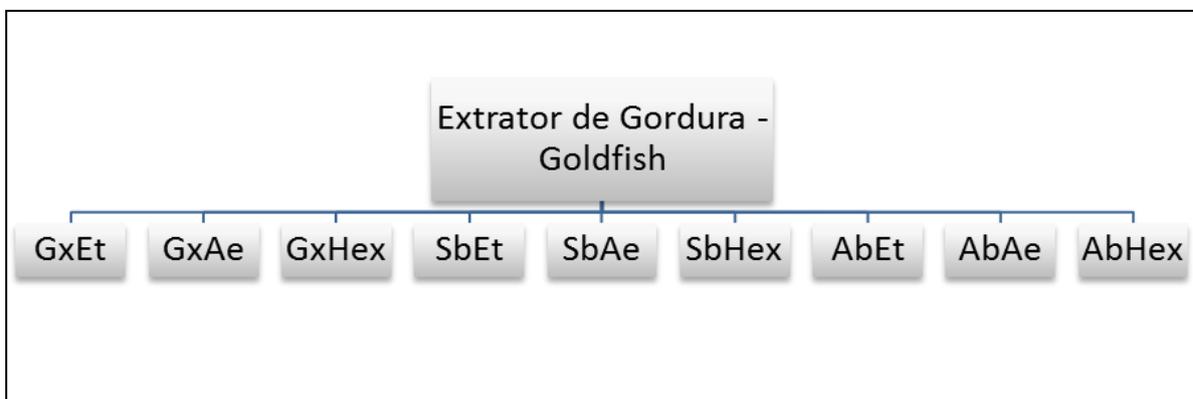


Figura 12 - Fluxograma da extração convencional.

Fonte: a autora, 2019.

4.4 Caracterização dos Extratos

Os extratos obtidos foram submetidos à caracterização quanto a sua composição fitoquímica, teor de fenóis e teste DPPH•.

4.4.1 Testes Fitoquímicos Preliminares: Colorimetria, Precipitação

Testes fitoquímicos preliminares foram realizados de acordo com metodologia previamente descrita por Goyal, Middha e Sen (2010). Inicialmente

preparou-se a solução (S1), para a qual foram pesados 250 mg do material vegetal e adicionados 15 mL de água deionizada. Essa mistura foi levada para banho-maria até começar a ferver, após resfriada a mistura foi filtrada.

O teste para Taninos, foram adicionados 2 mL de S1 + 1 mL de FeCl_3 e observou-se a formação de um precipitado preto-azulado ou preto-esverdeado, o qual confirmar a presença de taninos.

Para testar Saponinas, utilizou-se o teste de formação de espuma, onde 0,5 mL da S1 foram colocados em um tubo de ensaio e adicionando-se 5 mL de água deionizada. O tubo foi vedado com papel alumínio e agitado vigorosamente por 30 segundos. Em caso de formação de espuma, 5 gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado foram pingadas sobre a amostra, após isso observou-se a permanência da espuma no tubo indicando a presença de saponinas.

Já o teste de flavonoides baseou-se na reação de Shinoda, para esse método, foram pesadas 100 mg do pó das amostras, em seguida foram adicionados 2,5 mL de etanol em constante agitação até extração dos compostos. Após, 1 mL dessa solução foi transferida para um tubo de ensaio e adicionados 2 fragmentos de magnésio metálico, pela parede do tubo deixando-o escorrer cerca de 7 gotas de HCl concentrado, o tubo foi deixado em reação por alguns minutos e o aparecimento de coloração rosa, laranja ou vermelha, indicou resultado positivo para flavonoides.

O teste de alcaloides foi realizado a partir de 100 mg de pó da amostra onde foram adicionados 10 mL de uma solução de etanol 50% à 1% de ácido sulfúrico (H_2SO_4), esta mistura foi mantida em banho-maria até fervura, após resfriada e filtrada foram adicionadas 3 gotas de hidróxido de amônio (NH_4OH) concentrado juntamente com 10 mL de clorofórmio, agitando-a vagarosamente e a camada de clorofórmio foi coletada. Em seguida todo o clorofórmio foi evaporado em banho-maria. O resíduo foi ressuspensionado com 1 mL de ácido clorídrico diluído a 1% adicionando 3 gotas de reagente de Mayer, o aparecimento de precipitado de cor vermelho-alaranjado ou vermelho acastanhado indicou presença de alcaloides.

Para verificar a presença de Antraquinonas realizou-se o teste de Borntrager onde foram pesadas de 80 mg da amostra e adicionado 4 mL de clorofórmio em constante agitação. A solução obtida foi filtrada e 2 mL do filtrado foi transferido para um tubo de ensaio. Cuidadosamente adicionou-se pela parede do tubo 2 mL de NH_4OH a 10%. O aparecimento de cor rosa ou roxo na solução ou a formação de um anel rosa ou roxo confirma a presença de antraquinonas.

4.4.2 Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais (TFT) pelo Método Folin-Ciocalteu

A quantificação de compostos fenólicos nos extratos das folhas de Guaxupita, Sabugueiro e Abacateiro foram realizadas empregando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Método que se baseiam em reações de oxidação-redução entre os compostos fenólicos e íons metálicos (SILVA *et al.*, 2010).

Para a realização do teste, as amostras foram dissolvidos em etanol, a fim de obter uma concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Em um tubo de ensaio adicionou-se 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu 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 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria. A absorbância foi medida a 765 nm em espectrofotômetro.

A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada pela curva padrão preparada com ácido gálico nas concentrações de: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir da curva, foi calculado o coeficiente de correlação (R^2). 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. A partir da correlação com a curva padrão de ácido gálico, determinou-se os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG). g^{-1} de extrato, através da Equação (5). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

$$TFT \left[\frac{mg \ EAG}{g \ extrato} \right] = \frac{EAG * 1000}{Dext} \quad (5)$$

Em que:

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

Dext: diluição das amostras (mgEXT/mL).

4.4.3 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 atribui 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 experimento 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).

A partir dos resultados conseguidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. Os resultados foram expressos como EC₅₀ (concentração equivalente), ou seja, 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 com a concentração em $6 \times 10^{-5} M$ 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 (6) (MENSOR *et al.*, 2001).

$$\% \text{ inibição do radical DPPH} = \frac{\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. controle}} * 100 \quad (6)$$

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).

4.5 Obtenção do Biodiesel

A produção do biodiesel iniciou-se com a mistura de 126,316 mL de álcool metílico com 5,46 g de catalisador hidróxido de potássio (2% da massa de óleo). Em seguida, adicionou-se em um balão de três bocas 300 mL de óleo de soja, previamente aquecido a 75 °C, e a mistura contendo álcool e catalisador, foram mantidos em aquecimento a 80 °C por 4 horas, em sistema fechado com agitação magnética constante, para que fosse possível converter os triglicerídeos em ésteres metílicos (SHAHBAZ *et al.*, 2011).

Após o tempo de reação, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de decantação de 500 mL para a separação de fases, que ocorreu de maneira espontânea no período de 24 horas. A fase superior (biodiesel) foi separada da inferior (glicerol e outras impurezas), lavada várias vezes, com água a 65 °C, para

retirada de impurezas e resíduos da reação. A mistura foi separada, novamente, por decantação e a fase orgânica foi seca e armazenada em frasco vidro âmbar.

4.5.1 Caracterização do Biodiesel

Para determinar as características físico-químicas do Biodiesel foram realizados as seguintes análises: de cor e aspecto, índice de acidez, teor de água, espectroscopia na região do infravermelho e teor de éster.

As determinações da cor visual e aspecto das amostras do Biodiesel foram feitas em um recipiente transparente contra a luz observando a presença de impurezas, e/ou água no fundo do recipiente e a coloração do produto. Em que o aspecto deve ser límpido e isento de impurezas; límpido e com impurezas; turvo e isento de impurezas, ou turvo e com impurezas (GALLINA *et al.*, 2011).

Na acidez foi utilizado o equipamento de Titulação eletrônico (848 Titrino plus, Metrohm) no qual, pesou-se 30 g do biodiesel e adicionar uma solução de 80 mL de álcool isopropílico e 20 mL de água destilada. Após foi levada a solução ao equipamento que determina a quantidade de miligramas de KOH que são necessários para neutralizar cada grama do Biodiesel. A determinação do teor de água presente no biodiesel foi realizada em equipamento Karl Fischer (831 KF Coulometer, Metrohm). Foi acrescentado 1 mL do biodiesel, com massa conhecida, no equipamento que faz a leitura da umidade contida no biodiesel.

O teor de ésteres metílicos das amostras produzidas foi realizado em um cromatógrafo a gás (CG) (Clarus 480), nas condições: Coluna Elite-WAX (30m x 0,25 mm X 0,5 µm), temperatura inicial do forno foi de 160 °C, assim aumentando-a para 230 °C, a uma taxa de 5 °C/min, permanecendo por 2 minutos, a vazão do gás de arraste será de 2 mL/min, a temperatura do injetor e detector foi de 250 °C e o volume de injeção da amostra de 2 µL. As amostras foram preparadas antecipadamente. Primeiro foi pesado 300 mg da amostra em balão de 10 ml completando o volume com n-heptano, após, 100 µL da solução foi transferida para um balão de 10 mL, acrescentando 100 µL do padrão interno (heptadecanoato de metila) e então completando o volume com heptano. A

amostra foi preparada, em seguida realizado a análise no cromatógrafo e cálculo para rendimento em ésteres do biodiesel.

A porcentagem do teor de éster no biodiesel foi calculada pela seguinte equação (7) (SANTOS *et al.*, 2018).

$$\%_x = \frac{M_p \cdot A_x}{A_p \cdot M_o} * 100 \quad (7)$$

Em que:

$\%_x$ é o teor de ésteres totais no óleo (%);

M_p é a massa de padrão presente na amostra inserida no CG (mg);

M_o é a massa de óleo presente na amostra inserida no CG (mg);

A_x é a soma das áreas no cromatograma relativa aos ésteres verificados na amostra analisada ($\mu V \cdot s$);

Por fim, foi feito o ensaio de espectroscopia na região do infravermelho. A região do infravermelho compreende a faixa de ondas de 400 a 4000 cm^{-1} de radiação no espectro eletromagnético. Quando essa radiação é absorvida por uma molécula, esta converte em energia de vibração molecular e origina bandas de absorção no espectro obtido, que são apresentadas em número ou comprimento de onda. A espectroscopia na região do infravermelho pode ser utilizada para caracterizar o biodiesel, uma vez que este apresenta bandas características no espectro.

4.6 Teste de Estabilidade Oxidativa do Biodiesel

4.6.1 Aditivação do Biodiesel para o teste DSC

Para analisar a influência de antioxidantes naturais presentes nos extratos das folhas da Guaxupita, Sabugueiro e Abacateiro na estabilidade termo-oxidativa

do biodiesel, foi pesado 10 g de biodiesel acrescidos de 10 mg da amostra, obtendo amostras de 1000 ppm como recomendado pela ANP. As amostras do biodiesel aditivado foram submetidas ao banho ultrasônico (Eco-sonics modelo Q5.9/37A), para melhor homogeneização. A fim de comparação, foi utilizado um antioxidante sintético (BHA e BHT) na mesma concentração (1000 ppm).

4.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O tempo de indução oxidativa das amostras foram analisados pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC 60/Shimadzu). Cerca de 8 mg de amostra foram adicionadas a um fluxo constante de gás oxigênio de 50 mL.min⁻¹ em uma faixa de temperatura de 25 °C a 400 °C, com taxa de aquecimento de 5° C.min⁻¹. Os ensaios foram realizados como biodiesel sem a adição de qualquer antioxidante e com adição dos antioxidantes naturais (GxEt, GxAe, GxHex, SbEt, SbAe, SbHex, AbEt, AbAe e AbHex) e sintético (BHA e BHT). A temperatura de oxidação do biodiesel, submetido ao teste DSC, foi obtido pelo do método das tangentes, pelo gráfico de fluxo de calor *versus* temperatura (°C) (BUTROW; SEYLER, 2003). A espécie que apresentou os melhores resultados no DSC foi submetida à análise pelo teste de Oxidação Acelerada Rancimat, além de ter sua caracterização determinada e a realização dos testes microbiológicos.

A espécie que apresentou os melhores resultados no DSC foi submetida à análise pelo teste de Oxidação Acelerada Rancimat.

4.7 Rancimat

Foram preparadas amostras de 3 g de Biodiesel aditivado com 1000 ppm dos antioxidantes obtidos das folhas da Guaxupita. 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 de acordo com a norma oficial EN 14112 de determinação da estabilidade em teste acelerado.

4.8 Atividade Antimicrobiana da Fermentação Alcoólica

4.8.1 Análise Microbiológica dos Caldos

Para a realização dos testes microbiológicos foram utilizadas três fases do caldo:

- Caldo absoluto – Caldo obtido pela prensagem da cana e que não sofreu nenhuma diluição. Incluem em sua composição, todos os sólidos solúveis e toda a água da cana além de microrganismos.
- Caldo Tratado – É a denominação do caldo misto que recebeu processo de clarificação e que passou pelo filtro.
- Caldo Fermentado – é o caldo obtido após a fermentação.

As coletas foram realizadas em moinho artesanal em outubro de 2018. Foram coletados 100 mL do caldo de cada etapa, descrita anteriormente, em frascos de vidro estéril, os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas, identificados e transportados para o laboratório de microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – *Campus Toledo*.

Para dar início ao Plaqueamento foram realizadas as diluições seriadas das amostras a serem analisadas, o qual para cada amostra do caldo foi retirado assepticamente 1 mL e homogeneizados em 9 mL de água peptonada tamponada a 0,1% para se obter a diluição inicial (10^{-1}), seguidas de diluições decimais até 10^{-3} , de acordo com a figura 13.

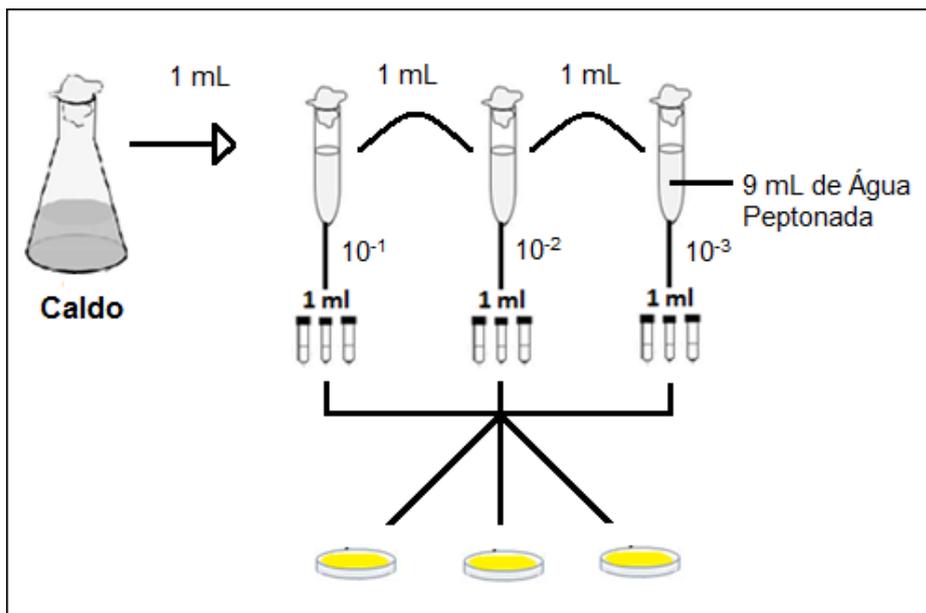


Figura 13 - Esquema de diluições seriadas para o plaqueamento

Fonte: a autora, 2019.

Após o término da diluição seriada, foi feito o Plaqueamento diferencial, o qual consiste na retirada de 1 ml da diluição para serem colocados na placa de Petri contendo o meio PCA (Plate Count Agar), o diluído foi espalhado pela placa com o auxílio de uma alça de vidro previamente esterilizada. Para esta etapa foi começada a coleta das dissoluções pela ordem inversa, do tubo 10^{-3} ao 10^{-1} , realizadas em triplicata. As placas foram incubadas a $35-37^{\circ}$ C e após 48h realizada a contagem de unidades formadoras de colônias, a partir da média das colônias (equação 8), sendo que placas que contenham confluência de colônias são consideradas incontáveis (INC).

$$Mc = \frac{n^{\circ} \text{ total colônias}}{n^{\circ} \text{ de diluição}} \quad (8)$$

Em que:

Mc = Media da UFC/mL;

N° total de colônias = valor total das colônias após a contagem;

N° de diluições = quantas repetições tiveram cada diluição (3);

4.8.2 Coloração de Gram

A partir das placas 10^{-1} do Caldo absoluto, Caldo Tratado e do Caldo Fermentado foi realizada a técnica de coloração de Gram. O método consiste no tratamento de uma amostra de uma cultura bacteriana crescida em meio sólido, fixado pelo calor, com os reagentes cristal violeta, lugol, álcool-acetona e fucsina básica. Ao microscópio, as células Gram-positivas aparecem coradas em violeta escuro e as Gram-negativas em vermelho ou rosa escuro.

O esfregaço foi preparado a partir da suspensão de uma pequena porção da amostra bacteriana em uma gota de água sobre uma lâmina de microscópio. O material foi seco e, fixado com calor, flambando rapidamente a lâmina acima da chama de um bico de Bunsen. O corante primário cristal violeta cobriu toda a superfície da lâmina, durante um minuto. Transcorrido o tempo o corante foi removido com água destilada, com auxílio de um conta-gotas. Na etapa de fixação, o lugol foi aplicado em toda lâmina, deixando-a em repouso por um minuto. O mesmo foi removido da lâmina com água destilada. Com a lâmina inclinada é iniciado o processo de descoloração, que consistiu em despejar algumas gotas de álcool-acetona 1:1 (v:v) (descolorizador) para remover o complexo cristal violeta-lugol de células Gram-negativas.

Por fim, a etapa de coloração secundária, no qual, o corante fucsina básica (safranina) foi aplicado até cobrir toda superfície da lâmina por um minuto. A lâmina foi enxaguada com água, e o excesso contido nas bordas foi absorvido com papel macio. Após a realização da técnica as amostras foram analisadas em microscópio óptico para a determinação do Gram.

4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição seriada em microplacas de 96 poços, em duplicata, seguindo metodologia previamente descrita (NCCLS, 2003). O teste foi realizado frente às cepas Gram-

positivas e Gram-negativas de acordo com as bactérias de maior contaminação na indústria alcooleira, conforme a tabela 3.

Tabela 3: Classificação de Gram.

Gram-Positivo	Gram-Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Fonte: a autora, 2019.

Foram adicionados 90 µL de caldo nutriente nos orifícios de microplacas contendo 96 poços. Em seguida a partir da segunda coluna adicionou-se 90 µL dos extratos preparados com Etanol na concentração de 320 mg/mL, e com acetato de etila e hexano na concentração de 160 mg/mL, os mesmos foram homogeneizados três vezes, e em seguida transferiu-se 90 µL para a terceira coluna e assim sucessivamente, até chegar na décima primeira coluna, as concentrações nos poços encontram-se descritas abaixo (tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Concentrações (mg/mL) dos extratos etanólicos nos poços das microplacas.

Número do poço	Concentração (mg/mL)
2	320
3	160
4	80
5	40
6	20
7	10
8	5
9	2,5
10	1,25
11	0,625

Fonte: a autora, 2019.

Tabela 5: Concentrações (mg/mL) dos extratos acetato de etila e hexano nos poços das microplacas.

Número do poço	Concentração (mg/mL)
2	160
3	80
4	40
5	20
6	10
7	5
8	2,5
9	1,25
10	0,625
11	0,3125

Fonte: a autora, 2019.

Por último foi adicionado aos orifícios da microplaca, desde a primeira à décima primeira coluna, 10 µL das suspensões bacterianas em água estéril na escala 0,5 de McFarland. Para o controle positivo foi utilizado à primeira coluna (caldo + bactéria), já para o controle negativo foi utilizada a décima segunda coluna (contendo apenas caldo).

A incubação das microplacas em estufa bacteriológica ocorreu a 37 °C por um período de 24 horas. Após esse período adicionou-se em cada orifício das microplacas 20 µL do revelador TTC (2,3,5 – trifeniltetrazólio) a 2% e as mesmas foram incubadas novamente por 2 horas. Ao final da incubação, o aparecimento de cor avermelhada indicou onde ocorreu a multiplicação bacteriana, enquanto que aqueles que permanecerem incolores demonstraram a ausência de multiplicação.

4.9.1 Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática

Com auxílio de um swab, o conteúdo dos poços que mantiveram-se incolores foi transferido para placas contendo meio Agar Mueller Hinton. Após 24 horas de incubação a 37 °C assim foi avaliado o aparecimento de unidades formadoras de colônia (UFC), indicando efeito bacteriostático, ou ausência de UFC indicando efeito bactericida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização das Matérias-primas

5.1.1 Granulometria das Amostras

Os resultados do teste da determinação da granulometria das folhas da Guaxupita, Sabugueiro e Abacateiro após o processo de trituração realizado segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) que determina o tamanho de amostras vegetais para extração apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Distribuição granulométrica das folhas após secagem e moagem.

Mesh (Tyler)	Fração	Abertura das peneiras (mm)	Amostra retida GX (g)	Amostra retida GX (%) ($\Delta li \cdot 100$)	Amostra retida SB (g)	Amostra retida SB (%) ($\Delta li \cdot 100$)	Amostra retida AB (g)	Amostra retida AB (%) ($\Delta li \cdot 100$)
20	>20	0,850	81,3	9,4	51,3	8,4	78,7	11,0
24	20/24	0,710	133,5	15,3	113,7	18,7	127,3	17,8
48	24/48	0,300	291,6	33,5	149,9	24,6	159,4	22,3
60	48/60	0,250	66,4	7,6	56,3	9,2	59,6	8,4
100	60/100	0,150	97,7	11,2	87,4	14,4	89,7	12,5
Fundo	<100		200,0	23,0	150,0	24,7	200,0	28,0
Total			870,5	100	608,6	100	714,7	100

*GX: guaxupita. SB: sabugueira. AB: abacate.

Fonte: autora, 2018.

Para realização dos ensaios foram utilizadas partículas que permaneceram retidas entre as peneiras de 24 a 60 mesh, que se refere ao tamanho intermediário das partículas obtidas após moagem. Os resultados mostram que as partículas do material vegetal encontram-se predominantemente distribuídas na peneira com abertura de 0,300 mm, representando 33,5% do material vegetal. Considerando apenas as partículas retidas nas peneiras 24 a 60 mesh, tem-se que o diâmetro é $d_s = 0,31 \text{ mm}$ para Guaxupita, $d_s = 0,29 \text{ mm}$ para o Sabugueiro e $d_s = 0,27 \text{ mm}$ para Abacateiro.

A distribuição granulométrica das partículas de matérias primas vegetal constitui um fator determinante na rentabilidade dos procedimentos extrativos. A maneira com que o solvente entra em contato partícula vegetal interfere diretamente na qualidade e eficiência do método extrativo (ROLIM *et al.*, 2012).

5.1.2 Umidade das Amostras

O teor de umidade das folhas da Guaxupita, Sabugueiro e Abacateiro foram determinados através da relação entre o peso da água eliminada e o peso de amostra total, segundo Pimentel *et al.* (2008). As folhas da Guaxupita chegaram ao teor médio de $08,66 \pm 0,5\%$, seguidos das folhas do Sabugueiro e Abacateiro com teor médio de $12,35 \pm 0,7$ e $10,12 \pm 0,7\%$, respectivamente. Teores esse dentro do padrão recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010), de 8 a 14% de umidade.

A umidade é uma propriedade significativa utilizada para assegurar a qualidade de um material vegetal, assim os processos de secagem inadequados podem levar à multiplicação de fungos e bactérias o que, além de representar riscos devido à produção de substâncias tóxicas, podem levar a destruição ou alteração dos princípios ativos e causarem efeitos enzimáticos, tornando-se assim o material impróprio para extração (BRAGA *et al.*, 2007).

O teor de umidade também pode influenciar no processo de extração dependendo da polaridade do solvente com a quantidade de água dentro da amostra. Em alguns casos a água pode facilitar a solubilidade dos solutos, agindo com um mecanismo semelhante ao de um cosolvente e aumentando o rendimento da extração. Em outras situações, a água pode interferir na atuação do solvente na solubilização de compostos específicos (BRUNNER, 1994; IVANOVIC *et al.*, 2011; REVERCHON, 1997).

5.2 Extração convencional – Goldfish

Após evaporação total dos solventes utilizados na extração convencional, realizou-se o cálculo do rendimento da extração, a partir da razão entre a massa do extrato e a massa inicial da amostra, de acordo com Equação (1). Os resultados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimento global das extrações convencionais com extrator de gordura - Goldfish.

Matéria-prima	Solvente	Tempo de Extração (min)	Rendimento (%)
Guaxupita	Hexano	180	5,37±0,02
Guaxupita	Acetato de Etila	180	7,58±0,02
Guaxupita	Etanol	180	9,15±0,03
Sabugueiro	Hexano	180	0,02±0,01
Sabugueiro	Acetato de Etila	180	0,18±0,01
Sabugueiro	Etanol	180	0,01±0,01
Abacateiro	Hexano	180	0,27±0,01
Abacateiro	Acetato de Etila	180	0,32±0,01
Abacateiro	Etanol	180	0,37±0,01

Fonte: a autora, 2019.

Os extratos das folhas da Guaxupita foram os que manifestaram os maiores rendimentos comparando com as demais espécies. Dentre as extrações o extrato etílico da Guaxupita apresentou maior rendimento em relação aos demais extratos. Rendimentos semelhantes foram encontrados por Witt; Baumgartner; Silva, (2018) na qual a extração etanólica obteve melhor rendimento no extrator de gorduras (Goldfish) comparado com acetato de etila e hexano.

O maior índice de rendimento da extração utilizando o etanol como solvente pode indicar a presença de compostos polares no extrato das folhas de Guaxupita. O etanol é um solvente muito versátil, podendo extrair diversos compostos, apresenta alto índice de polaridade (5,2), mas, pode manifestar uma dualidade tornando-se capaz de extrair tanto compostos polares quanto apolares. Já o hexano foi o solvente que apresentou o menor rendimento, por ser um composto apolar (0) e considerado mais seletivo, apresentando menos afinidade

com os compostos presentes no extrato. Dessa maneira observa-se que existe uma relação entre a polaridade do solvente utilizado e a redução do rendimento da extração (CAETANO, 2009).

Os solventes mais polares, como o etanol, exibem alta solubilização nas matrizes vegetais, porém possuem baixa seletividade, ou seja, extraindo uma grande variedade de compostos (AGUIAR *et al.*, 2013). De acordo com Almeida (2006), a polaridade não é o único aspecto que influencia no rendimento da extração, a temperaturas muito elevadas pode causar a perda de compostos termolábeis, o que acarreta na diminuição do rendimento.

5.3 Caracterização dos Extratos

5.3.1 Testes Fitoquímicos Preliminares: Colorimetria, Precipitação

De acordo com Simões *et al.* (2004), a análise fitoquímica tem como objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Com a realização da caracterização fitoquímica foi possível verificar grupos de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas, taninos, flavonoides e alcalóides, pela mudança na coloração. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos na triagem fitoquímica das folhas da Guaxupita, Sagueiro e Abacateiro.

Tabela 8: Triagem fitoquímica.

Compostos analisados	Guaxupita	Sabugueiro	Abacateiro
Taninos	+++	+	+
Saponinas	-	-	-
Flavonóides	+	-	-
Alcalóides	-	+	-
Antraquinonas	-	-	-

Positivo forte (+++); positivo moderado (++); positivo fraco (+); negativo (-).
Fonte: a autora, 2019.

Os compostos do metabolismo secundário conferem aos vegetais uma resistência contra danos externos, exercendo função de proteger as plantas

(SIMÕES *et al.*, 2002). Quando realizado o procedimento de extração, esses compostos continuam tendo interação com o meio em que estarão inseridos, alguns compostos tem o papel importante na conservação de outros produtos, como no biodiesel, esses compostos atuam como antioxidantes aumentando a vida útil do produto, e também na inibição de microrganismos contaminantes.

Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, capazes de inibir o desenvolvimento de insetos, fungos e bactérias (FERNANDES, 2002). Para Monteiro *et al.* (2005) o efeito antimicrobiano dos compostos pertencentes a este grupo, já foi comprovada em inúmeros estudos relacionados a diferentes bactérias. Simões *et al.* (2002), acredita que esta atividade é devido à inibição de enzimas das bactérias, à ação direta na membrana dos microrganismos ou pela competição de íons metálicos, essenciais ao metabolismo microbiano. Além disso, devido ao seu caráter fenólico, são conferidas propriedades desinfetantes (COSTA, 1994). Assim como os taninos, os flavonoides e alcalóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza e são importantes por possuírem efeitos biológicos, incluindo atividade antimicrobiana e antioxidante (MIDDLETON *et al.*, 2000). Alguns estudos foram realizados (BASILE *et al.*, 1997; VUOTTO *et al.*, 2000) comprovando as propriedades farmacológicas presentes nas folhas da goiaba-serrana (*Acca sellowiana*), os quais apresentam compostos secundários como taninos, alcaloides e flavonoides, demonstraram efetiva atividade antibacteriana e antioxidante (SANTOS, 2005).

5.3.2 Determinação do Teor de Compostos fenólicos totais (TFT) método FolinCiocalteau

A determinação do teor de fenóis é realizada principalmente pelo método de reagente FolinCiocalteau, esse reagente consiste em uma combinação dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico (designados em conjunto por ácido fosfomolibdico-túngstico), no qual o molibdênio e o tungstênio se encontram no estado de oxidação +5 e +6 (cor amarela), porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, e em meio alcalino, formam-se os

chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6, e cuja coloração permite a medição colorimétrica e a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não precisam necessariamente possuir natureza fenólica. Estes pigmentos azuis têm uma absorção máxima que depende da qualidade e/ou composição quantitativa das misturas de fenóis e do pH das soluções, usualmente obtido adicionando carbonato de sódio.

Apesar do método do reagente de FolinCiocalteu ser amplamente utilizado na determinação dos fenóis totais em diferentes tipos de amostras, apresenta algumas limitações, visto que mede a capacidade redutora total de uma amostra. Esta determinação correlaciona-se com a capacidade redutora e antioxidante dos compostos fenólicos. A dissociação do próton dos fenóis leva à formação do anião fenolato, que é capaz de reduzir o reagente de FolinCiocalteu. Muitos compostos não-fenólicos, presentes em frutas e plantas, principalmente o ácido ascórbico e os açúcares redutores, também podem reduzir o reagente de FolinCiocalteu.

Os resultados encontrados para as extrações convencionais estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9: Teor de fenólicos totais para os extratos.

Extratos	TFT (mg de EAG/g de extrato)
Guaxupita Etanol	37,60±0,044
Guaxupita Acetato de Etila	34,08±0,066
Guaxupita Hexano	21,60±0,024
Sabugueiro Etanol	29,01±0,056
Sabugueiro Acetato de Etila	23,40±0,034
Sabugueiro Hexano	17,20±0,022
Abacateiro Etanol	25,01±0,060
Abacateiro Acetato de Etila	17,02±0,022
Abacateiro Hexano	12,60±0,020

Fonte: a autora, 2019.

As amostras são de três diferentes espécies vegetais, fica evidenciado que todos os extratos, independente da espécie diferem quanto aos teores de fenólicos totais (TFT). Nota-se que a amostra extraída usando etanol como solvente apresentou os valores mais altos de TFT nas três espécies testadas

(Guaxupita, Sabugueiro e Abacateiro). Enquanto, a extração com o solvente hexano apresentou os menores valores para o teor de compostos fenólicos, $21,60 \pm 0,024$ mg de EAG/g para guaxupita, $17,20 \pm 0,022$ e $12,60 \pm 0,020$ mg de EAG/g para sabugueiro e abacateiro, respectivamente. Essa diferença está relacionada ao uso de solventes de diferentes polaridades empregados no processo de extração que foi capaz de extrair com maior clareza a variação de fenóis nas amostras avaliadas (GOBBO-NETO *et al.*, 2005). Os extratos da espécie Guaxupita foram os que apresentaram os melhores resultados de TFT comparando com as demais espécies. Os resultados encontrados para Guaxupita corroboram com os descritos por Borella e Fontoura (2002) que mostraram variação no teor de fenóis totais em diferentes amostras de carqueja. Não foi encontrado na literatura autores que tenham realizado teor de fenóis desta espécie.

Quando confrontado o tempo de indução dos testes Rancimat e DSC com o TFT pode-se constatar que não há uma relação direta entre os resultados encontrados. Porém, em Dunn (2005) alguns antioxidantes fenólicos possuem alta volatilidade e suscetibilidade à oxidação, apresentando baixa eficiência em temperaturas muito elevadas, o que mostra que ambos os métodos podem ser eficientes para análises termo-oxidativas.

5.3.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

A atividade antioxidante determinada pelo método do radical estável DPPH, mostra a capacidade de substâncias pertencentes ao extrato das folhas do Abacateiro, Sabugueiro e Guaxupita obtidos em sequestrar radicais livres do meio existente. Isto ocorre devido ao fato de o radical livre DPPH conter um único elétron que absorve fortemente em 518 nm e como esse elétron se torna pareado na presença de um captador de radicais livres, a absorção desaparece, resultando em uma descoloração conforme a quantidade de elétrons pareados (CHOI *et al.*, 2014). Os testes realizados para analisar a atividade antioxidante

dos extratos obtidos das folhas da Guaxupita utilizando o DPPH estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Atividade antioxidante dos extratos na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a capacidade de redução de 50% do radical DPPH• (EC_{50}).

Extratos	AA(%) 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Guaxupita Etanol	92,5 \pm 0,002
Guaxupita Acetato de Etila	87,5 \pm 0,002
Guaxupita Hexano	31,6 \pm 0,004
Sabugueiro Etanol	78,0 \pm 0,002
Sabugueiro Acetato de Etila	33,1 \pm 0,003
Sabugueiro Hexano	27,2 \pm 0,002
Abacateiro Etanol	55,0 \pm 0,004
Abacateiro Acetato de Etila	27,0 \pm 0,002
Abacateiro Hexano	12,3 \pm 0,001

Fonte: a autora, 2019.

As amostras extraídas com o solvente etanol e acetato de etila apresentaram valores razoavelmente próximos de EC_{50} , a maior atividade antioxidante foi correspondente à amostra Guaxupita extraído com etanol, que obteve AA de 92,5% \pm 0,002. O potencial antioxidante deste extrato está relacionado principalmente à presença de compostos fenólicos (ROSS; KASUM, 2002)

Os resultados obtidos neste teste evidenciaram uma capacidade antioxidante das folhas da Guaxupita. A atividade antioxidante para os extratos dessa espécie não estão reportadas em literatura, no entanto, Martins *et al.*, (2006), testaram que o extrato etanólico e acetato de etila das folhas de *Esenbeckia febrífuga* pertencente ao mesmo gênero da Guaxupita, demonstraram uma boa atividade antioxidante (97,05 e 77,30 g/mL respectivamente). Entretanto, Mannion e Menezes (2010), analisando o extrato etanólico das partes aéreas de *Urera baccifera* e partições deste em hexano, acetato de etila e butanol, obtiveram como melhor valor de capacidade antioxidante frente ao DPPH, um EC_{50} (concentração de planta capaz de inibir a atividade oxidante de 50% de DPPH) de 120,16 mg/g na fração em acetato de etila, classificando esta atividade como alta.

Rodriguez-Rojo *et al.* (2012) investigaram a utilização de água e etanol para obtenção de extratos da folha de alecrim (*Rosemarinus officinalis*) empregando técnicas de extração, como, extração convencional, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom. Os extratos aquosos mostraram melhor atividade antioxidante pelo método de inibição do radical livre DPPH•.

Muller, Frojlich e Bohm (2011) relatam que alguns compostos, por serem lipofílicos, não reagem frente ao radical DPPH. Assim sendo, devido à sensibilidade de cada procedimento usado na extração dos compostos, bem como para determinação da atividade antioxidante, os resultados poder ser divergentes entre si.

5.4 Caracterização do Biodiesel

Para caracterização do biodiesel, obtido pelo processo de transesterificação do óleo de soja analisaram-se cor e aspecto visual, índice de acidez, umidade e o teor de ésteres metílicos presente na amostra. Os resultados estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11: Caracterização do Biodiesel.

Teste	Umidade	Limites (ANP)	Biodiesel
Índice de Acidez	Mg KOH/g	Máx. 0,50	0,32
Teor de ésteres	%	>96,5	96,7
Umidade	Ppm	Máx. 500	325

Fonte: a autora, 2019.

De acordo com a norma EN 14112 estabelecida pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, o biodiesel estava dentro dos parâmetros aceitos, mostrando-se translucido de coloração amarela (figura 14), sem resquício de água no fundo do recipiente e livre de qualquer impureza solidas.



Figura 14 - Biodiesel de soja.

Fonte: a autora, 2019.

Os valores obtidos para umidade e índice de acidez estavam dentro dos limites máximos propostos pela ANP. Observa-se que o teor de umidade presente no biodiesel foi de 325 ppm estando abaixo do limite máximo de 500 ppm. O índice de acidez presente no Biodiesel sintetizado também mantém-se abaixo do limite estabelecido de 0,50 mg de KOH/g, sendo de 0,32 mg de KOH/g.

A umidade e o índice de acidez são parâmetros essenciais para manter a boa qualidade do biodiesel. A presença de umidade provoca o aumento no índice de acidez, esses parâmetros facilitam o processo de saponificação do produto, além de possibilitarem a hidrólise do Biodiesel resultando em ácidos graxos livres, favorecendo a corrosão de tanques e a acelerando seu processo de degradação (MA; HANNA, 1999).

A Figura 15 apresenta detalhes do perfil cromatográfico de uma amostra de biodiesel metílico de óleo de soja.

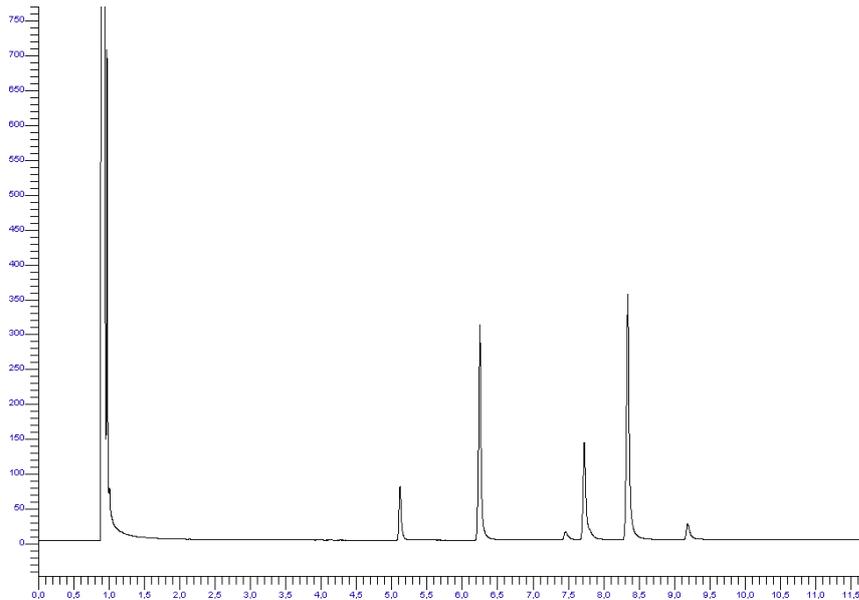


Figura 15 - Perfil cromatográfico do biodiesel de soja.

Fonte: a autora, 2019.

O resultado obtido para teor de ésteres foram de 96,7%, o que está acima do valor que satisfaz a especificação da União Europeia, na qual os teores de ácidos graxos livres, álcool, glicerina e água devem ser os menores possíveis, de modo que a pureza do biodiesel deve ser maior que 96,5% (BORSATO *et al.*, 2010). Mostrando-se apto para a realização dos testes quanto à estabilidade oxidativa do biodiesel.

5.5 Estabilidade oxidativa do Biodiesel

5.5.1 Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

Para avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel a Resolução 45/2014 da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis, determina conforme norma EN 14112 o método padrão como sendo o Rancimat. No entanto, outros métodos também vêm sendo utilizados por diversos pesquisadores para analisar a oxidação de combustíveis, biocombustíveis, óleos entre outros podem ser empregados. A calorimetria exploratória diferencial (DSC)

a qual pode ser realizada de forma isotérmica ou não isotérmica. Esse método possui algumas vantagens, pois requer menor tempo de análise e o uso de uma menor quantidade de amostra (JÚNIOR *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2009; LÓPEZ-BACEIRO *et al.*, 2010).

A análise de DSC foi realizada para o biodiesel adicionados dos extratos de das folhas de Sabugueiro, Abacate e Guaxupita, no qual foi possível encontrar a temperatura em que ocorreu a oxidação, bem como o tempo aproximado para que a oxidação ocorresse, os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados encontrados para as análises DSC no biodiesel aditivado com os extratos naturais.

Amostras	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Biodiesel Puro	123	25,50
BHA	154	28,32
BHT	147	29,56
Sabugueiro Etanol	157	28,58
Sabugueiro Acetato de Etila	154	28,00
Sabugueiro Hexano	147	26,48
Abacateiro Etanol	156	28,46
Abacateiro Acetato de Etila	155	28,32
Abacateiro Hexano	152	27,24
Guaxupita Etanol	163	31,17
Guaxupita Acetato de Etila	161	31,05
Guaxupita Hexano	159	29,57

Fonte: a autora, 2019.

Para ilustra como foram determinados os valores do tempo de indução oxidativa, na Figura 16 é apresentado à curva termogravimétrica empregando o DSC do biodiesel puro e para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT. 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, como o ponto P.

A temperatura está diretamente relacionada com o equilíbrio entre o desenvolvimento de radicais livres, radicais de peróxidos e superóxidos, marcado pelo ponto mais extremo das curvas. No entanto, as demais temperaturas estão relacionadas com o arranjo dos compostos estáveis na fase de terminação da autooxidação (TAVARES *et al.*, 2011; CORDEIRO, 2011).

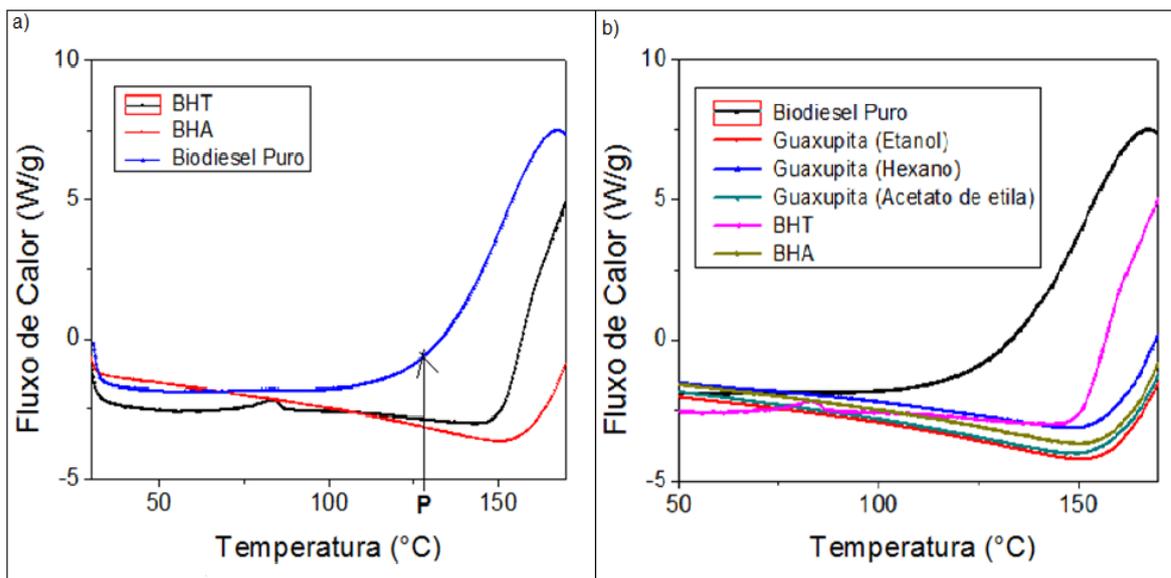


Figura 16 - Curva referente à análise DSC para o biodiesel comercial puro, aditivado com os antioxidantes sintéticos e com os extratos da Guaxupita.

Fonte: a autora, 2019.

A temperatura de oxidação do biodiesel puro foi de 123° C, para os antioxidantes BHA e BHT foram de 154 e 147° C, respectivamente. A partir dos resultados encontrados no DSC, verificou-se que as amostras contendo antioxidantes sintéticos apresentaram tempo de indução oxidativa maior do que o biodiesel puro. Por meio das temperaturas de oxidação é possível encontrar o tempo de indução oxidativo pelo método DSC sendo de 25,50 minutos para o biodiesel puro, para o biodiesel acrescido do BHT encontrou-se o tempo de indução de 28,32 minutos e 29,56 minutos para o BHA, conforme a figura 16a. Notou-se que existiu um aumento no valor do tempo de início da oxidação do biodiesel após a utilização dos antioxidantes sintéticos, ficando de acordo com diversos estudos referente ao uso de antioxidantes sintéticos no biodiesel (VALLE; LEONARDO; DWECK, 2014; TAVARES *et al.*, 2012).

Stavinoha e Kline (2001) mostraram uma correlação direta com os resultados do Teste Rancimat com a metodologia de análise por DSC. Portanto, este método é um procedimento adequado para verificação da atividade antioxidante em relação aos efeitos dos tipos e concentração dos antioxidantes na resistência relativa à oxidação do biodiesel.

Nos ensaios de DSC, a alteração de temperatura na amostra ocorre devido as diferentes reações químicas causadas, como a desidratação, dissociação ou decomposição além da reação de oxidação (TAVARES *et al.*, 2009). De acordo com Valle, Leonardo, Dweck, (2014) o tempo de indução para o biodiesel de soja usando o BHT e o BHA como aditivos sintéticos obtiveram um aumento significativo no período de indução oxidativa devido à adição desse agente, avaliados pela técnica de análise de DSC.

Todas as amostras contendo antioxidantes naturais apresentaram tempo de indução oxidativa maior do que o biodiesel puro. O extrato das folhas de guaxupita utilizando etanol como solvente foi o que apresentou o melhor tempo de indução, com 31,17 min (fig. 16b), seguidos da guaxupita (acetato de etila) e guaxupita (hexano) com 31,05 e 29,57 respectivamente, sendo essa a espécie que apresentou os melhores resultados como antioxidante natural.

Os resultados obtidos dos extratos naturais foram satisfatórios, pois apresentaram valores superiores aos do biodiesel puro e próximos aos obtidos pelo antioxidante sintético, o que favorece uma possível substituição do antioxidante sintético. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et al.*, 2014, com o extrato alcoólico das folhas secas da erva-mate, hortelã e alecrim, comprovado por Frolich *et al.* (2017) também com extrato etanólico de Alecrim e os extratos hexânicos das folhas da Acerola e Hortelã segundo Santos (2014).

Diversos autores confrontaram os resultados obtidos utilizando o equipamento Rancimat e a técnica DSC para verificação da estabilidade à oxidação, sendo possível comprovar a correlação entre os resultados obtidos pelas técnicas (POLAVKA *et al.*, 2005; ARAIN *et al.*, 2009; MOSER, 2009; RAMALHO *et al.*, 2011).

A partir dos melhores resultados obtidos no teste de DSC do tempo de oxidação foi escolhida a Guaxupita para realizar os testes de estabilidade oxidativa pelo método Rancimat.

5.5.2 Rancimat

No método Rancimat, o aumento da temperatura e uma corrente contínua de ar através da amostra aceleram o seu envelhecimento. O método atende as normas nacionais e internacionais. O tempo que decorre até que a oxidação em uma taxa elevada no período de indução. O período de indução (PI) é obtido pela intersecção das retas tangentes nas curvas de condutividade em função do tempo. O gráfico condutividade *versus* o tempo para as amostras submetidas a esse método para o biodiesel sem adição de antioxidante está ilustrado na Figura 17.

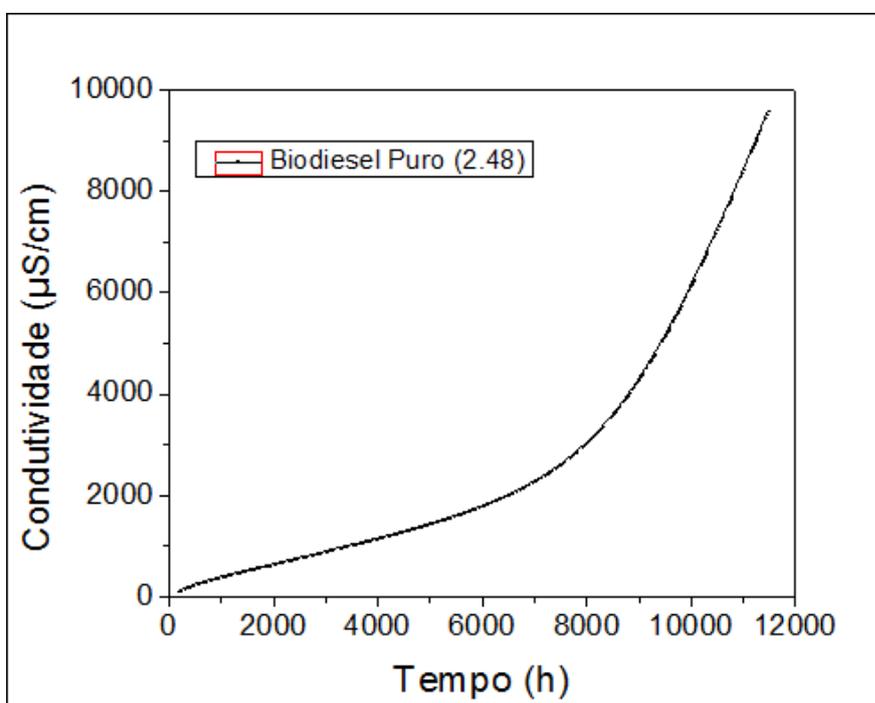


Figura 17 - Gráfico da condutividade em função do tempo, da avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel comercial (controle) sem adição de antioxidantes.

Fonte: a autora, 2019.

O PI detectado para a amostra controle, de biodiesel sem adição de qualquer composto (sintético ou natural), foi de 2h48min, valor abaixo do limite mínimo estabelecido pela Resolução no 45/2014 da ANP, que é de 8 horas. A disposição de ácidos graxos dos óleos e gorduras facilitam o aparecimento da rancidez oxidativa devido à quantidade de ácidos graxos insaturados (FERRARI;

SOUZA, 2008). Diversos pesquisadores relatam sobre a baixa estabilidade oxidativa em biocombustíveis derivados de óleos vegetais, nesse caso faz-se necessário acrescentar ao biodiesel substâncias capazes de inibir ou retardar as reações de oxidação, compostos chamados de antioxidantes sejam esses sintéticos ou naturais.

A figura 18 expõe o PI de indução encontrado para o biodiesel com adição de BHA e BHT, sendo obtido um tempo de indução de 6,79 e 6,71 horas, respectivamente. Embora do período de indução não tenha atingido o estabelecido pela ANP, de 8 horas, ainda sim ambos demonstraram-se um período relativamente alto e eficiente. O BHA possui propriedades similares ao BHT, esse fato corrobora para explicar os tempos indução próximo.

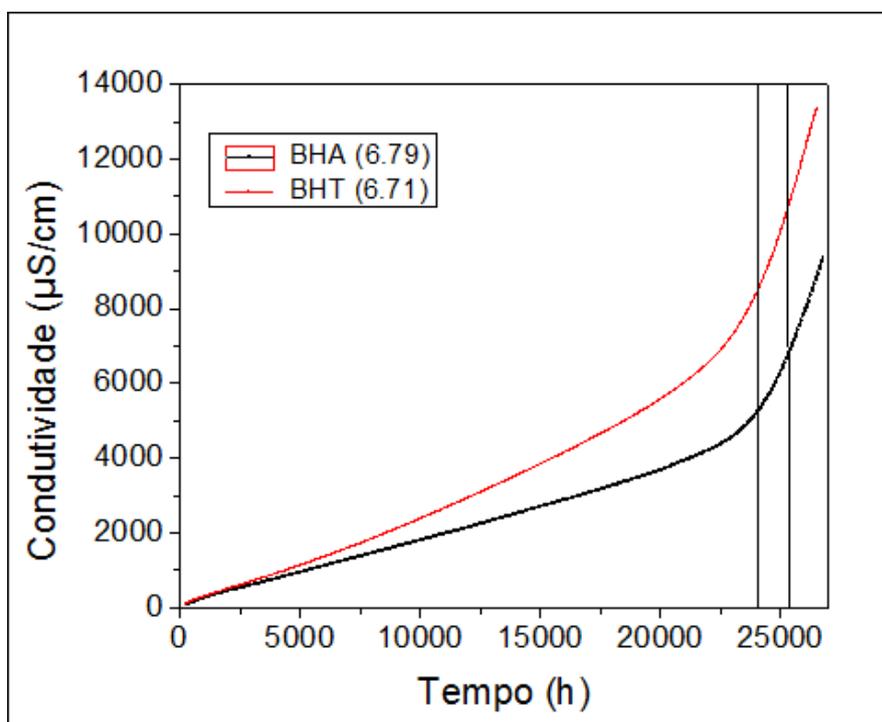


Figura 18 - Gráfico que indica o tempo de indução do biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT.

Fonte: a autora, 2019.

A influência de antioxidantes na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel, utilizando o método Rancimat para avaliação, foi relatada por diversos autores, como Mittelbach e Schober (2003) que analisaram a estabilidade do biodiesel de canola, girassol, soja, fritura e sebo animal, acrescidos de 1000 ppm dos

antioxidantes BHT e BHA, comprovando que quando acrescidos esses antioxidantes há o aumento no PI dos biodieseis.

O efeito da concentração do antioxidante sobre a taxa de auto-oxidação do biodiesel depende de muitos fatores, dentre eles, a estrutura do antioxidante, condições de armazenamento, bem como, a natureza e composição da amostra a ser oxidada (FATTAH *et al.*, 2014). Liang *et al.*, (2006), Domingos *et al.*, (2007), De Guzman *et al* (2009), Ferrari e Souza (2009) utilizaram os antioxidantes BHA e BHT em diferentes concentrações nos biodieseis e descreveram o aumento da estabilidade oxidativa em todas as concentrações avaliadas quando comparadas ao biodiesel puro.

Os extratos naturais das folhas da Guaxupita foram adicionados ao biodiesel, na concentração de 1000 ppm comparando com os resultados dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT, além da Biodiesel Puro, sendo os resultados exibidos na Tabela 13. O extrato etanólico das folhas da Guaxupita foi o que apresentou o melhor resultado comparando com os demais antioxidantes naturais, antioxidantes sintéticos e também com o biodiesel puro.

Tabela 13: Tempo de indução obtido na análise Rancimat para as amostras de biodiesel aditivadas com os extratos das folhas da Guaxupita.

	Biodiesel Puro	GXET	GXAE	GXHEX	BHA	BHT
Período de indução (h)	2,48	9,02	4,48	4,20	6,79	6,71

*GXET (Guaxupita/Etanol) GXAE (Guaxupita/Acetato de Etila) e GXHEX (Guaxupita/Hexano)
 Fonte: a autora, 2019.

Para avaliar a estabilidade termo-oxidativa do biodiesel aditivado com os extratos naturais das folhas da Guaxupita, essas misturas foram analisadas de acordo com teste de oxidação acelerada pelo aparelho Rancimat na mesma concentração que os antioxidantes sintéticos foram avaliados. O extrato com o solvente etanol foi o que apresentou o maior tempo de indução (9h02min) dentro dos extratos naturais avaliados, sendo esse também, superior aos tempos de indução encontrados para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT, estando dentro

dos parâmetros de qualidade estabelecidos pela ANP. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et al.*, (2014), com o extrato alcoólico das folhas secas da erva-mate, hortelã e alecrim, comprovado por Frolich *et al.* (2017) também com extrato etanólico de Alecrim segundo Santos (2014).

Na literatura existem diversos trabalhos que relataram o uso de antioxidantes naturais na estabilidade oxidativa do biodiesel, mas não existem relatos sobre o uso do extrato das folhas da Guaxupita com essa finalidade. Witt; Baumgartner; Silva, (2018) utilizaram diferentes técnicas de extração para a casca de romã usada como aditivo antioxidante no biodiesel comercial, esses extratos apresentaram tempo de indução superior aos estabelecidos pela legislação, destacando-se o extrato obtido com extrator de gordura Goldfish com o tempo de indução foi de 11,13 horas, com concentração de 1000 ppm. Bastos *et al.*, 2013 aplicou o extrato etanólico de manjerição no biodiesel de soja e conseguiu 5,97 horas como tempo de indução.

Os pesquisadores Dunn (2005) e Roman *et al.*, (2013) mostraram que diferentes antioxidantes sintéticos ou naturais apresentam melhores desempenhos para concentrações até 1000 ppm. Entretanto, a natureza do substrato e o tipo de método utilizado para avaliar a estabilidade oxidativa influenciam nessa atividade. Em experimentos realizados por (CHEN; LUO, 2011) com o biodiesel do óleo de cártamo com diferentes antioxidantes, nas faixas de concentrações 100 e 1000 ppm, melhores desempenhos como antioxidantes naturais como o extrato etílico das folhas da mamona foram encontrados, avaliando o tempo de indução, para concentrações até 1000 ppm. Experimentos similares realizados por Xin *et al.*, (2014) com amostras de biodiesel mostraram melhor atividade do antioxidante em concentrações até 1000 ppm.

5.6 Atividade Antimicrobiana da Fermentação Alcoólica

5.6.1 Análise Microbiológica dos Caldos

De acordo com a contagem de UFC (unidades formadoras de colônias), foi possível notar que todas as amostras avaliadas tiveram contaminação bacteriana, as placas de concentração 10^{-1} de todos os Caldos avaliados apresentaram os maiores índices de unidades formadoras de colônias, sendo que esses foram considerados incontáveis, mesmo nos caldos que passaram por tratamentos físicos e químicos obtiveram altos índices de contaminação, como mostrado na Tabela 14. Nas segundas diluições das três amostras, ainda apresentaram alta contaminação, sendo que o caldo absoluto possui o maior índice de contaminação com $2,3 \times 10^7$, diminuindo para $2,2 \times 10^6$ e $1,8 \times 10^6$ aos caldos que tiveram tratamento. Amorim e Oliveira (1981) destacam que quando a contaminação bacteriana em meio fermentativo ultrapassa $1,0 \times 10^7$ células/ml, ocorre uma significativa redução do rendimento alcoólico.

Tabela 14: Contagem das placas (UFC).

Diluições	Caldo absoluto	Caldo Tratado	Caldo Fermentado
10^{-1} – UFC/mL	INC	INC	INC
10^{-2} – UFC/mL	$2,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
10^{-3} – UFC/mL	>25	>25	>25

* As placas que continham confluência de colônias foram consideradas incontáveis (INC).

Fonte: a autora, 2019.

Segundo Ribeiro (2010), a fermentação alcoólica é um procedimento biológico comum a todos os substratos açucarados, no qual estes são transformados em etanol e dióxido de carbono. A composição do caldo é excelente substrato para o crescimento e desenvolvimento de culturas contaminantes.

Para Rossell (2008), uma das condições para esses altos índices de contaminação pode ser devido a qualidade da água de diluição do mosto.

Normalmente as destilarias captam águas de superfície com teores variáveis de matéria em suspensão, colóides e uma flora microbiológica diversificada. O tratamento desta água nem sempre é conduzido de forma adequada. Relativamente, o custo do processo de depuração da água é baixo e a relação custo benefício do tratamento da água para utilização na fermentação não tem sido quantificada, uma vez que, parte dos contaminantes é introduzida por esta via na fermentação.

Para Gallo (1990), o primeiro cuidado como controle para evitar a contaminação bacteriana de processos fermentativos em produção de etanol, começa ainda no campo. Uma matéria-prima muito contaminada aliada a problemas de eficiência no tratamento do caldo levam um grande número de microrganismos contaminantes e nos produtos de seus metabólitos para o processo fermentativo. As próprias condições de cada etapa do processo de produção de etanol favorecem a seleção e o desenvolvimento de microrganismos, sendo que, a contaminação está sujeita desde o campo, até a etapa final de fermentação.

Ainda, neste sentido Ceballos-Schiavone (2009) relata que a presença de contaminantes na fermentação resulta em sério prejuízo para as leveduras, refletindo diretamente na produtividade e no rendimento final. Sendo que, os maiores prejuízos causados por essa contaminação é a degradação da sacarose e a produção de ácidos orgânicos, que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras.

A coloração de Gram tem como alvo corar os microrganismos para diferenciá-los através de cores quando observados através do microscópio óptico. As bactérias que adquirem a coloração azul violeta são chamadas de Gram-positivas e aquelas que adquirem a coloração vermelho são chamadas de Gram-negativas. A técnica tem importância uma vez que muitas das bactérias causam diversos prejuízos industriais, principalmente devido as substâncias tóxicas que elas produzem, acarretando perda na produtividade, assim podendo ser prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. Possibilitando a escolha do produto para inibi-las ou elimina-las de

acordo com o mecanismo de ação frente a sua parede celular. Além do mais, é útil para determinar a forma (cocos e bacilos), e o arranjo das células após a divisão celular.

Após as análises da coloração de Gram, foi possível observar que predominaram as colônias de bactérias em forma de bacilos Gram-positivas em todas as placas de todos os caldos avaliados (Tabela 15). Segundo o levantamento de população microbiológica desenvolvido por Gallo (1990), para dornas de fermentação a uma predominância de 98,52% de bactérias do grupo Gram positivo sendo na sua maioria do gênero *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%).

Tabela 15: Aspectos das colônias e coloração de Gram.

	Aspectos das colônias	Gram
Caldo Absoluto	Bacilos e cocos	+
Caldo Tratado	Bacilos	+
Caldo Fermentado	Bacilos	+

Fonte: a autora, 2019.

Entre os problemas causados pela contaminação bacteriana, destaca-se a floculação do fermento. Neste caso, ocorre a aglomeração das células de leveduras, formando flocos causando a diminuição da produção de etanol, reduzindo a conversão de açúcar, aumentando a acidez do meio, além de diminuir a eficiência nos processos de centrifugação. Este último, ainda contribui para o aumento da recirculação de bactérias entre as bateladas, devido estas estarem aderidas entre os flocos e retornarem para a cuba de tratamento (RIBEIRO, 2010).

Para reduzir esses contaminantes são utilizados antibióticos sintéticos, que possuem propriedades bactericidas ou bacteriostáticas desinfetantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). No entanto o uso ininterrupto desses produtos sintéticos facilita o desenvolvimento de linhagens cada vez mais resistentes e de difícil controle, além de aumentarem o custo da produção. O uso de produtos naturais que apresentem ação bactericida ou bacteriostática pode ser usado como alternativa de desinfetantes, quando incorporada na água de higienização como

pré-tratamento da cana-de-açúcar, pode inibir a proliferação desses microrganismos, ou também podem ser usados na etapa de tratamento do mosto, o que diminui o desenvolvimento dessa microflora, fazendo com que a qualidade desse caldo seja mantida, garantindo a eficiência da fermentação (BREGAGNOLI, 2006).

Os extratos naturais estão sendo empregados com amplo sucesso tanto no controle de microrganismos contaminantes da fermentação do etanol por serem uma alternativa segura, eficaz e de baixo custo (BERTUCCI, 2009).

5.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Classificação dos extratos naturais

Os extratos das folhas da Guaxupita se mostram eficientes na inibição de diferentes tipos de bactérias. O extrato em que foi usado o acetato de etila como solvente apresentou inibição em todas as bactérias testadas com a CIM de 20 mg/mL (tabela 16). Além disso, o extrato hexânico foi o que apresentou a menor concentração frente às cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Tabela 16: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos extratos das folhas de Guaxupita.

Microrganismos	Extratos		
	Etanólico	Acetato de etila	Hexânico
<i>S. aureus</i>	40	20	10
<i>P. aeruginosa</i>	80	20	10
<i>E. coli</i>	-	20	-
<i>S. epidermidis</i>	80	20	-
<i>B. cereus</i>	-	20	-
<i>L. casei</i>	-	20	-
<i>S. pyogenes</i>	160	20	-

Fonte: a autora, 2019.

Analisando a riqueza de constituintes presentes em plantas, a atividade antimicrobiana positiva dos todos os extratos das folhas de Guaxupita frente a amostras de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, pode ser devido à presença de compostos como taninos (compostos polifenólicos) e flavonoides previamente

encontrados na planta, uma vez que estes compostos têm comprovada ação antimicrobiana, e que compostos fenólicos possuem uma ação inespecífica sobre o microrganismo, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma (HASLAM, 1995; JORGE *et al.*, 1996, AKINPELU, 2001).

Na tabela 17 verifica-se que o extrato etanólico das folhas da Sabugueira não apresentou atividade frente a nenhum dos microrganismos testado. No entanto, o extrato Hexânico foi o que apresentou a menor CIM, com 5 mg/mL frente a bactéria *Lactobacillus casei*. O extrato usando Acetato de Etila foi o que apresentou maior eficiência frente aos microrganismos testados, inibindo o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* com a CIM de 40 mg/mL variando a concentração apenas frente à *Streptococcus pyogenes* que apresentou CIM de 160 mg/mL.

As folhas do Sabugueiro apresentam alcaloides como um dos seus compostos secundários. Segundo Sawyer *et al.*, (2005), alguns alcaloides inibem a ação de bactérias causando lise celular e mudanças morfológicas. Contudo, a atividade antimicrobiana pode ter outro mecanismo de ação uma vez que o composto é conhecido por ser inibidor de síntese de DNA através da inibição da topoisomerase (GUITTAT *et al.*, 2003).

Tabela 17: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos extratos das folhas do Sabugueiro.

Microrganismos	Extratos		
	Etanólico	Acetato de etila	Hexânico
<i>S. aureus</i>	-	40	20
<i>P. aeruginosa</i>	-	40	20
<i>E. coli</i>	-	40	20
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	40	5
<i>S. pyogenes</i>	-	160	-

Fonte: a autora, 2019.

Resultados de Concentração Inibitória Mínima para extratos de folhas do Abacateiro preparados com os solventes acetato de etila e hexano frente às

bactérias *L. casei* apresentaram a menor CIM dentre os extratos testados, com 1,25 mg/mL. No entanto, o extraído com acetato de etila não apresentou mais atividades frente às outras cepas testadas. Já o extrato hexânico apresentou inibição apenas nas bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, ambas com a CIM de 20 mg/mL, os demais microrganismos não houve inibição. O extrato etanólico não inibiu nenhuma das cepas analisadas (tabela 18).

Tabela 18: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) dos extratos das folhas do Abacateiro.

Microrganismos	Extrato		
	Etanólico	Acetato de etila	Hexânico
<i>S. aureus</i>	-	-	20
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	20
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	1,25	1,25
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-

Fonte: a autora, 2019.

Oliveira *et al.*, (2009) afirmaram que a presença de taninos, alcaloides e flavonoides, sendo compostos que podem atuar tanto na parede como na membrana das bactérias.

A resistência aos antimicrobianos tem despertado uma preocupação mundial, principalmente na busca contínua de novos antimicrobianos naturais. O aumento de cepas resistentes a vários antimicrobianos tem se tornado comum, por isso o uso de extratos naturais têm-se mostrado como uma alternativa segura e barata para substituição dos sintéticos (SAWER, 2005).

A tabela 19 classifica a atividade dos extratos das folhas da Guaxupita como bactericida e bacteriostática. Assim como observado, os extratos apresentaram efeito bacteriostático.

Tabela 19: Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática dos extratos das folhas de Guaxupita.

Microrganismos	Extratos Guaxupita	Concentração (mg/mL)	Atividade
<i>S. aureus</i>	Etanólico	≥ 40	Bacteriostático
	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
	Hexânico	≥ 10	Bacteriostático
<i>P. aeruginosa</i>	Etanólico	≥ 80	Bacteriostático
	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
	Hexânico	≥ 10	Bacteriostático
<i>E. coli</i>	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
<i>S. epidermidis</i>	Etanólico	≥ 80	Bacteriostático
	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
<i>B. cereus</i>	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
<i>L. casei</i>	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
<i>S. pyogenes</i>	Acetato de etila	≥ 20	Bacteriostático
	Etanólico	≥ 160	Bacteriostático

Fonte: a autora, 2019.

Frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *L. casei* apenas os extratos hexânicos e acetato de etila das folhas do Sabugueiro apresentaram atividades bacteriostáticas como ilustrado na tabela 20.

Tabela 20: Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática dos extratos das folhas de Sabugueiro.

Microrganismos	Extratos Sabugueiro	Concentração (mg/mL)	Atividade
<i>S. aureus</i>	Hexânico	≥ 20	Bacteriostática
	Acetato de Etila	≥ 40	Bacteriostática
<i>P.aeruginosa</i>	Hexânico	≥ 20	Bacteriostática
	Acetato de Etila	≥ 40	Bacteriostática
<i>E. coli</i>	Hexânico	≥ 20	Bacteriostática
	Acetato de Etila	≥ 40	Bacteriostática
<i>L. casei</i>	Hexânico	≥ 5	Bacteriostática
	Acetato de Etila	≥ 40	Bacteriostática
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Acetato de Etila	160	Bacteriostática

Fonte: a autora, 2019.

Efeito bactericida e bacteriostático de extratos de folhas de Abacateiro preparados com os solventes acetato de etila e hexano frente às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentaram efeitos bacteriostático. Enquanto frente a *L.*

casei apresentaram ação bactericida com a menor CIM de 1,25 mg/mL como mostrado na tabela 21.

Com o propósito de se constatar ação terapêutica antimicrobiana de outras partes do Abacateiro Silva *et al.*, (2002) verificou que extrato obtido a partir da casca do caule foi capaz de inibir o crescimento bacteriano do *L. casei*, e tal fato pôde ser observado dentre os resultados apresentados. Com relação ao extrato hexânico das folhas do abacateiro Amendola *et al.*, (2015) apresentou resultados eficientes contra a cepa de *S. aureus*.

Tabela 21: Determinação da Atividade Bactericida e Bacteriostática dos extratos das folhas de Abacateiro.

Microrganismos	Extratos Abacateiro	Concentração (mg/L)	Atividade
<i>S. aureus</i>	Hexano	≥ 20	Bacteriostático
<i>P. aeruginosa</i>	Hexano	≥ 20	Bacteriostático
<i>L. casei</i>	Acetato de etila	≥ 1,25	Bactericida
<i>L. casei</i>	Hexano	≥ 1,25	Bactericida

Fonte: a autora, 2018.

Como mostrado às folhas da Guaxupita, Sabugueiro e do Abacateiro são ricas em taninos. De acordo com Simões (2003), a atividade antimicrobiana apresentada por algumas plantas está diretamente relacionada à presença de taninos, possuindo também caráter bacteriostático. Segundo o Cordeiro (2014), os taninos são substâncias fenólicas complexas de origem vegetal, que apresentam excelente atividade antimicrobiana, são muito utilizados no curtimento de couros e na fabricação de medicamentos.

Gonçalves *et al.*, (2005) em pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de algumas árvores nativas do Brasil, observaram uma excelente atividade bacteriostática do extrato alcoólico de jurema preta sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. Com o mesmo objetivo Cordeiro (2014), avaliou a atividade bacteriostática e bactericida dos extratos das folhas do Caroá, Amburana, Jatobá, Jurema-preta, Angico-de-bezerro e Pereiro-de-tinta sobre *Staphylococcus* spp. Este observou que o extrato de Jurema-preta apresentou

ação bacteriostática em todos os 60 isolados de *Staphylococcus* spp., destacando-se dos demais extratos.

Em estudos realizados por Silva *et al.* (2012), que avaliaram a atividade de plantas ricas em taninos nativas da Caatinga apresentaram uma notável atividade antimicrobiana (bacteriostáticas), atuando sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas males por apresentar um amplo espectro de ação, o que foi observado nos extratos destas plantas por Oliveira-Júnior *et al.*, (2012) os quais testaram extrato etanólico e hexânico das Rosas do deserto e por Figueiredo *et al.*, (2013) que verificou a ação do extrato etanólico *Amburana cearensis* e *Anadenanthera macrocarpa* sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de referência e multirresistentes.

O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais do ambiente fermentativo, formando uma capa protetora, inibindo enzimas, causando a ruptura da membrana plasmática bacteriana, e também, privando o substrato microbiano por formar um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos (HASLAM, 1996; RODRIGUES *et al.*, 2014).

O controle da contaminação bacteriana com agentes bacteriostáticos e bactericidas no processo de fermentação alcoólica é fundamental para assegurar resultados positivos na produção de etanol. Ambos agentes são competentes na eliminação ou inibição de microrganismos, uma vez que, o objetivo é diminuir a carga bacteriana presentes no fermentado, o garante a eficiência do processo e a qualidade do produto final.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho foi desenvolvido para avaliar os extratos naturais como possíveis substituintes dos produtos sintéticos, tanto como antioxidantes no biodiesel quanto como antimicrobianos na fermentação alcóolica para a produção do etanol.

Com relação à estabilidade oxidativa dos extratos naturais aditivados no biodiesel obtidos através do método DSC, mostrou-se mais eficiente o extrato das folhas da Guaxupita obtido com o solvente etanol. Sendo confirmado pelo método Rancimat, em que o extrato da Guaxupita, com solvente etanol, apresentou tempo de estabilidade oxidativa de 9h02min, superior ao estabelecido pela ANP que determina tempo mínimo de 8 horas e ainda superiores ao biodiesel aditivado com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT de 6,79 e 6,71 horas, respectivamente.

Assim, conclui-se que as folhas das Guaxupita podem ser utilizadas para obtenção de extratos com atividade antioxidante, uma vez que verificou-se o aumento da estabilidade oxidativa do biodiesel aditivados com os extratos, desta forma sendo considerado um possível substituinte dos antioxidantes sintéticos.

A partir dos testes preliminares com a finalidade de aumentar a qualidade da fermentação alcoólica, foi possível verificar que as bactérias Gram-positivas são as bactérias de maior ocorrência no processo fermentativo, sendo que, níveis de contaminação foram superiores a 10^7 UFL/mL, resultado esse que acarreta a prejuízos significativos, podendo ocasionar queda no rendimento fermentativo, dificuldades operacionais e aumento do consumo de ácido e antibiótico, elevando o custo de produção.

Os extratos naturais testados mostraram-se eficientes inibindo a maioria dos microrganismos testados, principalmente os extratos obtidos com as folhas da Guaxupita que se mostrou eficiente em todos os microrganismos testados, tendo ação bacteriostática. No entanto, os extratos das folhas do Abacateiro extraídos com os solventes acetato de etila e hexano apresentaram a menor CIM de 1,25 mg/mL frente a bactéria *L. casei*, sendo os únicos com ação bactericida.

Sendo assim, os extratos naturais apresentam alta capacidade para serem usados como substituintes dos antimicrobianos sintéticos, por manter o rendimento fermentativo elevado com baixo custo do tratamento. No entanto, tornam-se necessários mais testes para essa finalidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

AKINPELU, D. A. **Antimicrobial activity of Anacardium occidentale bark**. Fitoterapia v. 72, p. 286-287, 2001.

ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; AZEVEDO, D.C.S.; CAVALCANTE J. R., C. L.; FIRMIANO, L. R.; PARENTE JR., E. J. S. Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. **Renewable Energy**, v. 34, p. 857-859, 2009.

ALCARDE, A. R. **Processamento da cana-de-açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Brasília – DF, 2007.

ALCARDE, A. R.; HORII, J.; NOBREI, T. P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, 2007.

ALMEIDA, S. G.; PETERSEN, P.; CORDEIRO, A. **Crise sociambiental e conversão ecológica da agricultura brasileira: subsídios à formação de diretrizes ambientais para o desenvolvimento agrícola**. Ed.: AS-PTA. Rio de Janeiro, p. 1-122. 2001.

ALPTEKIN, E.; CANAKC, M. Determination of the density and the viscositie of biodieseldiesel fuel blends. **Renewable Energy**, v. 33, p. 2623-2630, 2008.

ALTERTHUM, F. et al. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.

AMENDOLA, I. **Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato glicólico de Hamamelis virginiana Linnaeus**. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2015.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA A. J. **Infecção na fermentação: como evitá-la**. Açúcar e Álcool, v. 5, p. 12-18, 1982.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Produção e fornecimento de biocombustíveis**. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis>>. Acesso em: 30 de maio de 2017.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis: produção e consumo seguem em alta no País**. 2018. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/outras-noticias/-/asset_publisher/32hLrOzMKwWb/content/biocombustiveis-producao-e-consumo-seguem-em-alta-no-pais>. Acesso em: 05 de dezembro de 2018.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel**. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2018.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 48 suppl. S1, p. 5-16, 2001.

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.

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 Thermochemica 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.

BADIN, F. Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p. 1-47, 2010.

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

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

BARROS, F. M. C. Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais

constituintes do óleo essencial de Lippia Alba (MILL.) N. E. Brown. **Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal de Santa Maria, p. 1-162, 2008.

BERTUCCII, A. et al. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n.1, 2009.

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

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: Bndes, 2008. 316 p. DC, 2007. Disponível em: <<http://www.cei.org/pdf/5774.pdf>>. Acesso em: 06 dezembro 2019.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2001. 143 p.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chem.** p. 209–215, 1999.

BORA, P. S.; NARAIN, N.; ROCHA, R. V. M.; PAULO, M. Q. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. **Grasas y Aceites**. v. 52. p. 171-174, 2001.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de Baccharis trimera (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Rev Bras Farmacogn.** p. 63-67, 2002.

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. **Química Nova**, v. 33, 1726-1731, (2010).

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.

BUTROW ANN B. e SEYLER, R. J., Vapor Pressure by DSC: extending ASTM E 1782 below 5 kPa. **Thermochimica Acta**, 402 (2003) 145 – 152.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional**. Rio de Janeiro: Epe, 2018. 292 p.

BRASIL. Ministério da Educação. **Biodiesel**. Brasília: Ideal, 2006. 30 p.
BRASIL. Ministério das Relações Exteriores. Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas. Ministério das Relações Exteriores. Brasília: Embrapa. 60-75. 2003.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Antibióticos**. 1º ed., São Paulo, 2011.

BASILE, A.; VUOTTO, M.L.; VIOLANTE, U.; SORBO, S.; MARTONE, G.; ASTALDOCIOBIANCHI, R. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.8, p.199-203, 1997.

BRAY, J. C.; FERREIRA, E. R.; RUAS, D. G. G. **As políticas da agroindústria canaveira e o Proálcool no Brasil**. São Paulo: Unesp-Marília-Publicações, 2000.

BRAGA, T.V.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, J.T.; DORES, R.G.R.; NAGEM, T.J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, p. 287-290. 2007.

BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p. 1-47, 2006.

BRUNNER, G. Gas extraction : an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes . **New York : Springer, 1994**.

CABRAL, J. B.G; MURPHY, C. C.; A fuel cell. O meio ambiente e seu carro. Disponível em: < <http://www.h2brasil.com/parte-2/2-3-2>>. Acesso em: 3 dezembro de 2018.

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.

CÂMARA, G. M. S. **Biodiesel Brasil** - estado atual da arte. 2006. 26 p. Disponível em:<www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil.pdf>. Acesso em: 18 de dezembro de 2018.

CEBALLOS SCHIAVONE, C. A. D. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando à redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p. 177, 2009.

CORDEIRO, J. C. P. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella* spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco**. Dissertação (Ciência Animal). Universidade Federal do Vale do São Francisco UNIVASF, Petrolina – PE. 2014.

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.

CLARK, N. A. Surface memory effects in liquid crystals: Influence of surface composition. **Physical Review Letter**, v.55, p. 292-295, 1985.

CHEN, Y. H.; LUO, Y. M. Oxidation stability of biodiesel derived from free fatty acids associated with kinetics of antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n.7, p. 1387-1393, 2011.

CHOI, J.; LEE, H.; CHOI, Y.; KIM, S.; LEE, S.; LEE, S.; CHOI, W.; LEE, J. Heterogeneous photocatalytic treatment of pharmaceutical micropollutants: Effects of wastewater effluent matrix and catalyst modifications. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 147, p. 8-16, 2014.

DANTAS, M. B. Obtenção, caracterização e estudo termoanalítico de biodiesel de milho. 2006. 133 p. **Dissertação Mestrado em Química analítica**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

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.

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.

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.

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.

DURÃES, F. O. M. Sorgo sacarino pode reforçar produção de etanol no Brasil. **Informativo da Embrapa Agroenergia**. v.25, p.8-10. 2011.

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

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Ed. Manole, 2001.

FATTAH, I. M. R.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; HAZRAT, M. A.; MASUM, B. M.; IMTENAN, S.; ASHRAFUL, A. M.; Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Vol. 30, 356–370, 2014.

FERMENTEC S/C LTDA. **Processo de Fabricação de álcool**. Piracicaba, SP, 108 p. 2008.

FERNANDES, A. T. **Atividade farmacológica dos extratos obtidos da *Plathymenia reticulata* Benth (leguminosae)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas pela Universidade de Campinas, 2002.

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.

FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F.; TORRES, C. M.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C.; SILVA J. M.; SANTOS, F. A.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M.; COLARES, A. V., COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D.; MENEZES, I. R.; SILVA, J. C.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R.; MATIAS, E. F. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan. **Bio Med Research International**, v. 2013, p. 1- 5, 2013.

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.

FURTADO, A. A crise energética mundial e o Brasil. **Novos Estudos**, São Paulo, n. 11, p. 17-29, 1985.

FURTADO, N. M.; ALCARDE, W. E. **Floculação de leveduras: Estudo do comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em processo de fermentação alcoólica.** UNIMEP – Piracicaba, 2010.

FLORASBS. ***Esenbeckia grandiflora*** (Pau-de-cutia). Disponível em: <<https://sites.google.com/site/florasbs/rutaceae/pau-de-cutia>>. Acesso em: 22 setembro de 2018.

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

FREDERICK, M. K. B. Estudo genético, fisiológico e molecular de *Lactobacillus fermentum* envolvidos na floculação de leveduras. Campinas. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 56, 1994.

FROLICH, P. C., PLIACEKOS, M. R., WITT, E. P., SILVA, E. A. **Avaliação de aditivos naturais na estabilidade oxidativa do biodiesel de óleo de soja.** In Anais do VIII Simpósio de Análise Térmica, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. 2017.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1989.

GARCIA, M. J. A.; LUQUE, C. M. D.; VALCARCEL, M. Factors affecting the gravimetric determination of the oxidative stability of oils. **Journal of the American oil Chemists' Society**, 70p, 1993.

GERPEN, J. V. Biodiesel Processing and Production. *Fuel Process Technology*, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

GERIS, R. et.al. **Biodiesel de Soja – Reação de Transesterificação para Aulas Práticas de Química Orgânica.** *Química Nova*, vol.30, n. 5, p. 1369-1373, maio 2007.

GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; J. BRAZ. *Chem. Soc.* 2005, 16, 1396. MONTEIRO, J. M. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

GOETTEMOELLER, J., GOETTEMOLLER, A. **Sustainable ethanol.** Prairie Oak Publishing, Maryville, Missouri. 2007.

GOLDEMBERG, J. E MACEDO, I. Brazilian Alcohol Program: na overview. **Energy for Sustainable Development**, v.1, n. 1, p. 17-22, 1994.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GOYAL, A. K.; MIDDHA, S. K.; SEN, A. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, Volume 1, Issue 1, October-December, 2010.

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.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.42, p.712 – 725. 2015.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HASLAM, E. Natural polyfenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **J Nat Prod** v. 59, p. 205-215, 1995.

HIRASAWA, M.; SHIMURA, K.; SHIMIZU, A.; MURA, K.; TOKUE, C.; ARAI, S. Quantification and Functional Analysis of Dietary Fiber and Polyphenols in Avocado. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**. v. 55, n. 3, p. 95 -101, 2008

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução a microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de casos**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 776 p.

IONASHIRO, M. G. **Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz. 2004.

IVANOVIC, J.; ZIZOVIC, I.; RISTIC, M.; STAMENIC, M.; SKALA, D. The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction. **J. of Supercritical Fluids**. V. 55, 983–991, 2011.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. 1996. Lipid oxidation in biological and food systems. In Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. (Eds.), **Food Antioxidants**. Marcel Dekker: New York, p. 58-69. 1996. D.K. (Eds.), **Food Antioxidants**. Marcel Dekker: New York, 1996, p. 58-69.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Renewable and Sustainable Energy Reviews. **Review Elsevier**, v. 14, p. 667-678, 2010.

JANUARIO, A. H.; VIEIRA, C. P.; SILVA, F. G. F. M.; FERNANDESNA, B. J.; SOUSA, F. B.; Alcaloides β -indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* mart. (Rutaceae). **Química Nova**, Maceió, v.32, n.8, p. 2034-2038, 2009.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G.; **Boletim SBCTA**. v. 32, n. 40, 1998.

JORGE, L. I. F.; SILVA, G. A.; FERRO, V. O. Diagnose laboratorial dos frutos de *Anacardium occidentale* L. (caju). **Rev Bras Farmacogn**. v.5, n.10, p. 55-69, 1996.

JÚNIOR, O. V. M., THOMAZ, K. T. C., BASTOS, R. R. C., PONTES, R. G., BITTENCOURT, J. A., PARDAUIL, J. J. R., COSTA, C. E. F. (2013). **Avaliação da estabilidade oxidativa de blends de biodieseis pelo método Rancimat e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**. In Anais do 5º Congresso Norte-Nordeste de Química, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

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

KAUSHIK, N.; KUMAR, K.; KUMAR, S.; Biobased Materials and Bioenergy. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 1, n. 3, p. 301-314. 2007.

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.

LIMA J. R. O.; SILVA R. B.; SILVA C. M. Biodiesel de babaçu (*Orgignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, p.600-608, 2007.

LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Blucher, 2001. cap. 1, p. 1-40, v.3.

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

LORENZI, H.; **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUCCA, P.S.R. ECKERT, R.G.; SMANHOTTO, V.; KUHN, L.M.; MINANTI, L.R.; Avaliação farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal camomila (*Chamomilla recutita* L.) comercializada como alimento em Cascavel - Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.2, p. 153-156, 2010.

MA, F.; HANNA, M. A.; Biodiesel Production: a review. **Bioresource Technology**, Lincoln (NE, USA), p. 1-13. 1999.

MACIEL, M. A. M.; VEIGA, V. J. F.; PINTO, C. A.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 10. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2003.

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.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Mapa nº 143, de 27 de janeiro de 2007. **Mistura Carburante** (etanol Anidro - Gasolina). MASSAFERA, G.; BRAGA COSTA, T. M.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Composição de ácidos graxos do óleo do mesocarpo e da semente de cultivares de abacate (*Persea americana* Mill.) da região de ribeirão preto, SP. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 21, n. 2, p. 325-331, 2010.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. Bioenergia da cana. In: SANTOS, F. A.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Etanol**. Tecnologias e Perspectivas. 2. ed. Revisada e ampliada. – Viçosa, MG, 2012. p. 547-577.

MEDINA, J. C., BLEINROTH, E. M., TANGO, J. S.; CANTO, W. L. **Abacate: da cultura ao processamento e comercialização**. Campinas: ITAL. p.212, 1978.

MIDDLETON JR., C. KANDASWAMI, T.C. THEOHARIDES. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and câncer. **Pharmacol. Revs.**, v. 52, pp. 673-751, 2000.

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

MOREIRA, A. L., ALMEIDA, R. J. A., SCABBIA, R. J. A., TEIXEIRA, R. R. P. **Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar**. *Biológico*, São Paulo, v.71, n.1, p. 69-76, Jan./Jun., 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.

MÜLLER, C.; MARTINI, F.; MEDINA, R.; **A Evolução e os Microrganismos**. 1. ed. Museu de Ciências e Tecnologia – PUCRS, Porto Alegre, 2010. 6 p.

MURRAY, P. R.; PFALLER, M. A.; ROSENTHAL, K. S.; **Microbiologia Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2010. 960 p.

MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. In: WORKSHOP SOBRE “PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DE MATÉRIAPRIMA”, 2008. Lorena. **Anais**. Lorena, 2008. p. 9-10. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/position_paper_painel2_marcia.pdf>. Acesso em: 07 novembro 2018.

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

NAWAR, W. W. Em Lipids; Fennema, O. R., ed.; **Marcel Dekker**: New York, 1985, p. 139.

NCCLS. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada** – Oitava Edição. v. 23, n. 1, 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf.

NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.471-537, 2007.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R.; Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 20-25, 2007.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.;

OLIVEIRA, R. S. **Avaliação da ação antioxidante de produtos naturais no biodiesel B100 (GLYCINE MAX)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2012, 72 p.

OLIVEIRA, É. C. L. **Estudo da capacidade antioxidante de novos materiais aplicados a lubrificante**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Departamento de Engenharia Química ANP-PHR-14- Programa de Recursos Humanos, Natal, 2004.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1995.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, M. T.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de

plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v.18, n.2, p. 301-307, 2008.

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

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. São Paulo: Ideal, 2003. 66 p.

PEARSON, D.; **The Chemical Analysis of Foods**, 1977.

PELCZAR, M. J; CHANG, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**, v.2, 2 ed.. São Paulo: Makron Books, 1997.

PEREIRA, T.C.G.; *et al.* **Energias renováveis: políticas públicas e planejamento energético**. Curitiba. Editora da COPEL, 2014. 303 p.

PIMENTA, G. G.; OLIVEIRA, L. R. R. **Produção de etanol**. FACIT Faculdade de Ciência e Tecnologia de Montes Claros. Montes Claros - MG. Outubro, 2010.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v.85, p.267-273, 2004.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

PIRANI, J.R. **Esenbeckia in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 1. ed. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 121 p.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Indicadores Econômicos FEE**, Porto Alegre, v.30, n.2, p.179-190, 2002. Disponível em:<<http://revistas.fee.tche.br/index.php/indicadores/article/view/1396/1758>> Acesso em dezembro de 2018.

POIROT, R.; PRAT, L.; GOURDON, G.; DIARD, C.; AUTRET, J. M. Fast Batch to Continuous Solid-Liquid Extraction from Plants in Continuous Industrial Extractor. Chemical. **Engineering Technology**, v.29, n.1, p.46–51, 2006.

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.

RABELO, I. D. **Estudo de desempenho de combustíveis convencionais associados a biodiesel obtido pela transesterificação de óleo usado em**

fritura. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2001, 99 p.

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

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.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p.755-760, 2006.

RAMOS, P. R.; WILHELM, H. M. **Current status of biodiesel development in Brazil**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 123, p. 807-819, march. 2005.

RAMOS, L. P. *et.al.* **Biodiesel**: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, vol.31, p. 28-37, maio 2003.

REESE, R. E.; BETTS, R. F.; GUMUSTOP, B. **Manual de Antibióticos**. 3^o ed. Medsi, São Paulo, 2002.

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 Agronômica**, v.44, p.512-519, 2013.

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

RFA. **Ethanol industry statistics**. 2014. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. Acessado em 06 de dezembro de 2018.

RIBEIRO, E. J. Fermentação Alcoólica. Uberaba, 2010. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. FAZU. RIBEIRO, F. A. M. **Álcool e açúcar**: uma via de mão dupla. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). Álcool combustível – série indústria em perspectiva. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, p. 48- 57, 2008.

ROLIM, M.V.; NOVAIS, R.F.; NUNES, F.N. & ALVARES V., V.H. Efeito da moagem do solo no teor de fósforo disponível por Mehlich-1, resina em esferas e em lâminas. **R. Bras. Ciência do Solo**, 32:1181-1190, 2008.

ROSSELL, C. E. V. **Qualidade da matéria-prima**. In: Workshop sobre “Produção de etanol: qualidade da matéria-prima”. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas Lorena – SP, 2008.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J.** v. 19, p. 200-206. 2000.

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

SANTOS, A. C. C. **Análise da estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de soja na presença de antioxidantes naturais obtidos por diferentes técnicas de extração.** Tese Mestrado em Bioenergia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo. 2014.

SANTOS, R. C. **Produção de etanol anidro: aspectos técnico-operacionais e econômicos para exportação.** Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010.

SALLET, C. L. **Os biocombustíveis no Brasil e a relação entre os mercados agrícolas e de energia.** Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, 2011, 82 p.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. R. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SHAIID, E. M.; JAMAL Y. A review of biodiesel as vehicular fuel. *Renew Energy Rev.*, v.12, p. 2484-2494, 2008.

SHAHBAZ, K.; MJALLI, F. S.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. Using Deep Eutectic Solvents Based on Methyl Triphenyl Phosphonium Bromide for the Removal of Glycerol from Palm-Oil-Based Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 6, p. 2671-2678, 2011.

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

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. **Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível.** *Ciência Rural*, vol.38, n. 3, p. 843-851, maio 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, R. P.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010. 1102 p.

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

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.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, 2004.

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.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TOSETTO, G. M. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 1-147, 2002.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 576 p.

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

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Produção e Uso do Etanol Combustível no Brasil: respostas às questões mais frequentes**. São Paulo: UNICA, 2007. 70 p. Disponível em: <
http://www.ie.ufrj.br/infosucro/biblioteca/bic_Unica_ProducaoUsoEtanol.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2013.

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.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163. 2004.

VEIGA, V. J. F.; PINTO, C. A.; MACIEL, M. A. M.; Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: VILA NOVA, M. X. **Análise das leveduras do mosto da fermentação alcoólica de alambiques artesanais produtores de cachaça em Pernambuco**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

VUOTTO, M.L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; IELPO, M.T.L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.197-201, 2000.

WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

WENDLANDT, W. W.; **Thermal Analysis**, 3 ed., Wiley: Nova Iorque, 1986, p. 213-460.

WITT, E. P.; BAUMGARTNER, T. R. S.; SILVA, E. A. **Avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel (b100) comercial na presença de antioxidantes naturais da casca de romã**. 2018. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioenergia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.

WONGKITTIPONG, R.; PRAT, L.; DAMRONGLERD, S.; GOURDON, C. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v.40, p.147-154, 2004.

XIN, X. *et al.* Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, 171(2):140-147, 2014.

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.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.1, p.12-16, 1991.

ZHOU, J.; XIONG, Y.; XU, S. 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.