

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

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E EFEITO ANTIOXIDANTE DE  
EXTRATOS NATURAIS COMO ADITIVOS NO BIODIESEL B100**

ANA PAULA BECKER VIANA

**TOLEDO-PR  
2020**

**ANA PAULA BECKER VIANA**

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E EFEITO ANTIOXIDANTE DE  
EXTRATOS NATURAIS COMO ADITIVOS NO BIODIESEL B100**

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

**TOLEDO-PR  
2020**

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

Viana, Ana Paula Becker  
AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E EFEITO ANTIOXIDANTE DE  
EXTRATOS NATURAIS COMO ADITIVOS NO BIODIESEL B100 / Ana  
Paula Becker Viana; orientador(a), Edson Antonio da Silva,  
2020.  
127 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e  
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia,  
2020.

1. Goldfish. 2. Rancimat. 3. Gênero Eugenia. 4.  
Antioxidantes. I. Silva, Edson Antonio da. II. Título.

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

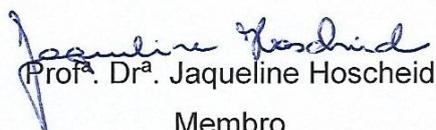
Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por ANA PAULA  
BECKER VIANA perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em  
Bioenergia em 06 de março de 2020

COMISSÃO JULGADORA



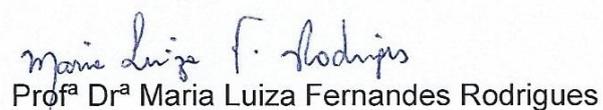
Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Orientador



Prof.ª Dr.ª Jaqueline Hoscheid

Membro



Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Fernandes Rodrigues

Membro

A Deus, por todas as oportunidades.  
Aos meus pais João e Lovani, pelo  
apoio e incentivo que me fortaleceram  
para conquistar cada uma delas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas as dádivas que conduz em minha vida. Pelo privilégio da paz, saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, João e Lovani, pelo carinho, amor e principalmente pela dedicação. Pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas e decisões. Por transformar oportunidades em vitórias, e do suor, a realização de cada sonho alcançado em minha vida.

A minha irmã Anna Júlia, pela presença e partilha diária, por me proporcionar tantos momentos alegres, iluminando meus dias.

A Sofia, pela graça e leveza que trás ao meu lar.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo afeto, incentivo, apoio e parceria.

Ao professor Dr. Edson Antonio da Silva, por ter me acolhido como orientada, dispondo de valiosa orientação. Agradeço pela paciência e por tantas contribuições para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Daniella Mariz de Souza, pelas palavras de carinho e encorajamento. Mesmo longe, sempre me ajudou a superar os momentos difíceis do mestrado.

Um agradecimento especial a doutoranda Paula Alessandra Palsikowski, que tanto me auxiliou durante as análises.

Aos meus amigos do mestrado, que compartilharam momentos únicos, fazendo dessa experiência ainda mais especial.

Aos meus amigos da vida, por tantos momentos alegres e de partilha, com palavras de força e encorajamento.

A todos os professores do Programa em Bioenergia, em especial aos docentes da Unioeste, que nos auxiliaram no decorrer do mestrado, compartilhando seus conhecimentos e experiências, qualificando-nos para exercer nossas habilidades com competência.

Aos técnicos do GERPEL e ao Fernando do laboratório de Microbiologia por cederem os espaços e equipamentos necessários para as análises.

A professora Dra Maria Elena da UEPG, por permitir a utilização do equipamento Rancimat para desenvolvimento dos testes de estabilidade oxidativa.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão desta etapa, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1	Energia.....	4
3.2	Biodiesel.....	6
3.2.1	Matérias-Primas para Produção de Biodiesel .....	7
3.2.2	Produção de Biodiesel.....	11
3.2.3	Parâmetros de Qualidade.....	15
3.3	Estabilidade Oxidativa do Biodiesel.....	17
3.3.1	Método Rancimat .....	19
3.4	Antioxidantes.....	20
3.4.1	Classificação dos antioxidantes.....	21
3.4.2	Antioxidantes Naturais.....	23
3.4.3	Antioxidantes Sintéticos .....	29
3.5	Degradação Microbiológica do Biodiesel.....	31
3.5.1	Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	33
3.6	Antimicrobianos.....	34
3.6.1	Classificação e Mecanismos de Ação .....	35
3.7	Extração de Compostos Naturais.....	37
3.8	Extração Convencional.....	38
3.8.1	Extração de Óleos e Gorduras - Goldfish.....	39
3.9	Família Myrtaceae .....	40
3.9.1	Cerejeira.....	42

3.9.2	Jambolão .....	44
3.9.3	Pitangueira .....	46
3.9.4	Pessegueiro-do-mato .....	49
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
4.1	Obtenção da matéria-prima .....	51
4.2	Preparo da matéria-prima .....	52
4.3	Caracterização da matéria-prima .....	52
4.3.1	Determinação do diâmetro médio das partículas .....	52
4.3.2	Determinação da umidade do material vegetal .....	53
4.4	Obtenção dos extratos .....	53
4.4.1	Extração convencional – Método Goldfish .....	53
4.5	Caracterização dos extratos .....	56
4.5.1	Testes fitoquímicos .....	56
4.5.2	Determinação do teor de flavonoides totais (TFC) .....	57
4.5.3	Determinação da atividade antimicrobiana pela Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	57
4.5.4	Determinação do teor de compostos fenólicos (TFT) pelo método Folin-Ciocalteu .....	59
4.5.5	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH .....	60
4.5.6	Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP .....	60
4.6	Síntese do biodiesel .....	61
4.7	Caracterização do biodiesel .....	61
4.7.1	Aspecto .....	62
4.7.2	Índice de acidez .....	62
4.7.3	Teor de água .....	62
4.7.4	Teor de éster .....	63
4.8	Teste de estabilidade oxidativa do biodiesel .....	63
4.8.1	Rancimat .....	63

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
5.1	Caracterização da Matéria-Prima .....	65
5.1.1	Diâmetro médio das partículas .....	65
5.1.2	Umidade .....	67
5.2	Extração Convencional - Goldfish .....	68
5.2.1	Rendimento .....	68
5.3	Testes Fitoquímicos Preliminares.....	71
5.4	Determinação do Teor de Flavonoides Totais.....	74
5.5	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	75
5.6	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (TFT) Método Folin Ciocalteu.. .....	79
5.7	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH e FRAP .....	82
5.8	Caracterização do Biodiesel.....	85
5.8.1	Aspecto .....	85
5.8.2	Índice de Acidez .....	86
5.8.3	Teor de água .....	86
5.8.4	Teor de Éster.....	87
5.9	Estabilidade Oxidativa do Biodiesel.....	87
5.9.1	Rancimat .....	87
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel no Brasil.....	8
<b>Figura 2.</b> Regiões brasileiras e as principais matérias-primas na síntese de biodiesel.....	9
<b>Figura 3.</b> Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	12
<b>Figura 4.</b> Fluxograma do processo de produção de biodiesel.....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema do mecanismo da auto-oxidação lipídica.....	18
<b>Figura 6.</b> Esquema básico de funcionamento do Rancimat para o teste de oxidação acelerada.....	20
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de ação de antioxidantes primários.....	21
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da vitamina C.....	25
<b>Figura 9.</b> Estrutura química da molécula dos tocoferóis.....	26
<b>Figura 10.</b> Estrutura química geral dos flavonoides.....	27
<b>Figura 11.</b> Estrutura química da molécula de antocianina.....	28
<b>Figura 12.</b> Estrutura química da molécula de licopeno.....	28
<b>Figura 13.</b> Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.....	30
<b>Figura 14.</b> Mecanismos de ação dos antimicrobianos.....	37
<b>Figura 15.</b> <i>Eugenia involucrata</i> : (A) Cerejeira; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Frutos. .....	42
<b>Figura 16.</b> <i>Eugenia jambolana</i> : (A) Jambolão; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Frutos. .....	45
<b>Figura 17.</b> <i>Eugenia uniflora</i> : (A) Pitangueira; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Frutos.	47
<b>Figura 18.</b> <i>Eugenia myrcianthes</i> : (A) Pessegueiro-do-mato; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Fruto.....	49
<b>Figura 19.</b> Jardim Zoobotânico de Toledo.....	51
<b>Figura 20.</b> Aparelho extrator de óleos e gorduras - Goldfish.....	54
<b>Figura 21.</b> Fluxograma dos extratos obtidos por método Goldfish.....	55
<b>Figura 22.</b> Microplaca com os extratos diluídos.....	59
<b>Figura 23.</b> Aspecto do biodiesel de soja.....	85
<b>Figura 24.</b> Gráfico da condutividade em função do tempo, da avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel comercial (controle) sem adição de antioxidantes.....	88

**Figura 25.** Gráfico que indica o tempo de indução do biodiesel aditivado com o antioxidante sintético BHT..... 89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Porcentagem do teor de óleo produzido por diferentes oleaginosas. ...	10
<b>Tabela 2.</b> Composição de ácidos graxos do óleo de soja. ....	11
<b>Tabela 3.</b> Especificação do Biodiesel.....	16
<b>Tabela 4.</b> Fontes de alguns antioxidantes naturais.....	24
<b>Tabela 5.</b> Índice de polaridade de solventes utilizados no processo de extração convencional. ....	54
<b>Tabela 6.</b> Classificação de Gram. ....	58
<b>Tabela 7.</b> Concentrações (mg/mL) dos extratos nos poços das microplacas. ....	58
<b>Tabela 8.</b> Distribuição Granulométrica das folhas de cerejeira após secagem e moagem .....	65
<b>Tabela 9.</b> Distribuição Granulométrica das folhas de jambolão após secagem e moagem .....	66
<b>Tabela 10.</b> Distribuição Granulométrica das folhas de pitanga após secagem e moagem .....	66
<b>Tabela 11.</b> Distribuição Granulométrica das folhas de pessegueiro-do-mato após secagem e moagem.....	66
<b>Tabela 12.</b> Rendimento global das extrações convencionais com extrator de gordura - Goldfish.....	69
<b>Tabela 13.</b> Triagem Fitoquímica .....	71
<b>Tabela 14.</b> Teor de flavonoides totais dos extratos foliares. ....	74
<b>Tabela 15.</b> Concentração Bactericida Mínima (mg/mL) dos extratos foliares .....	76
<b>Tabela 16.</b> Teor de compostos fenólicos totais dos extratos foliares.....	80
<b>Tabela 17.</b> Atividade antioxidante dos extratos pelo Método DPPH e FRAP.....	83
<b>Tabela 18.</b> Tempo de indução obtido pela análise em Rancimat para amostra de biodiesel puro e aditivado com os antioxidantes naturais e sintético (BHT).....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS NOMENCLATURA

<b>A•</b>	Radical inerte
<b>AH</b>	Antioxidante
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo
<b>BHA</b>	Butil-hidroxi-anisol
<b>BHT</b>	Butil-hidroxi-tolueno
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
<b>EN</b>	Comittee for Standardization
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	Sulfato Ferroso
<b>FRAP</b>	Método antioxidante redutor de ferro
<b>GEE</b>	Gases de Efeito Estufa
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido Sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potássio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de Amônio
<b>OH</b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>PG</b>	Galato de Propila
<b>PI</b>	Período de Indução
<b>R•</b>	Radical lipídico
<b>RH</b>	Lipídio insaturado
<b>ROO•</b>	Radical peróxido
<b>ROOH</b>	Hidroperóxido
<b>TBHQ</b>	Terc-butil-hidróxi-quinona
<b>TFC</b>	Teor de Flavonoides Totais
<b>TFT</b>	Teor de Compostos Fenólicos Totais
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tripiridil-s-triazina
<b>UNIOESTE</b>	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
<b>UNOP</b>	Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

# **AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E EFEITO ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS NATURAIS COMO ADITIVOS NO BIODIESEL B100**

**AUTOR: ANA PAULA BECKER VIANA**

**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, defesa em 06 de Março de 2020. 127 p.

## **RESUMO**

O biodiesel é um combustível obtido a partir de fontes renováveis de energia, desempenhando importante papel no fomento da economia verde. Entretanto, a presença de ácidos graxos insaturados em sua composição química é capaz de acelerar o processo de oxidação. Visando retardar o processo oxidativo, são empregados antioxidantes sintéticos que possuem um custo elevado e apesar de eficientes, podem causar efeitos nocivos ao ser humano, assim, a utilização de antioxidantes naturais é uma alternativa promissora. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa do Biodiesel B100 e a atividade antimicrobiana de extratos naturais das folhas da cerejeira (*Eugenia involucrata*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), jabolão (*Eugenia jambolana*) e pessegueiro-do-mato (*Eugenia myrcianthes*), pelo método de extração convencional, em extrator de óleos e gorduras – Goldfish, utilizando como solventes o álcool etílico, acetato de etila e hexano na concentração de 1:10 massa/volume. As amostras foram caracterizadas fitoquimicamente, pelo método de colorimetria e precipitação, demonstrando a presença de flavonoides e taninos em todos os exemplares vegetais. A atividade antimicrobiana dos extratos foi testada frente às cepas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp, pela Concentração Bactericida Mínima (CBM), sendo o extrato etanólico o único a eliminar todos os microrganismos, obtendo inclusive a menor CBM, 2,5 mg/mL para extrato pitanga frente a *E. coli*. Foram avaliados o teor de compostos fenólicos totais (TFT), pelo método Folin-Ciocalteu, e a determinação da atividade antioxidante pelos métodos 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e Método antioxidante redutor de ferro (FRAP). Os resultados evidenciaram que

todos os extratos obtidos por etanol foram quantitativamente maiores em sua concentração de compostos fenólicos e efeitos antioxidantes se comparado aos extratos de acetato de etila e hexano. Os extratos etanólicos na concentração de 1000 ppm, foram então avaliados pelo teste de Oxidação Acelerada a 110C em equipamento Rancimat. O biodiesel testado foi sintetizado a partir do óleo de soja comercial, apresentando resultados satisfatórios aos parâmetros físico-químicos analisados. O biodiesel B100 (amostra controle) obteve período de indução (PI) de 5h21min. O extrato da cerejeira foi o único a melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, apresentando PI de 6h16min, sendo superior ao controle. Entretanto, está muito abaixo do limite estabelecido pela Agência Nacional do Petróleo (ANP), que exige tempo mínimo de 12 horas, ainda, o antioxidante sintético Butil-hidroxi-tolueno (BHT) apresentou maior efeito antioxidante (7h50min). As amostras aditivadas com extratos de pitanga, jambolão e pessegueiro-do-mato não apresentaram ação antioxidante, com PI de 3h42min, 4h24min e 3h60min, respectivamente. Os extratos etanólicos avaliados no presente trabalho não foram satisfatórios para substituição de antioxidantes sintéticos no biodiesel, no entanto, apresentam bons resultados quanto sua atividade antimicrobiana. Os compostos naturais são influenciados por muitos fatores, sendo necessários mais testes voltados para cada finalidade.

**Palavras-chave:** Goldfish; Rancimat; Gênero *Eugenia*; Antioxidantes naturais; BHT.

# ANTIMICROBIAL EVALUATION AND ANTIOXIDANT EFFECT OF NATURAL EXTRACTS AS ADDITIVES IN BIODIESEL B100

**AUTHOR: ANA PAULA BECKER VIANA**

**SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA**

Master Dissertation; Bioenergy Master Graduation Program; State University of West Paraná; Faculdade St., 645; z/c: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on March 06<sup>th</sup>, 2020. 127 p.

## ABSTRACT

Biodiesel is a fuel obtained from renewable energy sources, playing an important role in fostering the green economy. However, the presence of unsaturated fatty acids in its chemical composition is able to accelerate the oxidation process. In order to delay the oxidative process, synthetic antioxidants are used that have a high cost and although efficient, they can cause harmful effects to humans, thus, the use of natural antioxidants is a promising alternative. The objective of this work was to evaluate the oxidative stability of Biodiesel B100 and the antimicrobial activity of natural extracts of cherry leaves (*Eugenia involucrata*), surinam cherry (*Eugenia uniflora*), java (*Eugenia jambolana*) and peach-bush (*Eugenia myrcianthes*), by conventional extraction method, in oil and fat extractor - Goldfish, using as solvents ethyl alcohol, ethyl acetate and hexane in a concentration of 1:10 mass/volume. The samples were characterized phytochemically, using the colorimetry and precipitation method, demonstrating the presence of flavonoids and tannins in all plant specimens. The antimicrobial activity of the extracts was tested against the strains of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp, by the Minimum Bactericidal Concentration (CBM), with the ethanolic extract being the only one to eliminate all microorganisms, even obtaining the smallest CBM, 2,5 mg/mL for surinam cherry extract against *E. coli*. The content of total phenolic compounds (TFT) was evaluated by the Folin-Ciocalteu method, and the determination of antioxidant activity by the methods 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) and Iron-reducing antioxidant method (FRAP). The results showed that all extracts obtained by ethanol were

quantitatively higher in their concentration of phenolic compounds and antioxidant effects when compared to extracts of ethyl acetate and hexane. The ethanolic extracts at a concentration of 1000 ppm, were then evaluated by the Accelerated Oxidation test at 110C in Rancimat equipment. The tested biodiesel was synthesized from commercial soybean oil, showing satisfactory results for the analyzed physical-chemical parameters. B100 biodiesel (control sample) had an induction period (PI) of 5h21min. The cherry extract was the only one to improve the oxidative stability of biodiesel, presenting PI of 6h16min, being superior to the control. However, it is well below the limit established by the National Petroleum Agency (ANP), which requires a minimum time of 12 hours, yet, the synthetic antioxidant Butyl-hydroxy-toluene (BHT) showed a greater antioxidant effect (7h50min). The samples added with extracts of surinam cherry, java and peach-bush didn't show antioxidant action, with PI of 3h42min, 4h24min and 3h60min, respectively. The ethanol extracts evaluated in the present study weren't satisfactory for replacing synthetic antioxidants in biodiesel, however, they show good results in terms of their antimicrobial activity. Natural compounds are influenced by many factors, and more tests are needed for each purpose.

**Key words:** Goldfish; Rancimat; Genus *Eugenia*; Natural antioxidants; BHT.

## 1. INTRODUÇÃO

A incompatibilidade entre o uso intensivo de combustíveis fósseis e o desenvolvimento sustentável são relatados desde 1987 pelo conhecido relatório Brundtland, mencionando que o desenvolvimento futuro é dependente da capacidade de obtenção de energia a partir de fontes renováveis e suficientemente abundantes para suprir a demanda energética mundial (WCED, 1987).

A crescente preocupação global com a segurança energética, bem como com a responsabilidade ambiental deram grande ênfase à busca por fontes alternativas de energia. Os biocombustíveis surgiram como fonte altamente promissora, desempenhando importante papel no fomento da economia verde, contribuindo principalmente para substituição dos combustíveis fósseis (CHAVES & GOMES, 2014; PANDEY *et al.*, 2011).

Dentre os biocombustíveis, destaca-se o biodiesel, caracterizado como ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, geralmente produzido por transesterificação, na qual os triglicerídeos são reagidos com um álcool monohídrico na presença de um catalisador (KNOTHE & RAZON, 2017; MEHER; VIDYASAGAR & NAIK, 2006). O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, sintetizado a partir de gorduras animais e óleos vegetais. No Brasil há diferentes espécies oleaginosas potenciais, sendo a soja a principal matéria-prima utilizada (ANP, 2016).

Os ácidos graxos determinam muitas propriedades importantes do biodiesel, sendo influenciados pela composição da matéria-prima original (KNOTHE & RAZON, 2017). Aproximadamente 76% dos triglicerídeos presentes no óleo de soja são formados por ácidos graxos insaturados. Estes são capazes de acelerar o processo de oxidação, pela degradação decorrente da ação do ar, luz, temperatura e umidade, sendo agravado pelo tempo de exposição. Ainda, o contato com contaminantes de natureza inorgânica ou microbiana, tendem a provocar variações na qualidade do produto (AQUINO *et al.*, 2012; FOCKE *et al.*, 2012; BORSATO *et al.*, 2010).

Uma das formas de melhorar a estabilidade do biodiesel, prevenindo a oxidação e também a ação de microrganismos contaminantes, é pela adição de compostos bioativos, que podem possuir dupla função, inibindo o início e a

propagação de radicais livres, minimizando a formação de compostos de degradação, bem como controlar a multiplicação microbiana que acarreta a biodeterioração, desta forma, mantendo a qualidade nutricional e prolongando a vida útil do produto (SOFOS & GEORNARAS, 2010; YASHIN *et al.*, 2017; KREIVAITIS *et al.*, 2013).

Os antioxidantes podem ser de origem sintética ou natural. De modo geral, os aditivos sintéticos têm maior atividade antioxidante, devido à sua maior pureza, entretanto, a maioria desses antioxidantes apresenta baixa biodegradabilidade e alta toxicidade (KREIVAITIS *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2019).

Conservantes sintéticos também são utilizados para controlar a deterioração microbiana, principalmente em alimentos, no entanto, seu uso tem sido desencorajando devido aos seus impactos negativos à saúde (SOFOS & GEORNARAS, 2010).

A toxicidade dessas substâncias quimicamente sintetizadas tem direcionado pesquisadores a buscarem por potenciais compostos naturais, que são aditivos amplamente distribuídos na natureza, podendo ser extraídos de vegetais e plantas, exibindo uma ampla gama de efeitos biológicos. São eficazes na garantia da qualidade do biodiesel e promissores para substituição de compostos sintéticos. Ainda, mostram-se vantajosos por apresentar baixa toxicidade, menor custo e enorme gama de fontes de obtenção (SOFOS & GEORNARAS, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2017).

A produção comercial de biodiesel está em grande expansão, no entanto, para garantir a qualidade deste biocombustível alguns fatores são cruciais para sua aceitação no mercado. Tendo em vista os problemas decorrentes da baixa estabilidade oxidativa e biodeterioração microbiana, bem como os impactos negativos pela utilização de compostos sintéticos, busca-se nesse trabalho verificar a eficiência de espécies vegetais como aditivos no biodiesel.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visa analisar a estabilidade termo-oxidativa do biodiesel B100 e a atividade antimicrobiana de extratos naturais das folhas da cerejeira (*Eugenia involucrata*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), jabolão (*Eugenia jambolana*) e pessegueiro-do-mato (*Eugenia myrcianthes*), espécies pertencentes à família Myrtaceae, gênero *Eugenia*, empregando solventes líquidos na técnica de extração convencional pelo método Goldfish.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de extratos naturais da cerejeira, pitangueira, jabolão e pessegueiro-do-mato por extração convencional em extrator de óleos e gorduras – Goldfish, empregando como solventes o etanol, hexano e acetato de etila;
- Caracterizar a composição fitoquímica dos materiais vegetais;
- Determinar o teor de flavonoides dos extratos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente às cepas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.;
- Determinar a concentração dos compostos fenólicos totais dos extratos pelo método de Folin Ciocalteu;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e FRAP;
- Determinar os extratos naturais com melhores resultados em análises preliminares, aditivando o biodiesel B100 na concentração de 1000 ppm;
- Avaliar pelo teste de Oxidação Acelerada Rancimat o efeito antioxidante dos extratos naturais na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel B100.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Energia

No século XX, a indústria química era extremamente dependente do petróleo, posicionando a petroquímica em papel central, tanto na formulação de materiais quanto na produção de energia (GALEMBECK; BARBOSA & SOUSA, 2009). Nos últimos 120 anos a humanidade se desenvolveu em torno da utilização de combustíveis fósseis, influenciando decisivamente no amparo de processos produtivos, impulsionando a criação e desenvolvimento de tecnologias industriais e agrícolas (CARVALHO, 2008).

Os combustíveis fósseis foram e ainda são amplamente utilizados como fonte de energia, principalmente na área de transportes e maquinaria, em virtude de sua disponibilidade e características, que permitem uma combustão de qualidade com alta potência de aquecimento (HASSAN & KALAM, 2013).

A extensa aplicação do petróleo em nossa sociedade resultou em grande dependência como fonte energética, passando a receber forte pressão para sua substituição. Além de ser um recurso caro, possui instabilidade de preços, cuja distribuição desigual já causou muitos conflitos no passado. Em sua queima, emite gás carbônico, metano e óxidos de nitrogênio, contaminantes que são prejudiciais ao meio ambiente, causando poluição atmosférica e alterações climáticas que desencadeiam desastres naturais, com danos irreversíveis aos ecossistemas (GALEMBECK; BARBOSA & SOUSA, 2009; CARASCHI *et al.*, 2019). Ainda, Hassan e Kalam (2013), prevêem seu esgotamento no futuro pelas poucas reservas de combustíveis fósseis existentes.

Devido à crescente demanda global de energia e as reservas limitadas de combustíveis fósseis, oferecer soluções sustentáveis que atendam às necessidades globais de energia é um dos maiores desafios que a ciência enfrenta (RAGAUSKAS *et al.*, 2006).

De acordo com Goldemberg (2007), a utilização de energias renováveis é uma das estratégias mais eficientes de alcançar o desenvolvimento sustentável. Além da baixa emissão de carbono em seu ciclo de vida, emitem menos poluentes e são praticamente inexauríveis (GOLDEMBERG & LUCON, 2007).

Dentre as energias renováveis mais conhecidas atualmente, encontram-se a energia eólica, energia hidráulica, energia das ondas e marés, energia solar, energia geotérmica e biomassa. A utilização dessas energias renováveis em substituição aos combustíveis fósseis são viáveis e vantajosas (NASCIMENTO & ALVES, 2016).

O Brasil reúne muitas vantagens para produção bioenergética. As energias renováveis no Brasil são um caso de sucesso, com participação de 85% na matriz energética brasileira, principalmente pela participação da energia hidroelétrica, uma tecnologia conhecida e muito aplicada. No entanto, o Brasil terá que aproveitar as oportunidades para introduzir novas energias renováveis (LOSEKANN & HALLACK, 2018).

No país é possível a incorporação de novas áreas à agricultura voltadas à energia, sem competir com a produção de alimentos, e devido suas características edafoclimáticas é possível aplicar múltiplos cultivos dentro do ano agrícola. Há também grande disponibilidade de terras degradadas, nas quais a inserção de culturas de rotação, como cana-de-açúcar, soja e amendoim, contribuem para a ampliação da agricultura de energia, além de melhorar a fertilidade do solo (GOLDEMBERG; NIGRO & COELHO, 2008). Estes fatores contribuem para que o Brasil atinja à condição de grande produtor agrícola e com grande potencial para produção de biocombustíveis.

O termo de biocombustíveis remete a diversos materiais de origem biológica com possibilidade de uso como fonte de energia (BRANCO, 2013). A bioenergia refere-se ao conteúdo energético de produtos sólidos, líquidos e/ou gasosos, derivados de matérias-primas biológicas, denominados biomassa (HO; NGO & GUO, 2014). O biocombustível é uma fonte limpa de energia, uma vez que a emissão durante seu processo de produção, ou na descarga dos carros, causa menos poluição do que a proveniente do diesel e da gasolina (BRANCO, 2013).

Os biocombustíveis obtidos a partir de matérias-primas de primeira geração foram às primeiras tecnologias com significativo potencial para a transição dos combustíveis fósseis (HO; NGO & GUO, 2014). Para Azevedo e Lima (2016), os biocombustíveis são uma das formas sob as quais a biomassa pode ser utilizada, sendo alternativa econômica-ambiental para substituição. Entretanto, o uso eficiente da biomassa como combustível requer prévio conhecimento de sua

composição e propriedades para desenvolver tecnologias que otimizem sua combustão (CARASCHI *et al.*, 2019).

Um dos tipos de biomassa mais utilizados como matérias-primas dos biocombustíveis são as plantas oleaginosas, com destaque especial a cultura da soja, amplamente utilizada para produção de biodiesel (AZEVEDO & LIMA, 2016). Segundo Faria *et al.* (2007), a utilização de biodiesel como combustível alternativo apresenta potencial em escala global, devido ao seu menor impacto ambiental, com caráter não tóxico, biodegradável e com baixa taxa de poluentes, tornou-se promissor e atrativo como biocombustível.

### **3.2 Biodiesel**

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis que pode ser produzido a partir de gorduras animais ou óleos vegetais, empregando espécies como girassol, palma, babaçu, amendoim, mamona, pinhão-manso e soja, sendo esta última a principal matéria-prima utilizada (ANP, 2016).

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente de triglicerídeos, que são ésteres formados a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa, denominados ácidos graxos, e glicerol. Além dos triglicerídeos, há outros componentes presentes nos óleos vegetais em menor proporção, tais como ácidos graxos livres, originados no processo de extração, fosfolipídeos, esteróis e tocoferóis (RINALDI *et al.*, 2007).

O biodiesel é obtido a partir de um processo químico denominado transesterificação, através desse processo, os triglicerídeos presentes em óleos e gorduras reagem com um álcool primário, seja metanol ou etanol, na presença de um catalisador, gerando dois produtos: o éster e a glicerina (ALPTEKIN & CANAKCI, 2011; ANP, 2019).

A estrutura química do biodiesel é semelhante ao diesel, entre os combustíveis renováveis, as propriedades físico-químicas do biodiesel são as que mais se aproximam do petrodiesel, requerendo poucas modificações no atual sistema de motores, podendo ser utilizado em mistura ou de forma pura (ALPTEKIN & CANAKCI, 2011). Além de não requer modificações no mecanismo e melhorar sua lubrificação, quase não contém enxofre, não contribuindo para a

poluição atmosférica, reduzindo substancialmente as emissões de gases de efeito estufa (GEE) devido ao seu ciclo fechado de carbono (VAN-GERPEN, 2005; HASSAN & KALAM, 2013).

No Brasil, a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória em janeiro de 2008, inicialmente, a mistura legalmente obrigatória era de 2% (B2). Com a aceitação do mercado brasileiro e o significativo salto nos resultados, esse percentual recebeu ampliação progressiva ao decorrer dos anos. Desde setembro de 2019 a mistura passou a ser de 11%, em volume, conforme Lei 13.263/2016 (ANP, 2020).

O Brasil possui posição de destaque como um dos principais mercados na produção mundial de biodiesel, juntamente com a União Européia e os Estados Unidos (VIDAL, 2019). Em 2019, o país gerou mais de 5,8 milhões de metros cúbicos (m<sup>3</sup>) de biodiesel, sendo os estados do Mato Grosso e Rio Grande do Sul responsáveis por 48% dessa produção, manufaturando mais de 2,8 milhões de m<sup>3</sup> (ANP, 2020).

O biodiesel tem potencial de se tornar ferramenta fundamental para solucionar grande parte dos problemas ambientais. Ainda, o uso de biodiesel fornece um novo mercado para culturas agrícolas, reduzindo a dependência de diesel de fontes estrangeiras de petróleo, desta forma, impulsionando o desenvolvimento rural, transferindo a energia da petroquímica para a agroindústria (HASSAN & KALAM, 2013). Estes fatores fazem do biodiesel um biocombustível mais adaptável e atrativo ao cenário energético atual, promovendo segurança e sustentabilidade.

Segundo Santos (2018), a qualidade do biodiesel é influenciada por vários fatores, incluindo a qualidade da matéria-prima, composição de ácidos graxos da fonte lipídica, processo de produção e as etapas de purificação, ressaltando a necessidade de criteriosa avaliação em seu processo produtivo.

### *3.2.1 Matérias-Primas para Produção de Biodiesel*

O Brasil possui grande diversidade em sua flora e fauna, com vasta área territorial e condições edafoclimáticas que favorecem a produção de diversas espécies oleaginosas com potencial para a produção de biodiesel (BERGMANN *et al.*, 2013). A Figura 1 mostra as principais matérias-primas e sua produção no

Brasil como biodiesel, com predominância do óleo de soja (70,39%), seguido pela gordura bovina (11,18%).

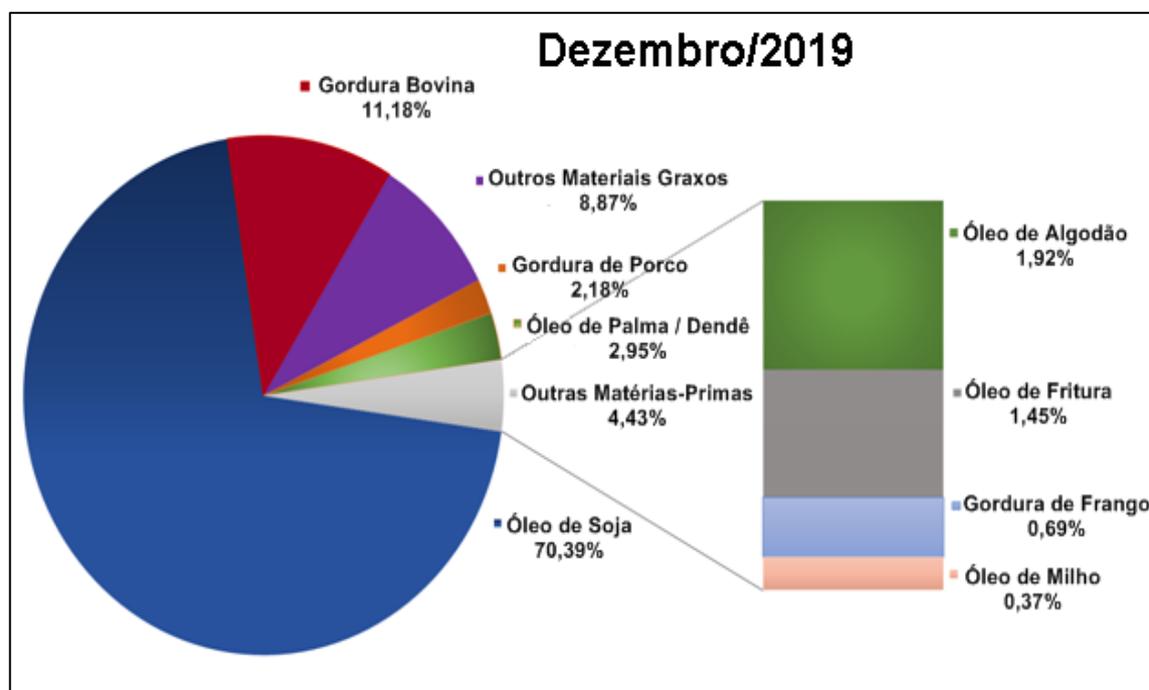


Figura 1. Principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel no Brasil.

Fonte: ANP (2020b).

Em virtude da grande demanda em se produzir biodiesel, surgiu à necessidade de se cultivar outras culturas, inclusive não alimentícias, que garantam o fornecimento e não competição da matéria-prima para ambos os setores (TOMAZIN-JUNIOR, 2008). Desta forma, pesquisas voltadas a produção de biodiesel foram impulsionadas a culturas não comestíveis, como algodão (*Gossypium hirsutum* L.), pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e mamona (*Ricinus communis* L.) (COSTA; YAMAOKA & COSTA, 2006).

As matérias-primas brutas, bem como gorduras animais (sebo bovino, óleos de peixes, óleo de mocotó, banha de porco, gordura de aves) e óleos e gorduras residuais (óleos de fritura de origem doméstica e industrial, gordura sobrenadante de esgoto e óleos residuais de processamentos industriais) podem ser utilizados para sua síntese, diminuindo os impactos ambientais e os custos de produção (SALLET & ALVIM, 2011; BERGMANN *et al.*, 2013; TAPANES *et al.*, 2013).

Recentemente, o óleo de microalgas e fungos tornaram-se alvos de investigação, apresentando resultados satisfatórios para as algas, com altíssimo rendimento (RAMOS *et al.*, 2011). As algas são organismos vegetais de crescimento rápido na natureza e tem a capacidade de converter grandes quantidades de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em oxigênio (TAPANES *et al.*, 2013). Apesar da grande perspectiva que o cultivo de microalgas representa para a segurança energética, ainda está muito distante da viabilidade comercial (RAMOS *et al.*, 2011).

Inúmeros fatores determinam a escolha da matéria-prima, como disponibilidade local, viabilidade econômica, propriedades de armazenamento e seu desempenho como combustível. Esses elementos determinam qual matéria-prima tem potencialidade para ser adotada na produção comercial do biodiesel (PINHO & TEIXEIRA, 2015). De modo geral, os óleos vegetais são as matérias-primas mais utilizadas para a produção de biodiesel (HAAS & FOGLIA, 2006).

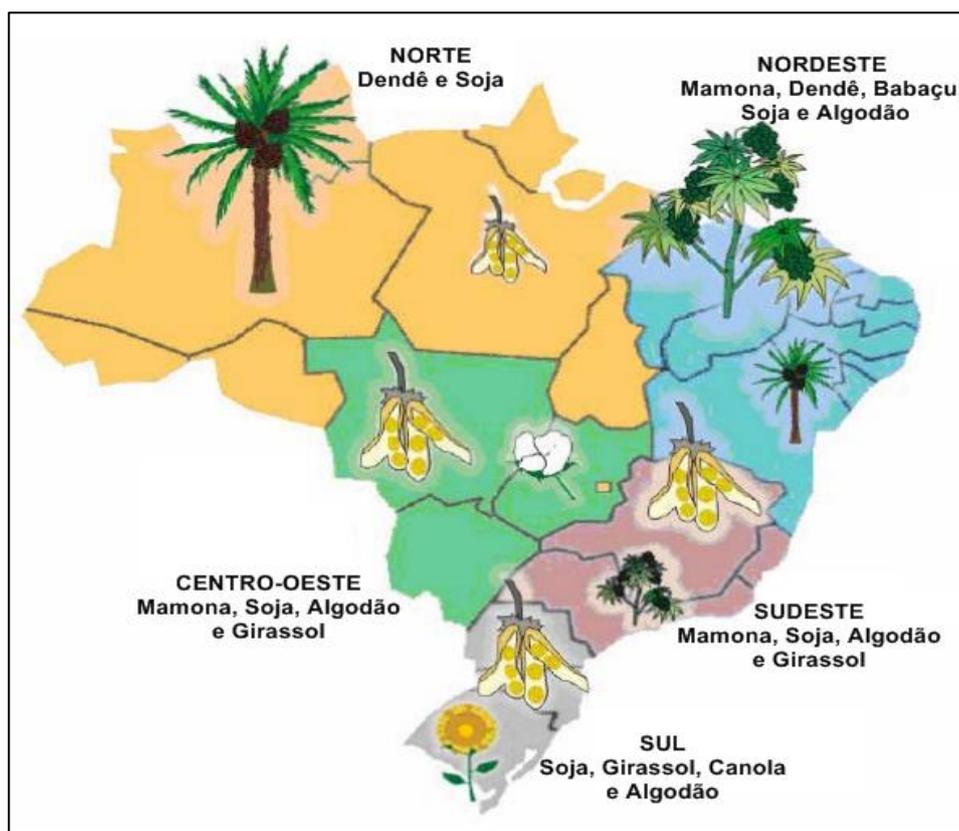


Figura 2. Regiões brasileiras e as principais matérias-primas na síntese de biodiesel.

Fonte: Galvão (2007).

O Brasil ao longo de sua extensão territorial apresenta vantajosas condições para exploração de matérias-primas de alta qualidade para obtenção do biodiesel (Figura 2). Como mostra a Tabela 1, as culturas de palma, canola, girassol, mamona, amendoim, nabo e pinhão-manso são espécies com alto teor de óleo, entretanto, a viabilidade da produção destas oleaginosas depende de pesquisas e avanços tecnológicos. Segundo Pinho e Teixeira (2015), o óleo de dendê/palma tem sido uma das maiores apostas a longo prazo, alcançado tecnologias mais modernas no processo produtivo, afim de atingir larga escala comercial.

**Tabela 1. Porcentagem do teor de óleo produzido por diferentes oleaginosas.**

<b>Oleaginosa</b>	<b>Teor de óleo (%)</b>
Soja	18%
Algodão	15%
Palma/Dendê	22%
Canola/Colza	44%
Girassol	44%
Mamona	48%
Amendoim	45%
Nabo	37%
Pinhão manso	34%

Fonte: Costa, Yamaoka e Costa (2006).

No Brasil, a área cultivada de soja é muito maior do que das demais culturas oleaginosas, levando a uma produção substancial de óleo de soja, cuja disponibilidade a favorece como matéria-prima para produção de biodiesel (PINHO & TEIXEIRA, 2015). A cultura da soja está presente em grande parte da América do Norte, América do Sul e Ásia. Nos Estados Unidos há a maior produção mundial, produzindo aproximadamente 32%, seguido pelo Brasil, com 28% (HAY, 2019). A larga produção agrícola faz da soja o principal insumo para síntese de biodiesel.

A composição do óleo de soja está centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3) (Tabela 2). Após a reação de transesterificação, estes ácidos

graxos mantêm sua proporção relativa constante, compondo mais de 95% do teor de ácidos graxos do óleo (COSTA-NETO *et al.*, 2000).

**Tabela 2. Composição de ácidos graxos do óleo de soja.**

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

Fonte: Costa-Neto *et al.* (2000).

A soja possui grande produção, sendo muito desenvolvida, inclusive com alto nível de mecanização. No entanto, o cultivo da soja tem baixa produtividade de óleo, seu teor compõe 18% da massa total. O óleo apresenta ainda cerca de 76% de triglicerídeos formados por ácidos graxos insaturados, que são incorporados pelo biodiesel e acarretam em baixa estabilidade oxidativa (BORSATO *et al.*, 2010).

### 3.2.2 Produção de Biodiesel

Dentre os vários processos existentes para produção de biodiesel, a transesterificação tem sido o método mais empregado. A transesterificação consiste na reação química onde os triglicerídeos são transformados em moléculas menores de ésteres de ácido graxo (biodiesel) a partir de um agente

transesterificante (álcool primário) e um catalisador (Figura 3) (JARDINE; DISPATO & PERES, 2009).

Os triglicerídeos estão presentes em óleos e gorduras, sendo caracterizados como uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácido graxo. O catalisador da reação pode ser de origem ácida, alcalina ou enzimática, e os alcoóis frequentemente usados são o metanol ou etanol, em uma razão 3:1, ou seja, são necessários três mols de álcool para reagir com um mol de triglicerídeo. O processo resulta em uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (ZUNIGA *et al.*, 2011; (COSTA-NETO *et al.*, 2000).

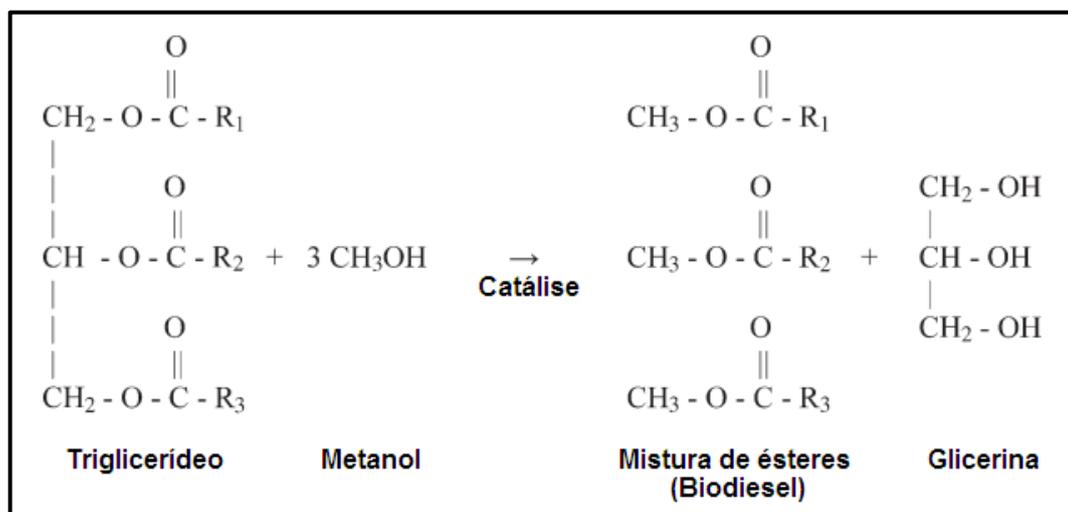


Figura 3. Reação de transesterificação de triglicerídeos.

Fonte: Gerpen (2005).

A transesterificação de óleos vegetais constitui-se de um método químico muito utilizado para produção de biodiesel, cuja ação reduz a viscosidade e melhora a volatilidade do óleo. Durante seu processamento ocorrem modificações da estrutura molecular do óleo, tornando-a semelhante à estrutura do óleo diesel, obtendo características físico-químicas similares (PINTO *et al.*, 2005; ZUNIGA *et al.*, 2011).

Alguns fatores contribuem de modo relevante ao processo, podendo aumentar as conversões, como os ácidos graxos livres da matéria-prima, pureza e proporção dos reagentes, tempo de reação, tipo e quantidade de catalisador e temperatura reacional (MARCINIUK, 2007).

As diferenças nos processos de obtenção de biodiesel por via etílica ou metílica podem ser bastante significativas, dependendo da qualidade da matéria-prima, teor de ácidos graxos livres, teor de água e as condições experimentais empregadas (DABDOUB; BRONZEL & RAMPIN, 2009).

As vantagens do metanol em relação ao etanol estão relacionadas à maior polaridade, menor cadeia estrutural e ausência de água. O metanol é dependente da temperatura para obtenção de altos rendimentos, principalmente para aumento na produção de ésteres. Seu processo é mais vantajoso pelos aspectos da produção e purificação dos ésteres, e no que diz respeito à funcionalidade do motor, o metanol apresenta octanagem mais elevada que o etanol, fatores estes que fazem da transesterificação metílica a mais utilizada pela indústria para obtenção do biodiesel (PINTO *et al.*, 2005; DABDOUB; BRONZEL & RAMPIN, 2009; GUPTA & DEMIRBAS, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O etanol não sofre muita influência pela temperatura, mas possui maior dependência pelo tempo de reação. Em excesso de etanol, há diminuição do equilíbrio, aumentando a solubilidade da glicerina e dificultando a separação de fases. No entanto, o etanol a partir da cana-de-açúcar tem grande potencial como fonte de álcool, sendo de origem renovável, com maior disponibilidade e menor toxicidade, ainda contribuindo com ganhos no mercado de carbono (ENCINAR *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Recebendo forte estímulo para a substituição do metanol pelo etanol, gerando um combustível renovável totalmente independente do petróleo (JARDINE; DISPATO & PERES, 2009).

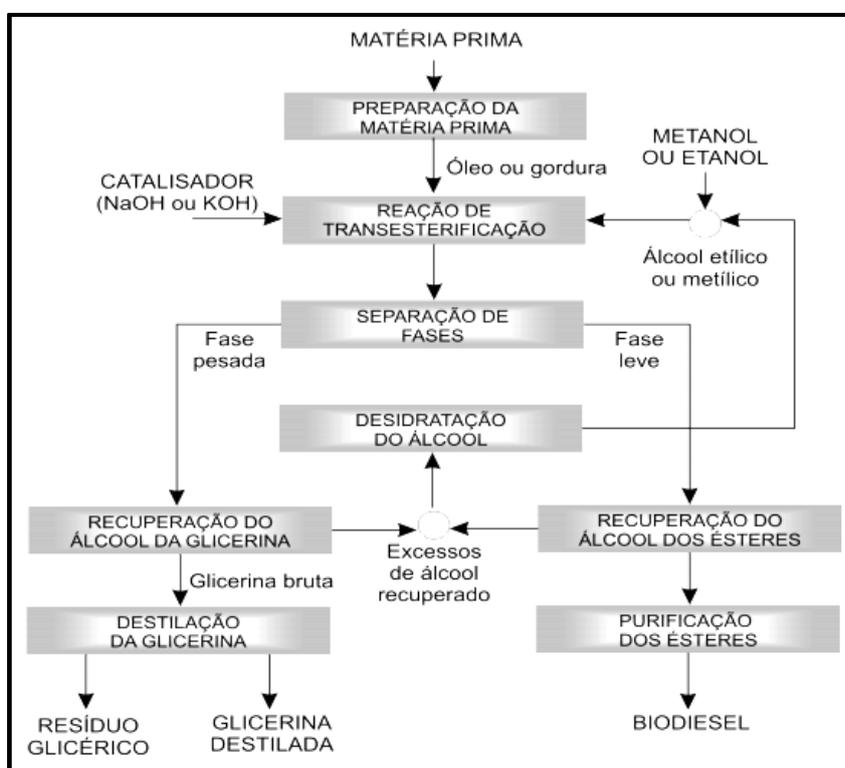
Para produção do biodiesel é necessário um catalisador que aumentará a velocidade reacional da transesterificação, essa reação pode ocorrer por catálise heterogênea, uma técnica com vantagens, inclusive ambientais, pois facilita a purificação do biodiesel e permite a reciclagem do catalisador sólido ao longo de sua vida útil, minimizando a geração de efluentes e diminuindo o custo de produção (CORDEIRO *et al.*, 2011). No entanto, a transesterificação por catálise homogênea é a mais amplamente utilizada, por ser um processo relativamente simples e capaz de obter altas taxas de conversões da matéria-prima em produto. A catálise homogênea é conduzida por diferentes rotas tecnológicas dependendo do tipo de catalisador: alcalino, ácido ou enzimático (ENCINAR *et al.*, 2002).

Os catalisadores mais utilizados são de origem alcalina, como o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH). São economicamente viáveis e

capazes de acelerar a reação em torno de 4000 vezes em comparação aos catalisadores ácidos, a exemplo, o ácido clorídrico (HCl). No entanto, promovem maior nível de saponificação no processo, pela reação do catalisador com os ácidos graxos livres do óleo, formando sabão (JARDINE; DISPATO & PERES, 2009).

Após a reação de transesterificação há uma mistura de compostos, onde os produtos obtidos devem ser separados pelo processo de decantação. A fase superior corresponde ao produto principal, o biodiesel, e na fase inferior, encontra-se a glicerina (subproduto da reação), bem como resíduos de catalisador, excesso de álcool, água, sabão e baixa porcentagem de tri, di e monoglicerídeos (PINTO *et al.*, 2005; JARDINE; DISPATO & PERES, 2009).

O biodiesel obtido deve ser purificado para remoção dos resíduos persistentes. A lavagem com água aquecida é uma alternativa para a remoção de impurezas. A fase aquosa pode ser separada dos ésteres por decantação e posterior aquecimento para secagem e remoção da umidade (JARDINE; DISPATO & PERES, 2009). O fluxograma da produção do biodiesel por transesterificação está representado na Figura 4.



**Figura 4. Fluxograma do processo de produção de biodiesel.**

Fonte: Jardine, Dispatto e Peres (2009).

A glicerina é o subproduto do processo de produção de biodiesel. Quando purificada, é amplamente utilizada para fabricação de produtos da indústria farmacêutica e indústria de ração, utilizado como emoliente na indústria cosmética, e diversos produtos na indústria química, como solvente para tintas, vernizes, lubrificantes e plásticos biodegradáveis (MOTA; SILVA & GONÇALVES, 2009; SILVA, 2010b).

Sendo um resíduo, normalmente a glicerina está contaminada, havendo presença de água, glicerol, sais, sabões, resíduos de catalisador e ésteres, também sendo necessário um processo de purificação para sua aplicação industrial (SILVA, 2010b).

### *3.2.3 Parâmetros de Qualidade*

As características físico-químicas do biodiesel variam de acordo com a matéria-prima utilizada para a obtenção do biocombustível. Entretanto, independente da fonte de matéria-prima utilizada, o biodiesel puro (B100) a ser misturado ao diesel de petróleo na proporção de 11% deve atender às especificações estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em sua Resolução ANP nº 45/2014. Os parâmetros e limites a serem atendidos estão listados na Tabela 3.

Segundo Lôbo, Ferreira e Cruz (2009), a qualidade do biodiesel pode variar em decorrência de muitos fatores, entre eles: Pelas estruturas moleculares dos ésteres que sofrem variações tanto pelo tamanho da cadeia carbônica, quanto pela quantidade e posição de insaturações; Na matéria prima há contaminantes que podem ser transferidos para o biodiesel, como fósforo, enxofre, cálcio e magnésio, e dependendo do processo de produção do biodiesel, estes compostos podem estar presentes em maior ou menor quantidade; Ainda, durante o armazenamento ocorrem processos de degradação oxidativa, contribuindo para o aparecimento de água, peróxidos e ácidos carboxílicos de baixa massa molecular.

Segundo Cazarolli (2019), a presença de água é fator determinante para contaminação e proliferação de microrganismos, tornando o biodiesel ainda mais suscetível a degradações durante as etapas de produção e armazenamento, comprometendo suas qualidades combustíveis.

**Tabela 3. Especificação do Biodiesel**

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>LIMITE</b>
Aspecto	-	LII (1)
Massa específica a 20° C	kg/m <sup>3</sup>	850 a 900
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,0 a 6,0
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0
Teor de éster, mín	% massa	96,5
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020
Enxofre total, máx.	mg/kg	10
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5
Fósforo, máx.	mg/kg	10
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1
Número Cetano	-	-
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	-
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02
Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20
Índice de Iodo	g/100g	-
Estabilidade à oxidação a 110C, mín. (11)	Hora	12

(1): Límpido e isento de impurezas.

Fonte: Adaptado de ANP (2014).

Através do monitoramento e avaliação das características do biodiesel é possível obter informações claras e objetivas a respeito da seleção da matéria

prima, síntese e armazenamento. Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões que controlem e assegurem a integridade do motor, desempenho, segurança no transporte e manuseio, além de prezar por um dos princípios básicos dos biocombustíveis, a queima com baixa emissão de poluentes (LÔBO; FERREIRA & CRUZ, 2009; ZUNIGA *et al.*, 2011).

As especificações nacionais do biodiesel têm sido aprimoradas constantemente ao longo dos anos, contribuindo para sua adequação com as normas internacionais, bem como com o alinhamento da qualidade às condições do mercado atual, permitindo maior segurança e previsibilidade aos agentes econômicos (ANP, 2019).

### **3.3 Estabilidade Oxidativa do Biodiesel**

A estabilidade oxidativa do biodiesel é a resistência dos componentes lipídicos à reação de oxidação (DAMASCENO *et al.*, 2013). O biodiesel é mais propenso à oxidação do que os combustíveis fósseis, em estágios avançados, causam acidez, formação de depósitos insolúveis e sedimentos que obstruem o filtro de combustível (FERRARI; OLIVEIRA & SCABIO, 2005).

O óleo de soja é a principal fonte vegetal para a produção do biodiesel, e um dos óleos mais susceptíveis à oxidação. Devido às grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, em particular o ácido oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e o teor relativamente elevado de ácido linolênico (C18:3), há probabilidade de ranço oxidativo (DAMASCENO *et al.*, 2013).

Na produção do biodiesel, o perfil de ácidos graxos da matéria-prima influencia nas propriedades combustíveis. No processo de transesterificação a natureza e proporção das cadeias de carbono geralmente permanecem inalteradas em relação ao material de origem, sendo semelhante ao óleo ou gordura utilizada (DOMINGOS *et al.*, 2007).

Além da composição do óleo vegetal, outros fatores são relevantes à degradação acelerada de ácidos graxos, como a exposição ao ar, luz, altas temperaturas, presença de íons metálicos e outros agentes oxidantes durante seu processamento e armazenamento (CONCEIÇÃO *et al.*, 2007). A pureza do combustível referente à presença de água, partículas sólidas e microrganismos também influenciam em sua estabilidade (FERRARI & SOUZA, 2009).

Dentre os processos oxidativos que acometem os óleos e gorduras, a auto-oxidação é o mecanismo mais comum. A auto-oxidação está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, segundo Ramalho e Jorge (2006), ocorrem em três etapas: A iniciação é a primeira etapa, onde ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio de uma molécula de lipídio insaturado, em condições que são favorecidas por luz e calor. A propagação é a etapa intermediária, os radicais livres suscetíveis ao ataque do oxigênio são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação, como peróxidos e hidroperóxidos, que atuam propagando a reação, resultando em um processo autocatalítico. Na etapa de término, dois radicais combinam-se, resultando na formação de produtos estáveis (SILVA; BORGES & FERREIRA, 1999) (Figura 5).

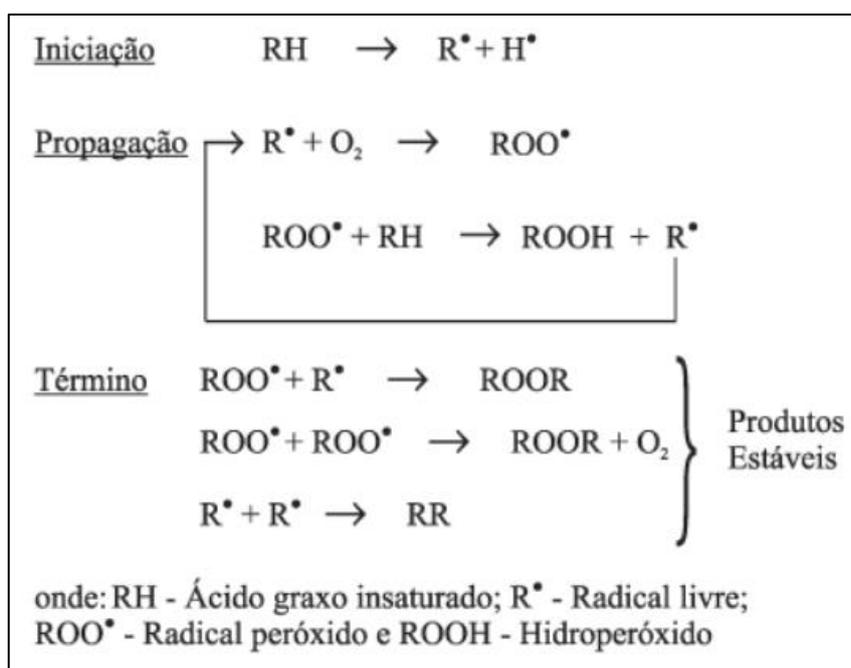


Figura 5. Esquema do mecanismo da auto-oxidação lipídica.

Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

A auto-oxidação de substâncias graxas insaturadas procede em diferentes velocidades, e dependem do número e posição das ligações duplas, pois possuem alta reatividade com o oxigênio, e quanto maior o nível de insaturações do éster alquílico, maior sua susceptibilidade a oxidação (WANASUNDARA & SHAHIDI, 1993; SUPRIYONO *et al.*, 2015). Na auto-oxidação são formados monohidroperóxidos, que quebram as ligações, resultando em produtos voláteis,

principalmente aldeídos, cetonas, alcoóis e ácidos carboxílicos (WANASUNDARA & SHAHIDI, 1993). Estes produtos de oxidação afetam a qualidade dos materiais lipídicos em diversas aplicações industriais, como na produção do biodiesel, que acarretam em significativos problemas aos motores (CONCEIÇÃO *et al.*, 2007; XIN; IMAHARA & SAKA, 2009).

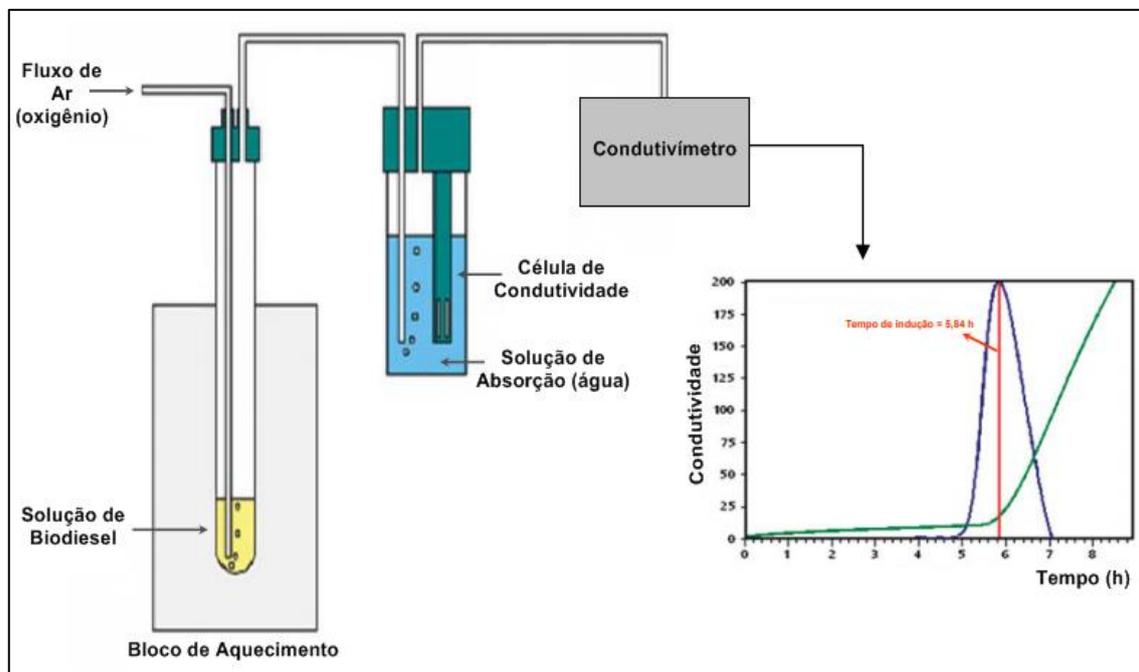
O processo oxidativo não pode ser completamente impedido ou revertido, mas há compostos que atuam na inibição das reações, atrasando ou retardando o acúmulo de produtos oxidados. Tais inibidores são conhecidos como antioxidantes (SUPRIYONO *et al.*, 2015). O avanço da qualidade do biodiesel e sua difusão como combustível alternativo é dependente do desenvolvimento de tecnologias que aumentem sua resistência à oxidação durante longos tempos de estocagem (FERRARI & SOUZA, 2009).

### 3.3.1 Método Rancimat

A degradação oxidativa do biodiesel gera queda de desempenho, aumento da susceptibilidade a corrosão e diminuição da vida útil dos motores (GODOY, 2013). Para evitar esses problemas e melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, o Comitê Europeu de Normalização estabeleceu a Norma EN 14112 que afirma que o biodiesel deve passar por um período de indução (PI) de pelo menos 8 horas a 110C. No Brasil os parâmetros de qualidade são regidos pela Resolução ANP nº 45/2014, e estabelece período de indução superior a 12 horas a 110C. Em ambas normativas o Rancimat é o método padrão.

No método Rancimat, uma amostra de biodiesel é mantida em um tubo reacional, em temperatura constante de 110C. A auto-oxidação é induzida pela passagem do fluxo de ar através da amostra aquecida. Os principais produtos formados na primeira etapa de oxidação são os peróxidos, com posterior formação de compostos orgânicos voláteis, dentre estes, ácidos orgânicos de baixa massa molecular. Os produtos voláteis da reação são carregados pelo ar e coletados em um frasco contendo água ultrapura e um eletrodo. Os gases são absorvidos e dissociados na água, sendo observado um súbito aumento da condutividade elétrica. O tempo decorrente até a detecção dos ácidos orgânicos é denominado de período de indução (FERRARI; OLIVEIRA & SCABIO, 2005;

LÔBO; FERREIRA & CRUZ, 2009). A Figura 6 mostra um esquema básico do funcionamento do Rancimat.



**Figura 6. Esquema básico de funcionamento do Rancimat para o teste de oxidação acelerada**

Fonte: Santos (2008).

A oxidação é expressa através de uma curva, a partir do qual o período de indução pode ser calculado pela interceptação de duas linhas: uma tangente à inclinação e a outra tangente ao nível da curva (FERRARI; OLIVEIRA & SCABIO, 2005).

### 3.4 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, atrase ou inibe os danos oxidativos a uma molécula alvo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1995). Como sugere esta definição, seu papel fisiológico é responsável por evitar danos resultantes de reações químicas envolvendo radicais livres. Desta forma, a principal característica de um antioxidante é sua capacidade de capturar e remover os radicais livres formados durante o início da oxidação (YOUNG & WOODSIDE, 2001; FOCKE, 2012). Compostos antioxidantes como ácidos

fenólicos, polifenóis e flavonoides eliminam radicais livres, como peróxido, hidroperóxido ou peroxil lipídico, inibindo assim os mecanismos oxidativos (MAHDI-POUR *et al.*, 2012).

A alta estabilidade e baixa volatilidade dos antioxidantes ajudam a manter os constituintes da matriz e suas funcionalidades (WILSON *et al.*, 2017). Devido suas características, os antioxidantes são frequentemente utilizados na indústria, como estabilizadores em combustíveis e lubrificantes para evitar oxidação, impedindo a polimerização que leva a formação de resíduos de incrustação de motores (KEBEDE & ADMASSU, 2019). A maioria dos produtos alimentícios contém antioxidantes, sendo utilizados para prolongar a vida útil do produto, impedindo a oxidação de ligações duplas de ácidos graxos insaturados. Na indústria farmacêutica são adicionados antioxidantes para melhorar a estabilidade de agentes terapêuticos suscetíveis a agentes químicos, cuja ação resulta na degradação por oxidação (SHEBIS *et al.*, 2013; KEBEDE & ADMASSU, 2019).

### 3.4.1 Classificação dos antioxidantes

Os antioxidantes podem ser identificados pelo seu mecanismo de ação. Segundo Decker (2002), os antioxidantes são classificados em primários, secundários, sinergistas, sequestradores de oxigênio, quelantes e mistos.

Antioxidantes primários são compostos que doam átomos de hidrogênio ou elétrons, interrompendo oxidações adicionais, removendo ou inativando radicais livres ( $\text{ROO}^\bullet$  e  $\text{R}^\bullet$ ) formados durante a etapa de iniciação ou interrompendo-os na etapa de propagação, formando um radical antioxidante ( $\text{A}^\bullet$ ) inerte e de baixa energia, encerrando a reação oxidativa (Figura 7) (BOLLAND & TEN-HAVE, 1947; ADEGOKE *et al.*, 1998; DECKER, 2002).

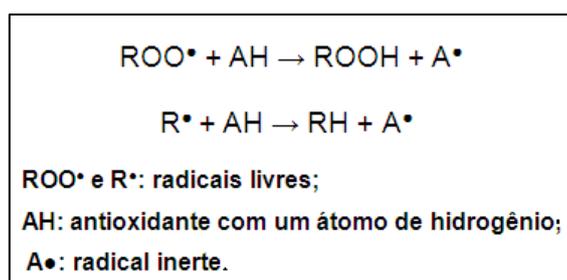


Figura 7. Mecanismo de ação de antioxidantes primários

Fonte: Adaptado de Ramalho e Jorge (2006).

Dentre os antioxidantes primários, os compostos sintéticos são mais conhecidos, destacando-se o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Alguns componentes naturais também atuam como antioxidantes primários, sendo os tocoferóis os mais utilizados (REISCHE; LILLARD & EITENMILLER, 2002; RASHED *et al.*, 2016).

Antioxidantes secundários, também conhecidos como antioxidantes preventivos, retardam ou impedem a taxa de oxidação lipídica por várias ações, seja pela complexação com metais, no sequestro de oxigênio ou pela decomposição de hidroperóxidos. Os antioxidantes reagem com os hidroperóxidos (ROOH), convertendo-os em formas mais estáveis, evitando que os hidroperóxidos interajam com metais e formem novos radicais livres alcóxi (REISCHE; LILLARD & EITENMILLER, 2002; RAMALHO & JORGE, 2006).

Os sinergistas são substâncias com atividade antioxidante de intensidade baixa ou nula, no entanto, quando usados em combinação adequada, tem potencial de aumentar a atividade dos antioxidantes primários (RAMALHO & JORGE, 2006). No sinergismo, o efeito de uma mistura de componentes é maior do que sua ação separadamente. Os sinergistas atuam mais como agentes sequestrantes ou quelantes, do que como antioxidante propriamente dito. O ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido fosfórico atuam como sinergistas na regeneração de antioxidantes primários (GAVA, 1977). Segundo Ramalho e Jorge (2006), os antioxidantes sintéticos BHA e BHT são sinergistas entre si. Ainda, o ácido cítrico em combinação com o TBHQ apresentam excelente sinergia em óleos vegetais.

Os sequestradores de oxigênio são substâncias que reagem com moléculas de oxigênio, capturando-as. Desta forma, o oxigênio torna-se indisponível para atuar na propagação da autooxidação, evitando possíveis processos oxidativos. Alguns dos componentes desse grupo são o ácido ascórbico (vitamina C) e seus derivados (RAMALHO & JORGE, 2006; SANTOS, 2013).

Os antioxidantes biológicos são compostos por enzimas que podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos. A catalase foi a primeira enzima antioxidante a ser caracterizada, e catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A enzima superóxido dismutase, é um dos antioxidantes enzimáticos mais potentes, atuando na remoção de radical

superóxido, enquanto a glutathione peroxidase catalisa a oxidação de qualquer hidroperóxido orgânico, podendo ser peróxido de hidrogênio até mesmo hidroperóxido lipídico (RAMALHO & JORGE, 2006; KURUTAS, 2016).

Os agentes quelantes, conhecidos também por agentes sequestrantes, complexam íons metálicos, onde um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os antioxidantes desse grupo impedem a atividade catalisadora dos metais, principalmente do cobre e ferro, na formação de radicais livres que promovem a oxidação (REISCHE; LILLARD & EITENMILLER, 2002; RAMALHO & JORGE, 2006)

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e o ácido cítrico são os quelantes de metais mais comuns nos alimentos. Os flavonoides também podem ligar aos íons metálicos, lignanas, polifenóis, ácido ascórbico e aminoácidos como carnosina e histidina também pode quelar metais (RAMALHO & JORGE, 2006; CHOE & MIN, 2009). A maioria dos quelantes são solúveis em água, sendo que o ácido cítrico também pode ser dissolvido em óleos, com algumas limitações para quelar metais no sistema de petróleo (CHOE & MIN, 2009).

Os antioxidantes mistos são caracterizados como compostos que ocorrem em plantas e animais, amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Essa classificação abrange várias proteínas hidrolisadas e derivados do ácido cinâmico (BAILEY, 1996).

### *3.4.2 Antioxidantes Naturais*

Os antioxidantes são substâncias que atuam contra a deterioração oxidativa durante o armazenamento e processamento, podendo ser classificados quanto a sua origem, divididos em dois grupos, os antioxidantes naturais e os antioxidantes sintéticos.

A natureza é uma fonte rica de compostos bioativos, conhecidos por seus efeitos promotores de saúde e valores nutritivos. Entre os efeitos mais benéficos dessas fontes naturais estão suas propriedades com potencial ação antioxidante. Antioxidantes naturais são comumente derivados de fontes vegetais, sendo encontradas em legumes, verduras, nozes, frutas, sementes, folhas, raízes e cascas (BUTNARIU & GROZEA, 2012). Os compostos naturais mais comumente encontrados são: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferóis), vitamina A

(carotenóides), licopeno e vários polifenóis, incluindo flavonoides e antocianinas (YADAV *et al.*, 2016). Na Tabela 4, alguns compostos com ampla distribuição e suas fontes naturais

**Tabela 4. Fontes de alguns antioxidantes naturais**

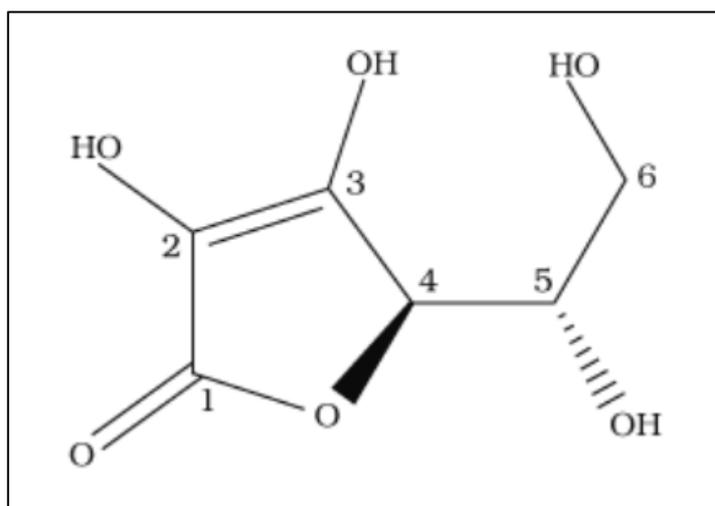
COMPOSTO	FONTE NATURAL
<b>Carotenóides</b>	Vegetais de folhas escuras, cenouras, batatas doces, inhame, tomates, damascos, frutas cítricas, couve e mamão.
<b>Catequinas</b>	Chá verde, frutas e certas oleaginosas.
<b>Flavonoides</b> (polifenóis)	Oleaginosas, alface, bagas, berinjela, pimentão, frutas cítricas, vegetais crucíferos, cebola e chá preto.
<b>Licopeno</b>	Tomate, mamão, melancia e goiaba.
<b>Ácidos fenólicos</b>	Sementes oleaginosas e certos óleos, cereais e grãos.
<b>Vitamina C</b>	Frutas e legumes, bagas, frutas cítricas, pimentão verde e batatas.
<b>Vitamina E</b> (tocoferóis)	Sementes oleaginosas, óleo de palma, nozes, ovos, produtos lácteos, grãos integrais, vegetais, cereais, margarina, etc.
<b>Extratos</b>	Extrato de chá verde, alecrim, sálvia, cravo, orégano, tomilho, aveia e farelo de arroz.

Fonte: Adaptado de Kebede e Admassu (2019).

A maioria dos antioxidantes naturais convertem os radicais lipídicos em produtos mais estáveis, quebrando a cadeia de reação oxidativa. Os antioxidantes obtidos a partir de vegetais e frutas inclui principalmente minerais, vitaminas e polifenóis (HURRELL, 2003). Os minerais como o ferro, zinco, selênio, cobre e manganês, possuem ação antioxidante por atuar como co-fatores de muitas enzimas antioxidantes, onde a ausência do mineral pode atrapalhar a atividade de eliminação enzimática (SONIA; MINI & GEETHALEKSHMI, 2016).

Entre as vitaminas obtidas a partir de plantas, as vitaminas C e E recebem muita atenção em relação à sua capacidade antioxidante. A vitamina C, conhecida como ácido ascórbico, é um antioxidante solúvel em água e encontrado em frutos cítricos como laranja e limão, e em vegetais, como tomate e pimentão (MCGHIE & WALTON, 2007; KEBEDE & ADMASSU, 2019). Sua

estrutura inclui dois grupos hidroxilas adjacentes e um carbonil (Figura 8), o que faz desta molécula um excelente doador de hidrogênio ou elétrons. Portanto, participa como co-fator em muitas reações enzimáticas, podendo reagir com os radicais livres e interromper sua reação (FARBSTEIN; KOZAK-BLICKSTEIN & LEVY, 2010).



**Figura 8. Estrutura química da vitamina C**

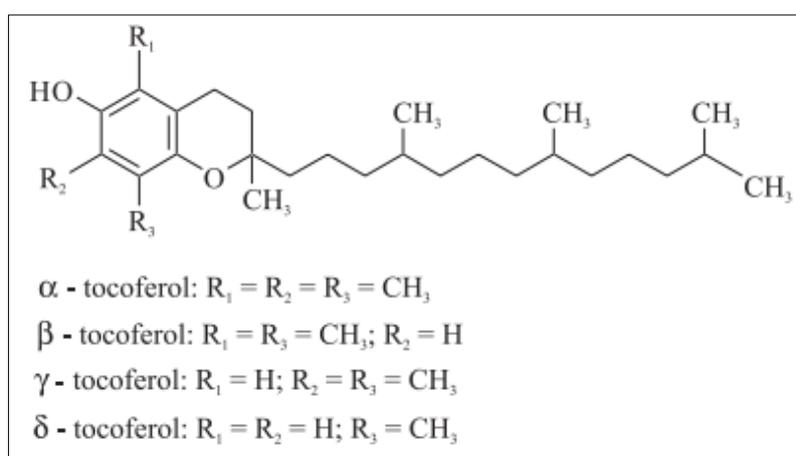
Fonte: Rosa *et al.* (2007).

A vitamina C é capaz de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ERO) na fase aquosa antes do início da peroxidação lipídica (YADAV *et al.*, 2016). No entanto, em algumas condições a vitamina C pode atuar como doador de elétrons, acelerando reações redox na presença de metais de transição, como ferro ou cobre, desta forma, a vitamina C pode servir como um pró-oxidante e não como um antioxidante (FARBSTEIN; KOZAK-BLICKSTEIN & LEVY, 2010).

A vitamina E, também conhecida como tocoferol, é uma substância não polar, sendo um dos principais antioxidantes lipossolúveis. É encontrada naturalmente em plantas, principalmente nas que possuem alta riqueza lipídica, como sementes oleaginosas (ANWAR; HUSSAIN & MUSTAFA, 2018). A vitamina E é um importante antioxidante, sendo muito eficaz na interrupção de reações oxidativas em cadeia, protegendo os ácidos graxos da peroxidação lipídica (YADAV *et al.*, 2016).

Os tocoferóis estão presentes naturalmente na maioria dos óleos vegetais. São divididos em quatro tipos: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ), classificados de acordo com a localização dos grupos metila no anel (Figura 9).

Apresentam alto valor nutricional, possuindo atividade antioxidante principalmente nas formas de  $\gamma$ -tocoferol e  $\delta$ -tocoferol (TASAN & DEMIRCI, 2005). O  $\alpha$ -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante dependendo do sistema testado, concentração, tempo de oxidação ou método utilizado para acompanhar a oxidação (RAMALHO & JORGE, 2006). A atividade antioxidante dos tocoferóis é decorrente da capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, sendo muito eficaz e amplamente aplicado para interrupção de reações oxidativas de óleos e gorduras, protegendo os ácidos graxos da peroxidação lipídica (YADAV *et al.*, 2016).



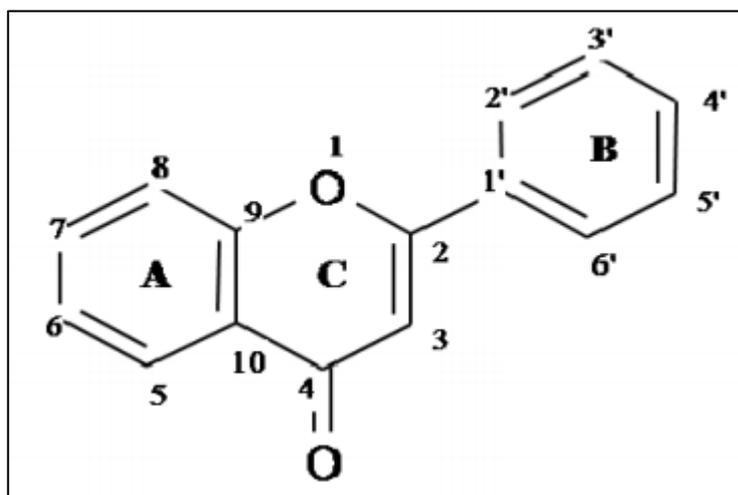
**Figura 9. Estrutura química da molécula dos tocoferóis**

Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Segundo Singh, Suruchi e Sharma (2013), os polifenóis também conhecidos como compostos fenólicos, são as substâncias bioativas com propriedades antioxidantes mais significativas para matérias-primas vegetais. São encontrados em componentes naturais, como verduras e frutas, sendo um grupo de vários compostos de baixo e alto peso molecular, com propriedades antioxidantes que impedem a oxidação lipídica (PARR & BOLWELL, 2000). Os antioxidantes fenólicos agem sequestrando radicais e, algumas vezes, quelando metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (RAMALHO & JORGE, 2006).

Os flavonoides (Figura 10) representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SANTOS & RODRIGUES, 2017). O papel dos flavonoides nas flores é fornecer

cores atrativas aos polinizadores, e em folhas, promover a sobrevivência fisiológica da planta, protegendo-as de patógenos e radiação UV. Também estão envolvidos na fotossensibilização, transferência de energia, ações dos hormônios e reguladores de crescimento das plantas, controle da respiração e fotossíntese, morfogênese e determinação de sexo (CUSHNIE & LAMB, 2005; SAXENA; SAXENA & PRADHAN, 2012).



**Figura 10. Estrutura química geral dos flavonoides**

Fonte: Prado (2008).

Há um grande número de flavonoides existentes na natureza, estando subdivididos em seis classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas, que podem apresentar importantes propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e atividade hormonal (AHERNE & O'BRIEN, 2002; SANTOS & RODRIGUES, 2017).

As antocianinas (Figura 11), representam um grupo de pigmentos polifenólicos onipresentes no reino vegetal. São caracterizados como pigmentos azuis, vermelhos ou roxos encontrados especialmente em flores, frutas e tubérculos. Em condições ácidas, as antocianinas aparecem como pigmento vermelho, enquanto as antocianinas do pigmento azul ocorrem em condições alcalinas. Nas plantas, as antocianinas desempenham papel na reprodução, atração de polinizadores e dispersores de sementes, como também na proteção contra vários estresses abióticos e bióticos (KHOO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018).

As antocianinas vegetais têm sido amplamente estudadas por seus valores medicinais, com comprovado efeito antidiabético, anticâncer, anti-inflamatório, antimicrobiano e anti-obesidade (KHOO *et al.*, 2017). Outra propriedade significativa das antocianinas é sua atividade antioxidante, que desempenha papel vital na prevenção de doenças neuronais (KONCZAK & ZHANG, 2004).

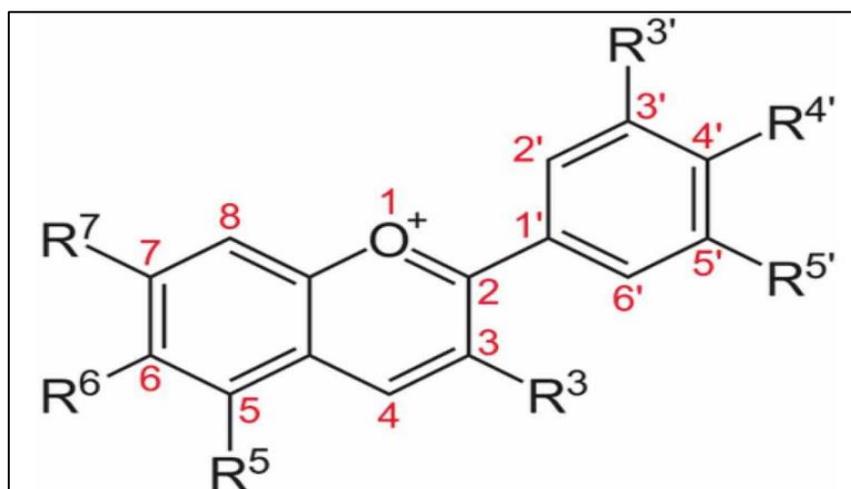


Figura 11. Estrutura química da molécula de antocianina

Fonte: Khoo *et al.* (2017).

O licopeno (Figura 12), é um dos 600 pigmentos carotenóides encontrados na natureza, presente em tomates, melancia, goiaba e outras frutas, devido às quais é observada coloração vermelho ou rosa. Entre todos os carotenóides, o licopeno é um dos mais abundantes e potentes antioxidantes naturais, possuindo características estruturais e químicas únicas que contribuem para propriedades biológicas específicas (MORITZ & TRAMONTE, 2006; MEHTA; PATANI & SINGHVI, 2018).

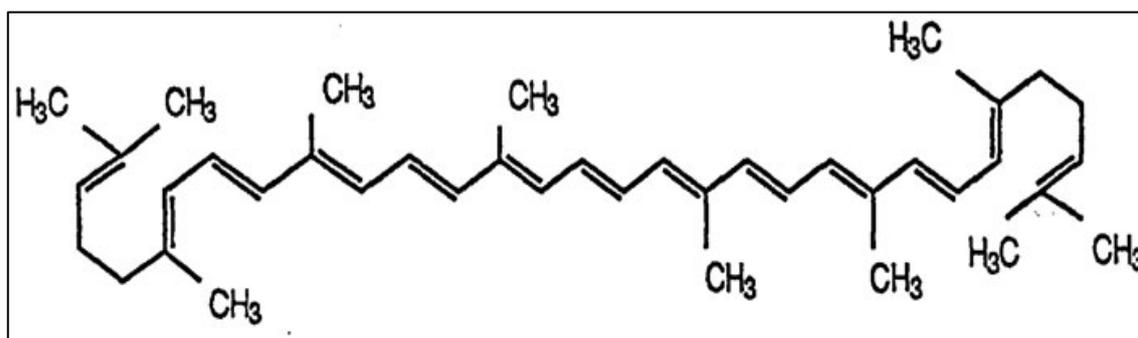


Figura 12. Estrutura química da molécula de licopeno

Fonte: Kumar *et al.* (2017).

O aumento do licopeno na dieta pode agir como um antioxidante. O licopeno age capturando espécies reativas de oxigênio, resultando em um aumento no potencial antioxidante pela redução do dano oxidativo aos lipídios, proteínas e DNA. Desta forma, o licopeno possui efeito protetor contra doenças cardiovasculares, hipertensão, aterosclerose, danos à pele e certos tipos de câncer, como próstata, mama, pulmão e outros (CÁMARA *et al.*, 2013; MEHTA; PATANI & SINGHVI, 2018).

### 3.4.3 Antioxidantes Sintéticos

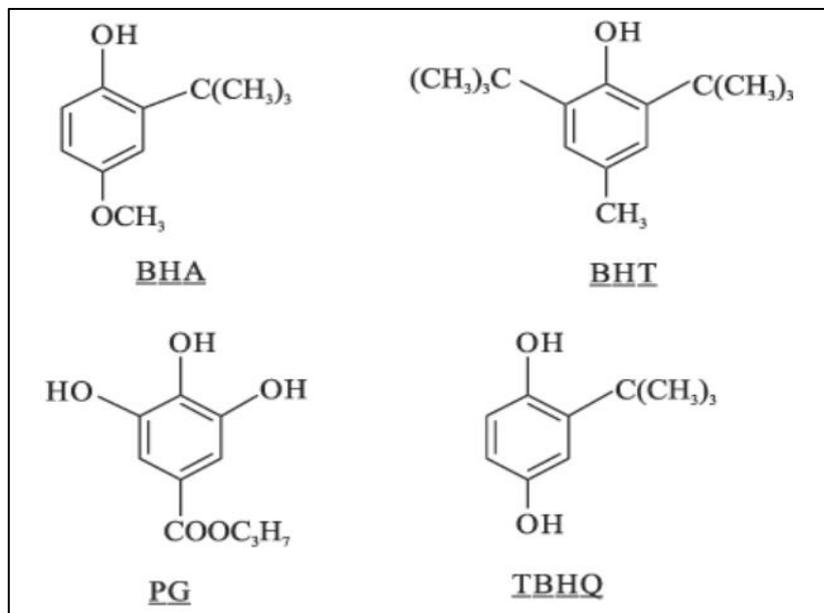
Os antioxidantes sintéticos não possuem ocorrência natural, estes são sintetizados quimicamente e adicionados aos produtos para conservar e prevenir a oxidação lipídica (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992). De acordo com Ramalho e Jorge (2006), os antioxidantes butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), ambos derivados do petróleo, terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e o galato de propila (PG), são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. As suas estruturas podem ser visualizadas na Figura 13.

Os antioxidantes sintéticos são de origem primária, e interrompem a cadeia de reações oxidativas dos radicais livres, doando hidrogênio dos grupos hidroxila fenólicos, formando radicais estáveis que impedem o início ou propagação da oxidação lipídica. Desta forma, estes compostos devem ser adicionados o mais cedo possível no processo de fabricação ou no produto acabado, uma vez que não é possível reverter a oxidação de óleos rançosos, nem são eficazes para suprimir a rancidez hidrolítica que envolve a hidrólise enzimática de gorduras catalisadas (DOMINGOS *et al.*, 2007).

O BHA é o antioxidante com maior ação na inibição da oxidação de gorduras animais e de óleos vegetais de cadeia curta, agindo como sequestrante de radicais peróxidos. Apresenta alta volatilidade e relativa alta suscetibilidade à oxidação, desta forma, são conhecidos por serem ineficientes a elevadas temperaturas (DUNN, 2005; RAMALHO & JORGE, 2006).

O BHT é um pó branco cristalino facilmente vaporizado sob altas temperaturas. Tem seu modo de ação mais efetivo em produtos que contenham gordura animal, se comparado aos óleos vegetais. É um antioxidante sintético análogo a vitamina E. É um dos antioxidantes mais antigos do mercado, e pelo

seu baixo custo está entre os mais utilizados no Brasil. Comumente é empregado na indústria, principalmente de borracha, petroquímica e farmacêutica (RAMALHO & JORGE, 2006; CRUZ, 2014; COSTA, 2015).



**Figura 13. Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos**

Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

O TBHQ é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos, gorduras e seus derivados, apresentando melhor ação antioxidante nesses tipos de produtos do que a observada para BHA, BHT e PG, principalmente em óleos vegetais poli-insaturados. É um composto com baixa volatilidade e estável em condições de temperaturas elevadas, apresentando alta resistência. No entanto, pela possibilidade desse composto apresentar efeito carcinogênico, não é permitido em alguns países, como no Canadá e na Comunidade Européia (REISCHE; LILLARD & EITENMILLER, 2002; LUZIA & JORGE, 2009; MONTEIRO, 2017).

O PG é um composto pouco solúvel em óleos vegetais, com baixa estabilidade para gorduras e derivados, entretanto, apresenta solubilidade considerável em água. De modo geral, tem ótima ação antioxidante, sendo utilizado em indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, além de ser adicionado em materiais para embalagem de alimentos a fim de evitar a deterioração dos produtos (DUNN, 2005; RAMALHO & JORGE, 2006; BOUAZIZ *et al.*, 2010).

Mittelbach e Schober (2003) avaliaram a ação antioxidante de BHA, BHT e TBHQ frente a ésteres metílicos de óleo de girassol, canola, óleo de fritura e sebo. O TBHQ foi o antioxidante com maior eficiência em todas as matérias-primas, seguido pelo BHA e pelo BHT.

Domingos *et al.* (2007), analisaram o efeito do BHT, BHA e TBHQ utilizando ésteres etílicos de óleo de soja, sendo que o BHT apresentou maior efetividade, com boa estabilidade na concentração de 200 a 7000 ppm, enquanto o TBHQ exibiu maior potencial de estabilização quando usado em concentrações mais altas (8000 ppm).

A eficiência de determinado antioxidante depende da matéria-prima e tecnologia empregada para produção do biodiesel, desta forma, ressaltando a necessidade de investigações específicas para ésteres produzidos por diferentes vias de reação (MITTELBACH & SCHOBBER, 2003).

Mesmo com a comprovada alta eficiência dos aditivos sintéticos, há restrições em seu uso em alimentos, visto que há possibilidade de serem tóxicos, causando efeitos indesejáveis a saúde humana, como o câncer (DÉGASPARI & WASZCYNSKYJ, 2004).

A síntese de novos antioxidantes é limitada pelos altos custos de pesquisa e desenvolvimento, bem como, pelos custos associados à avaliação de segurança, ainda, pelo tempo necessário para obter a aprovação regulamentar dos aditivos (SHAHIDI & WANASUNDARA, 2002). As restrições para sua aprovação, bem como a crescente preferência dos consumidores por aditivos seguros e naturais, levaram a indústria a buscar por novas fontes, direcionando muitos estudos na pesquisa de novos compostos naturais com ação antioxidante que possam substituir os sintéticos.

### **3.5 Degradação Microbiológica do Biodiesel**

Como visto, o biodiesel pode sofrer degradação química, sendo potencializada por fatores como temperatura, luz e umidade. No entanto, fatores bióticos, como a presença de microrganismos, também diminuem sua estabilidade e aceleram seu processo de deterioração (ARANTES *et al.*, 2017).

A biodegradabilidade do biodiesel é uma vantagem do ponto de vista ambiental, entretanto, a maior biodegradabilidade favorece a deterioração

decorrente da contaminação microbiana, sendo um grande problema nas refinarias e sistemas de distribuição (PASSMAN, 2003; LOFTHUS *et al.*, 2018).

A degradação microbiológica ocorre principalmente durante o processo de estocagem, com alterações de sua qualidade ao longo do tempo. Uma das principais alterações que ocorrem nos combustíveis pela ação microbiana é a formação de material particulado que se sedimenta, denominado borra (37% de carbonatos), e a incrustação (75% de sulfatos de bário e de estrôncio), decorrente da formação de polímero viscoso, produzido em grandes quantidades por uma ou mais espécies de microrganismos, ocorrendo simultaneamente ou em sucessão (GAZINEU, 2005; HILL & HILL, 2008; NEVES, 2018). Por exemplo, em um mesmo combustível utilizado em helicópteros e aeronaves pode ser encontrado diferentes espécies microbianas, pois os ciclos de temperatura e as taxas de condensação durante o voo são marcadamente diferentes (HILL & HILL, 2008).

No biodiesel podem ser encontrados bactérias, bolores e leveduras, no entanto, é limitado o número de espécies hábeis a crescerem nesse meio, com capacidade em degradar hidrocarbonetos ou diferentes configurações moleculares. Contudo, muitas espécies se desenvolvem utilizando os produtos da degradação como substrato (HILL & HILL, 2008).

Os fatores determinantes da contaminação e proliferação de microrganismos em combustíveis estão relacionados à taxa de crescimento microbiano, contato com oxigênio, luz e temperatura, nutrientes acessíveis e a disponibilidade de água (HILL & HILL, 2008; FATTAH *et al.*, 2014). Em geral, o calor e pH neutro estimulam o crescimento de muitos microrganismos, no entanto, alguns são adaptados a condições extremas de temperatura e pH (HILL & HILL, 2008).

A água é um fator essencial para a atividade microbiana, a mínima concentração de água em um sistema de armazenamento já é suficiente para o crescimento de microrganismos. Devido a esse fato, a maioria das recomendações exigem um baixo teor de umidade, visando evitar sua presença e atividade (ARANTES *et al.*, 2017).

A ação microbiana aumenta a instabilidade química, acelerando reações e produzindo mais sedimentos. Este tipo de contaminação ocasiona diversos problemas durante a cadeia de produção, transporte e uso do combustível, tais como: saturação dos filtros, entupimento por lodo nas mangueiras e tubulações,

mau funcionamento do sistema injetor de combustível e corrosão no tanque pela liberação de ácidos e peróxidos (HILL & HILL, 2008; ZIMMER, 2014).

Em motores com maior consumo, ou seja, com taxa de rotação mais rápida, o risco de dano ao sistema de armazenamento é maior do que o risco de biodeterioração do combustível, já que para a biodeterioração é necessário tempo prolongado de armazenamento no tanque (PASSMAN, 2013).

Em literatura, são relatadas a presença de algumas espécies bacterianas, como: *Actinobacteria*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Clostridium*, *Micrococcus* (WHITE *et al.*, 2011; SORIANO *et al.*, 2015). Além de espécies fúngicas, como: *Aspergillus penicillioides*, *Candida dubliniensis*, *Candida viswanathii*, *Pichia anomala* e *Engyodontium álbum* (SORIANO *et al.*, 2015). Apesar do conhecimento dessas espécies, sabe-se muito pouco sobre o papel preciso desempenhado por cada uma delas (HILL & HILL, 2008).

Segundo Lofthus *et al.* (2018), uma boa limpeza, monitoramento e uso adequado de um biocida eficaz são medidas cruciais para uma estratégia antimicrobiana. No entanto, o uso de extratos naturais com essa finalidade são vistos isoladamente.

### 3.5.1 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos a partir de extratos naturais para formulação de antimicrobianos, direcionados para diversos fins. Objetiva-se também obter compostos bioativos de baixa toxicidade, menor impacto ambiental e maior eficácia contra a resistência de microrganismos patogênicos (BONA *et al.*, 2004).

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos representa um dos testes de maior importância em laboratórios microbiológicos, capaz de avaliar a suscetibilidade de determinado microrganismo contra diferentes agentes antimicrobianos (JORGENSEN & FERRERO, 1998).

Há diversos métodos laboratoriais para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos (NCCLS, 2003). Segundo Ostrosky *et al.* (2018), o método de diluição em caldo – microdiluição, que utiliza microplacas com 96 poços, é um método barato, com reprodutibilidade, mais sensível que

outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de extrato e podem ser usados para um grande número de amostras.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser avaliada através da determinação da menor concentração do extrato capaz de causar a morte do inóculo, esse valor é conhecido como Concentração Bactericida Mínima (CBM) (DE BONA *et al.*, 2014). Os resultados obtidos podem ser interpretados considerando as características farmacológicas e farmacocinéticas dos antimicrobianos (BRITO *et al.*, 2001). No entanto, as variações dos testes de determinação podem ocorrer por vários fatores, como a técnica aplicada, microrganismo testado, origem da planta, época da coleta, e ao que refere às condições em que foram preparados os extratos, bem como sua quantidade utilizada no teste (OSTROSKY *et al.*, 2018).

### **3.6 Antimicrobianos**

Não é possível determinar na história da humanidade quando o homem tomou conhecimento da existência de microrganismos e de sua importância (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Entretanto, hoje sabemos que estes podem desempenhar diferentes e importantes papéis na sociedade (FRANCO & LANDGRAF, 2013).

Os microrganismos são seres ubíquos, ou seja, podem ser encontrados em diferentes ecossistemas, até mesmo em locais com condições que ultrapassam os limites de sobrevivência de animais e plantas (TORTORA; FUNKE & CASE, 2012). Devido sua simplicidade morfológica e grande diversidade genética, os microrganismos são seres que se adaptaram para sobreviver em regiões extremas (MÜLLER; MARTINI & MEDINA, 2010).

Muitos microrganismos podem afetar adversamente a qualidade e a segurança dos produtos, produzindo toxinas ou componentes radioativos que causam grandes impactos, seja como prejuízos na indústria ou na saúde humana (TRESSELER *et al.*, 2005; BINGÖL & BOSTAN, 2007).

As bactérias têm um curto tempo de geração, de minutos ou horas, e podem responder rapidamente as mudanças do ambiente, assim, quando os antibióticos são ministrados, as bactérias podem tornar-se resistentes ao antimicrobiano. Ainda, a resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de

antibióticos aumentou a pressão seletiva, permitindo que esses seres adquiram mecanismos de resistência frente a diferentes antimicrobianos, sendo necessário buscar novas alternativas para o combate dos microrganismos (SANTOS, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Vários conservantes sintéticos são utilizados para controlar a deterioração microbiana, principalmente em alimentos, prolongando a vida útil do produto. No entanto seu uso tem sido desencorajando, devido aos seus impactos negativos à saúde, desta forma, antimicrobianos de ocorrência natural têm ganhado atenção por sua segurança e status não tóxico (SOFOS & GEORNARAS, 2010).

Os antimicrobianos são substâncias de origem natural, conhecidos como antibióticos, e agem sobre microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando sua destruição (SÁEZ-LLORENS, 2000). Antimicrobianos naturais de diferentes fontes estão sendo empregados para preservar os produtos da deterioração por microrganismos patogênicos, sendo as plantas uma das principais fontes utilizadas, com grande potencial para produção de biocidas. Ervas e especiarias, frutas e legumes, sementes e folhas frequentemente são empregadas na preservação contra diferentes microrganismos (TAJKARIMI; IBRAHIM & CLIVER, 2010).

A partir dos extratos e óleos essenciais das plantas, são obtidos compostos que têm demonstrado eficiência no controle de crescimento de uma ampla variedade de microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2014). Segundo Novais *et al.* (2003), as plantas representam excelentes fontes para obtenção de novos compostos antimicrobianos, visto que produtos naturais possuem diversidade molecular superior aos produtos sintetizados quimicamente.

Existe um grande número de espécies vegetais utilizadas para fins medicinais com potencial antimicrobiano, porém ainda são necessários mais estudos científicos sobre a atividade biológica dessas plantas para sua efetiva utilização (CARVALHO *et al.*, 2014).

### 3.6.1 Classificação e Mecanismos de Ação

Entender o mecanismo de ação dos antimicrobianos e compreender os mecanismos pelos quais as bactérias conseguem resistir aos ataques destes agentes são essenciais para potencializar a eficácia dos antibióticos e

concomitantemente minimizar o desenvolvimento da resistência bacteriana (NOGUEIRA *et al.*, 2016).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o principal mecanismo de ação. Existindo cinco principais modos de atuação (Figura 14): Inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese protéica, alterações das membranas bacterianas, inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibição da síntese de folato (ROLLINS; 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2016).

A parede celular bacteriana consiste em uma rede de polímeros, denominados peptídeoglicanos, que fornece maior resistência mecânica ao rompimento osmótico. As enzimas transglicosilases e as transpeptidases têm papéis críticos na formação dessa camada. Enzimas bifuncionais que contêm ambos os domínios da transpeptidase e transglicosilase, são alvos de agente antimicrobianos, cuja ação resulta na inibição da síntese da parede celular (GUIMARÃES; MOMESSO & PUPO, 2010).

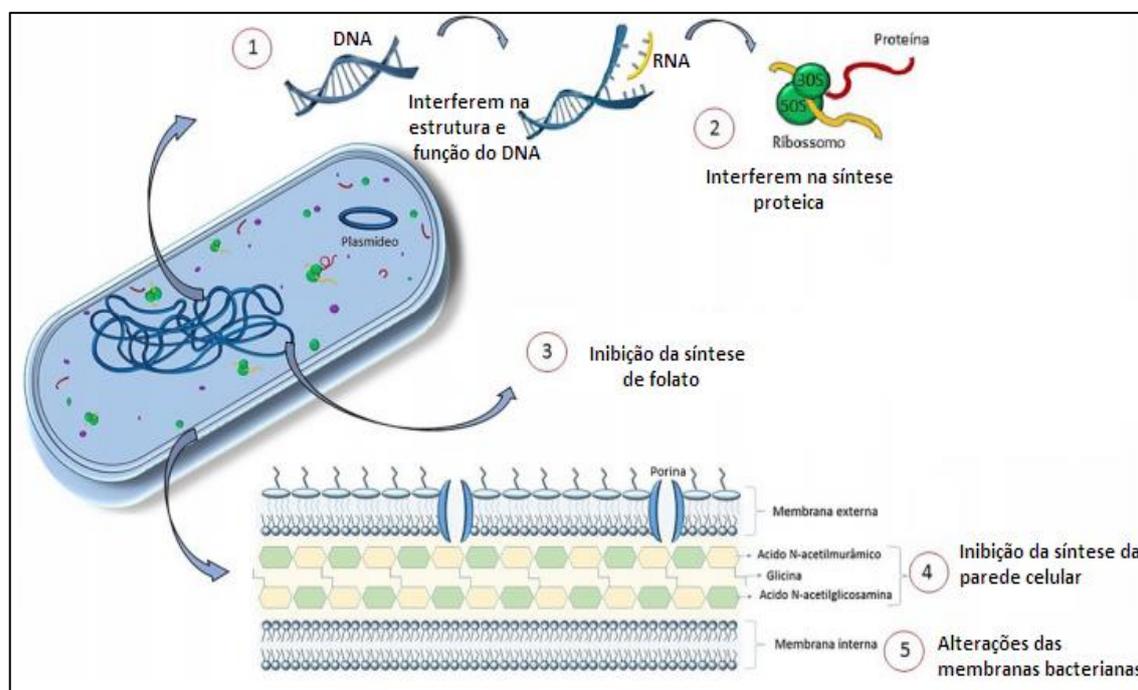
Na inibição da síntese protéica, os então inibidores exercem ação sobre os ribossomos bacterianos, que consistem em duas subunidades 50S e 30S, que confere a base para a seletividade na inibição da síntese protéica (NOGUEIRA *et al.*, 2016).

A membrana plasmática bacteriana possui permeabilidade seletiva, protegendo a célula de forças externas. O conteúdo e gradiente citoplasmático são controlados pelo transporte ativo por meio de proteínas transportadoras integrais. Quando antimicrobianos agem interrompendo a permeabilidade seletiva da membrana, os íons são perdidos e o gradiente de íons celulares é interrompido, portanto, o organismo sofre danos e morte celular pelas alterações nas membranas bacterianas (BROOKS *et al.*, 2012).

No DNA há algumas enzimas como a DNA-girase e a topoisomerase são essenciais para os procedimentos de síntese, replicação, reparo e transcrição. No entanto, essas enzimas podem ser alvos de ataques de agentes antibacterianos, atuando na inibição da síntese de ácidos nucleicos, que são fundamentais para o DNA bacteriano (MAXWELL, 1997).

Muitas espécies bacterianas necessitam sintetizar folatos (ácido fólico), para utilizar na síntese de DNA e RNA, uma vez que não conseguem captá-los do meio externo. Os antimicrobianos dessa classe agem inibindo sua síntese, desta forma, impedindo que sejam desempenhadas funções essenciais às enzimas, que

atuam na síntese de purinas, pirimidinas, aminoácidos e timidinas (NOGUEIRA *et al.*, 2016).



**Figura 14. Mecanismos de ação dos antimicrobianos**

Fonte: Adaptado de Nogueira *et al.* (2016).

### 3.7 Extração de Compostos Naturais

Nos últimos anos surgiu na comunidade científica um grande interesse em se produzir propostas de aplicações que possam contribuir para melhorar o aproveitamento dos recursos que a natureza nos oferece, bem como encontrar novas soluções para problemas relacionados à manutenção da vida e seu equilíbrio (SALES, 2015; MATHUR & HOSKINS, 2017).

A extração é um processo físico-químico de transferência de massa, a partir do contato entre solvente e amostra sólida, onde podem ser extraídos sólidos solúveis e voláteis (CLARK, 1985). A extração caracteriza-se como etapa fundamental para obtenção de compostos bioativos. O método de extração é determinante para se obter alto rendimento e pureza dos compostos de interesse (DANLAMI *et al.*, 2014).

As técnicas para a extração de compostos naturais evoluíram significativamente nos últimos anos, hoje existem diferentes metodologias no

processo de extração, utilizando diversos solventes orgânicos (RIBEIRO, 2007), como por exemplo, o etanol, metanol, hexano, acetona, acetato de etila, éter e água.

Durante a prática de extração dos compostos bioativos, diversos fatores exercem influências no rendimento e solubilidade do extrato. A extração de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada por sua natureza química, método de extração, tamanho da partícula do material, tempo, condições de armazenamento e a presença de substâncias interferentes (NACZK & SHAHIDI, 2004; PINELO *et al.*, 2005).

A solubilidade depende do solvente, mais especificamente da sua polaridade, bem como grau de polimerização dos fenólicos, interação dos fenólicos com outros constituintes e formação de complexos insolúveis (NACZK & SHAHIDI, 2004).

As características químicas do solvente, a estrutura e composição do exemplar vegetal apresentam uma relação específica material-solvente, no qual não é possível serem previstas facilmente (PINELO *et al.*, 2005). Portanto, não existe um método uniforme ou completamente satisfatório que seja adequado para a extração de todos os compostos fenólicos ou de uma classe específica (NACZK & SHAHIDI, 2004). Esse fato corrobora para a necessidade de seleção criteriosa do método de extração e escolha do melhor solvente para determinada fonte natural (CAETANO *et al.*, 2009).

### **3.8 Extração Convencional**

A extração convencional refere-se à recuperação de compostos bioativos de matrizes vegetais utilizando solventes convencionais, com ou sem emprego de tratamento térmico. Neste método de extração, a amostra vegetal é embebida em um solvente específico, geralmente homogeneizada sob agitação constante, assim as moléculas desejadas são extraídas com base nos fenômenos de difusão e transferência de massa (ROCCHETTI *et al.*, 2018).

Os métodos convencionais são relativamente muito simples, mas apresentam desvantagens, como baixa eficiência ou alto consumo de solvente (BARBA *et al.*, 2017). Alguns fatores são essenciais para melhorar o processo de

extração, pois influenciam no rendimento e devem ser avaliados antes da inicialização.

A matéria-prima deve ser preparada de forma que os princípios ativos da planta possam ser dissolvidos mais facilmente pelo solvente, dependendo da matriz, os compostos não são encontrados superficialmente, desta forma, o processo de moagem provoca um aumento da área de contato entre o solvente e a matriz sólida (PĂTRĂUȚANU *et al.*, 2019).

A presença de altos níveis de água competem com o solvente pela dissolução do soluto, afetando a taxa de transferência de massa. Desta forma, deve priorizar pela secagem do material de modo que não prejudiquem suas propriedades físico-químicas e causem degradação dos compostos (PEREIRA & MEIRELES, 2010; BELESSIOTIS & DELYANNIS, 2011).

Os compostos de interesse podem ser obtidos por meio da seletividade do solvente e temperatura de extração. Na escolha do solvente deve se considerar ainda, a viscosidade, densidade, volatilidade, ponto de ebulição, reatividade, toxicidade e custos. Altas temperaturas promovem aumento da solubilidade do soluto no solvente, aumentando a taxa de difusão e promovendo aumento na taxa de transferência de massa, entretanto, em altas temperaturas acarretam na degradação de compostos termo sensíveis (NACZK & SHAHIDI, 2006; REZAIE *et al.*, 2015; CHE SULAIMAN *et al.*, 2017).

### 3.8.1 Extração de Óleos e Gorduras - Goldfish

O método de Goldfish utiliza o extrator de óleos e gorduras. Este método é um exemplo de extração lipídica contínua, onde o solvente em ebulição flui continuamente sobre a amostra envolvida em papel filtro, em um sistema de refluxo contínuo (NIELSEN, 2017).

O método de Goldfish é muito semelhante ao método de Soxhlet, no primeiro, a câmara de extração é projetada de modo que o solvente escoie apenas através da amostra ao invés construir em torno dela. Essa característica do método reduz o tempo necessário para realizar a extração (CUNHA, 2011).

Os métodos contínuos oferecem extração mais rápida e eficiente do que os demais métodos de extração semicontínuos. No entanto, eles podem causar

canalização, ou seja, o solvente pode criar certas rotas através da amostra resultando em uma extração incompleta (NIELSEN, 2017).

### 3.9 Família Myrtaceae

Espécies nativas representam um grande potencial econômico, além de constituírem um patrimônio genético e cultural de inestimável valor. Uma das grandes riquezas do Brasil é sua ampla diversidade biológica, essencial para o desenvolvimento da indústria biotecnológica (CARVALHO; SILVA & MEDEIROS, 2009).

Dentre as espécies, destaca-se a família Myrtaceae, representando a maior parte desta riqueza botânica, com aproximadamente 5800 espécies distribuídas em 121 gêneros, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (FRANZON *et al.*, 2009; STEFANELLO; PASCOAL & SALVADOR, 2011).

A família Myrtaceae compreende espécies arbustivas ou arbóreas, sendo uma das famílias mais importantes de lenhosas dominantes na Mata Atlântica. Apresenta folhas inteiras, de disposição alterna ou oposta, com estípulas pequenas. De modo geral, suas flores são brancas, efêmeras hermafroditas, de simetria radial (JOLY, 1966; STEFANELLO; PASCOAL & SALVADOR, 2011).

São plantas aromáticas que produzem frutas frescas do tipo bagas, possuindo desejáveis características nutricionais e quantidades significativas de fitoquímicos, como ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, polifenóis e minerais, sendo assim, seu consumo é altamente recomendado. Alguns desses compostos são largamente conhecidos por possuírem potencial antioxidante, com capacidade de inativar espécies reativas de oxigênio (FARIAS *et al.*, 2020).

Muitas espécies da família Myrtaceae além de apresentarem potencial para produção de frutas podem a médio e longo prazo constituírem importância científica, principalmente pela diversidade de compostos naturais com propriedades benéficas a saúde (FRANZON *et al.*, 2009).

Algumas espécies da família Myrtaceae são frequentemente usadas na medicina popular, seus óleos essenciais foram analisados para várias atividades, e a maioria exibiam efeito citotóxico, antioxidante, antilarval, anti-inflamatório e principalmente antifúngico e antibacteriano (STEFANELLO; PASCOAL &

SALVADOR, 2011). Segundo Kalemba e Kunicka (2003), sua bioatividade está associada à presença de compostos fenólicos ou ao alto nível de terpenos.

Uma das características da família Myrtaceae é a presença de terpenos, compreendendo algumas das mais altas concentrações de terpenos foliares no reino vegetal, despertando grande interesse industrial, devido às propriedades medicinais que eles apresentam (KESZEI; BRUBAKER & FOLEY, 2008). Desta forma, demonstrando a necessidade de realizar estudos em espécies da família Myrtaceae com potencial para exploração.

O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente mil espécies, distribuídas principalmente nas Américas Central e do Sul (MERWE, 2005). Segundo Zappi *et al.* (2015), entre as angiospermas, o gênero *Eugenia* possui a maior diversidade do Brasil, com 387 espécies, sendo que 78% (302 espécies) são endêmicas.

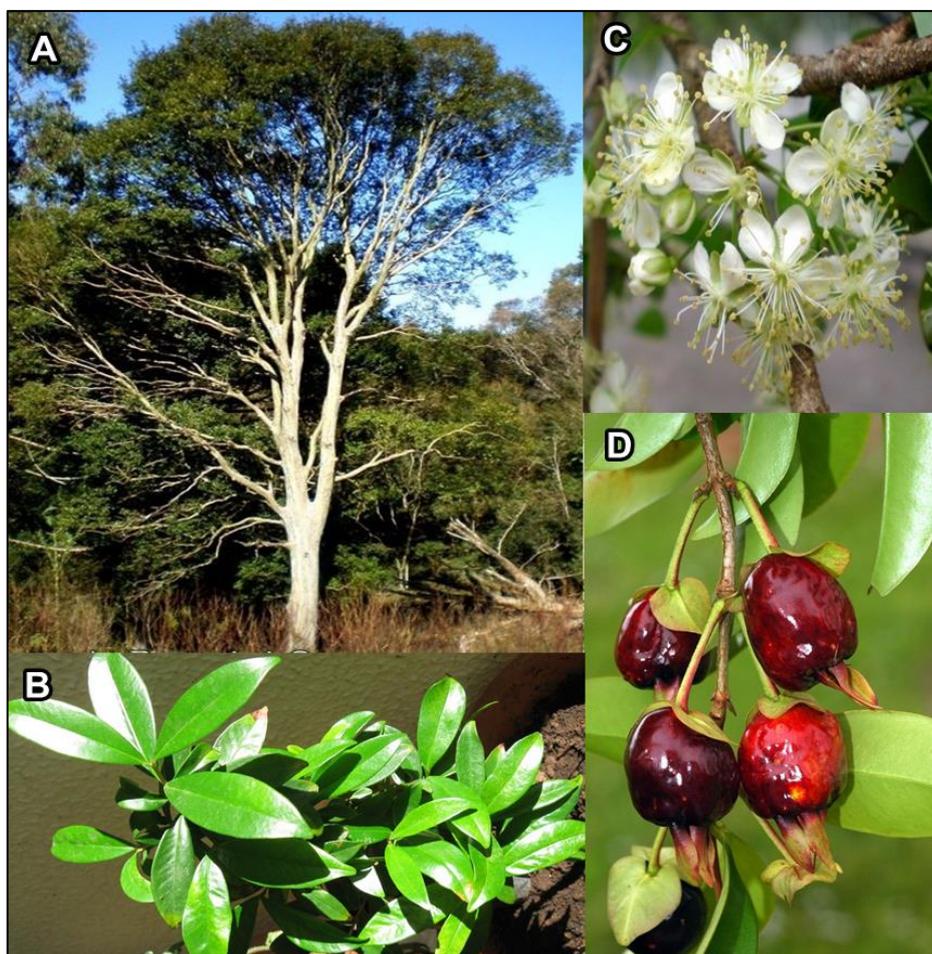
O gênero possui representantes na forma arbustiva e arbórea, no qual o caule pode alcançar de três a quinze metros de altura. Os botões florais são abertos com quatro sépalas de tamanhos desiguais e com pétalas tetrâmeras semelhantes. Os frutos são do tipo bagas globosas ou elipsóides, com uma a três sementes. Apresentam diversas colorações, variando em amarelos, alaranjados, vermelhos, vináceos e até pretos quando maduros (QUEIROZ *et al.*, 2015).

Além do seu potencial para a produção de frutas, tanto para consumo *in natura* quanto para a agroindústria, algumas espécies são usadas na medicina popular, o que têm despertado atenção da indústria farmacêutica, submetendo-as a estudos químicos e avaliações de suas ações farmacológicas. Muitas espécies produzem frutas ricas em vitaminas e compostos com ação antioxidante, bem como óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e demais partes da planta (FRANZON *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais de *Eugenia* são caracterizados por sua diversidade química, sendo identificados mais de 300 compostos, com predominância de sesquiterpenos e monoterpenos (STEFANELLO; PASCOAL & SALVADOR, 2011). As cores vibrantes dos frutos das espécies de *Eugenia* indicam a presença de compostos como as antocianinas e outros derivados fenólicos (QUEIROZ *et al.*, 2015).

### 3.9.1 Cerejeira

A cerejeira (*Eugenia involucrata* DC.) (Figura 15), também conhecida popularmente como cerejeira-do-mato, pitanga-preta e cereja-do-rio-grande, tem sua origem no Sul do Brasil, podendo ocorrer de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (FRANZOM, 2004). É caracterizada como uma espécie arbustiva ou arbórea, podendo atingir dimensões próximas a 15 metros de altura. Seu tronco é reto, com casca externa lisa e de coloração acinzentada-clara, sendo que ao longo do desenvolvimento, o tronco solta a casca em forma de placas (DEGENHARDT; FRANZON & COSTA, 2007; CARVALHO, 2009).



**Figura 15. *Eugenia involucrata*: (A) Cerejeira; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Frutos.**

Fonte: Silva (2010); Bordignon (2013); Bagatini (2014), Bagatini (2014b).

As folhas são simples, glabras com disposição oposta, possuindo coloração verde-escuro e de superfície brilhante, medindo de 5 a 9 cm de comprimento (LORENZI, 2002). Segundo Degenhardt, Franzon e Costa (2007),

não há necessidade de sombreamento, e devido suas características, podem ser utilizadas em fases iniciais de reflorestamento de áreas degradadas.

A floração ocorre no início da primavera, desabrochando flores brancas, hermafroditas, vistosas, pentâmeras e com muitos estames. As flores ocorrem isoladas ou em grupos de duas a quatro, nas axilas foliares (FRANZOM, 2004; CARVALHO, 2009).

A maturação dos frutos inicia-se na primeira semana de novembro, estendendo-se até a segunda semana de dezembro. Os frutos nascem em ramos finos, na ponta dos galhos. São do tipo baga, piriformes, lisos, de coloração verde quando imaturos, tornando-se vermelho e apresentando coloração brilhante negro-violáceo quando maduros. Em seu interior geralmente é encontrado uma semente, de coloração cinéreo-amarelada e de formato irregular. Os frutos apresentam aroma característico, sabor agridoce, permitindo sua utilização em uma variedade de produtos (LORENZI, 2002; FRANZOM, 2004; CARVALHO, 2009).

Na medicina popular, suas folhas são empregadas na forma de chás, com ação antidiarréica e digestiva (MARIN *et al.*, 2008). De acordo com Vechi (2015), as folhas da cerejeira apresentam moderada atividade antimicrobiana, utilizando extrato bruto metanólico, algumas bactérias gram-positivas e a levedura *Candida albicans* demonstraram sensibilidade.

Alguns estudos fitoquímicos dos extratos de *E. involucrata* revelaram a presença de esteróides, terpenos e flavonoides, principalmente em suas sementes, com maior concentração de compostos fenólicos (ALMEIDA, 2013).

Rosa (2013) observou em sua pesquisa, potencial gastroprotetor e atividade antiúlcera para extratos metanólicos das sementes de *E. involucrata*. As vias de ação foram relacionadas a participação de óxido nítrico e grupamentos sulfidrilas, sendo vias participantes no aumento do fluxo sanguíneo e da atividade antioxidante.

Segundo Araujo *et al.* (2012), a geléia de cerejeira pode ser considerada uma boa fonte de compostos bioativos antioxidantes. Os teores de compostos fenólicos totais são elevados em *E. involucrata*, seja na fruta *in natura* ou em sua geléia, com abundante conteúdo de antocianinas totais.

Infante *et al.* (2013) avaliaram seu potencial antioxidante através de extratos etanólicos de folhas, cascas, sementes e polpa de *E. involucrata*,

encontrando principalmente em suas folhas compostos fenólicos, como catequina e epicatequina. Os resultados também demonstraram efeito antioxidante contra radicais de relevância biológica, como peroxila e superóxido.

### 3.9.2 Jambolão

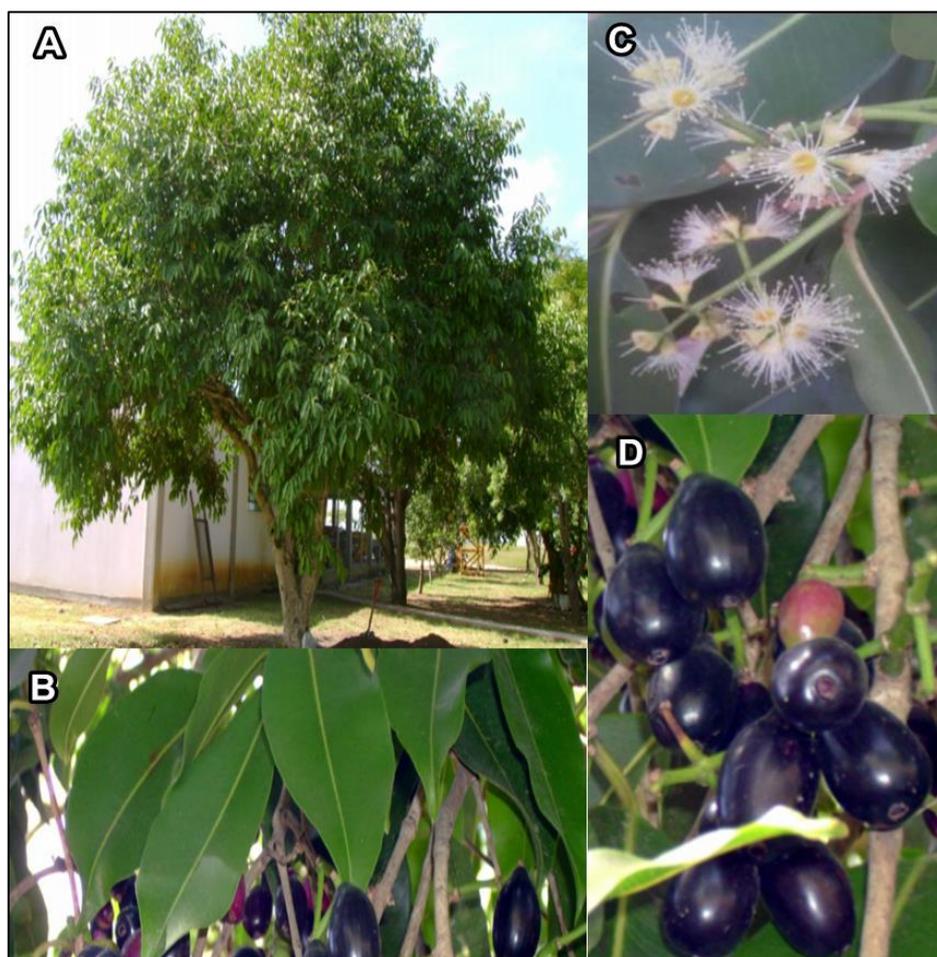
O jambolão (*Eugenia jambolana*) (Figura 16) é uma espécie do continente asiático, e devido sua adaptabilidade é encontrado em regiões de climas tropicais e subtropicais, ainda em vários países do continente africano e da América Latina. No Brasil, a maioria das frutíferas jambolananas são encontradas em costas, planícies, serras e planaltos, prosperando em vários tipos de solo (VIZZOTTO & PEREIRA, 2008; SABINO; BRITO & SILVA-JÚNIOR, 2018). Devido sua dispersão geográfica possui diferentes denominações populares como jamelão, jalão, jambolana, azeitona-do-nordeste entre outros, apresentando ainda várias sinonímias científicas, dentre elas: *Syzygium cumini* (L.) Skeels e *Syzygium jambolanum* D.C. (MIGLIATO *et al.*, 2006; SABINO; BRITO & SILVA-JÚNIOR, 2018).

É descrita como espécie arbórea, perene e de grande porte, podendo alcançar 15 metros de altura, com copa de 3 a 4,5 metros de projeção. Possui caule aéreo, ereto, cilíndrico e lenhoso, com ramificação caulinar (MIGLIATO *et al.*, 2006). Sua folhagem é abundante, com folhas simples e dispostas em filotaxia oposta, pecioladas, alongadas ou oblongas, com 6 a 12 centímetros de comprimento, possuindo coloração verde-escuro, de superfície lisa e brilhante (MIGLIATO *et al.*, 2006; SABINO; BRITO & SILVA-JÚNIOR, 2018).

A floração começa em setembro prolongando-se até novembro, apresenta flores pequenas e numerosas, de coloração branca a creme. As flores estão dispostas em inflorescências axilares, racemosas com várias flores no mesmo peduncúlo. As flores são hermafroditas, com cálice gamossépalo e corola dialipétala (ALBERTON *et al.*, 2001; MIGLIATO *et al.*, 2006; SABINO; BRITO & SILVA-JÚNIOR, 2018).

A frutificação do jambolão ocorre de janeiro a maio e os frutos são do tipo baga, podendo ser redondos ou oblongos, medindo cerca de 1,25 - 5 centímetros de comprimento, com epicarpo fino, liso, brilhante e aderente. Sua coloração, inicialmente branca, torna-se vermelha e posteriormente preta, quando os frutos

estão maduros. O jambolão ainda possui uma semente única de cor verde ou marrom e consideravelmente grande se comparado ao seu tamanho, envolta por mesocarpo muito suculento. Apesar de pouco adstringente, tem sabor agradável ao paladar. O principal mineral encontrado nessa fruta é o fósforo e a vitamina em maior abundância é a vitamina C (MORTON, 1987; BRASIL, 2015).



**Figura 16. *Eugenia jambolana*: (A) Jambolão; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Frutos.**

Fonte: Vizzotto e Pereira (2008); Sabino; Brito; Silva-Júnior (2018).

O Jambolão possui uma composição química complexa, rica em diferentes compostos químicos com propriedades nutricionais e biológicas, que têm despertado interesse, principalmente por sua ação antioxidante (LUZIA & JORGE, 2009b; SABINO; BRITO & SILVA-JÚNIOR, 2018).

As diferentes partes da planta do jambolão são citadas na literatura por possuir propriedades medicinais, sendo amplamente utilizadas na medicina popular, com ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória,

antialérgica, quimiopreventiva, com efeitos antioxidantes, hepatoprotetores, antidiarréicos e hipoglicêmicos (BALIGA *et al.*, 2011).

Há relatos da ação antimicrobiana do óleo essencial e extratos metanólicos e de acetato de etila a partir das sementes, sobre alguns microrganismos gram-positivos e gram-negativos (ALBERTON, 2001). Ainda, extratos aquosos de etanol e hexano de folhas, frutos, raiz e caule foram eficazes na inibição da crescimento de *Ascochyta rabiei*, agente causador da praga em grão de bico (*Cicer arietinum* L.), sugerindo seu uso na prevenção de infestação de alimentos por fungos (JABEEN & JAVAID, 2010).

Segundo Faria, Marques e Mercadante (2011), os frutos do jambolão são caracterizados por apresentar alta atividade antioxidante, com rica fonte de ácidos fenólicos, flavonas e flavonoides, como ácido gálico, miricetina, e antocianinas, eficazes na eliminação dos radicais livres, que podem agravar doenças humanas importantes como artrite, câncer, Alzheimer, Parkinson, AIDS e complicações diabéticas (BALIGA *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar dos indícios científicos que comprovam a ação do jambolão, no Brasil, não há evidências quanto ao uso do fruto como matéria-prima industrial, restringindo-o apenas a consumo *in natura* e de produção doméstica (SABINO; BRITO & SILVA-JÚNIOR, 2018).

### 3.9.3 Pitangueira

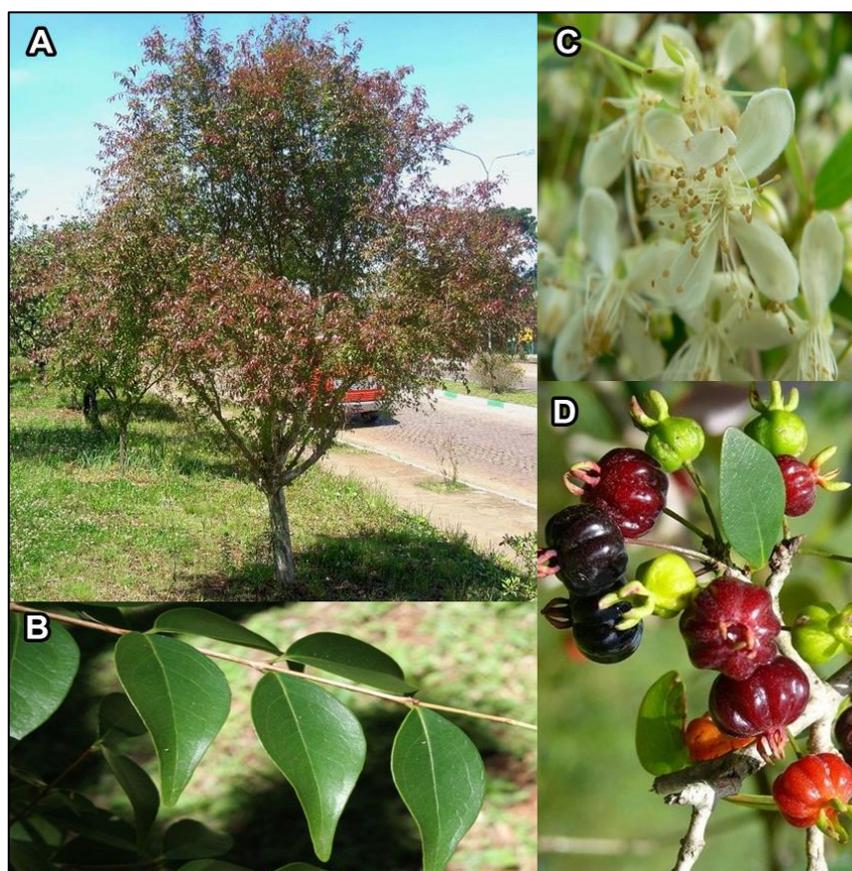
A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (Figura 17), apresenta-se na natureza como um arbusto ou árvore semidecídua, podendo alcançar 10 metros de altura, com copa estreita e tronco liso de cor pardo-clara. Possui sistema radicular profundo, com uma raiz pivotante e numerosas raízes secundárias e terciárias (LORENZI & MATOS, 2002; BEZERRA; LIRA-JUNIOR & SILVA-JUNIOR, 2018).

As folhas são simples, com tamanhos de 3 a 7 centímetros de comprimento, são ovais e avermelhadas quando jovens e, posteriormente, adquirem cor verde-intensa. São brilhantes e apresentam aroma característico quando maceradas (LORENZI & MATOS, 2002; BRASIL, 2015).

As flores de *E. uniflora* são brancas, aromáticas, hermafroditas, possuindo corola com 4 pétalas livres. São encontradas de modo solitário ou em grupos de 2

ou 3, presentes nas axilas e nas extremidades dos ramos (LORENZI & MATOS, 2002; BEZERRA; LIRA-JUNIOR & SILVA-JUNIOR, 2018).

A frutificação ocorre de outubro a janeiro, resultando em frutos do tipo baga e globosos, com sete a dez sulcos longitudinais de 1,5 a 5,0 centímetros de diâmetro, coroado com sépalas persistentes. São frutos brilhantes, e no processo de maturação o epicarpo passa de verde para amarelo, alaranjado, vermelho e vermelho-escuro, podendo chegar a negro. Sua polpa é carnosa e agri-doce, contendo 1 semente grande ou 2-3 pequenas (LIMA; MELO & LIMA, 2002; LORENZI & MATOS, 2002; BRASIL, 2015).



**Figura 17. *Eugenia uniflora*: (A) Pitangueira; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Frutos.**

Fonte: Giehl (2008); Molz (2009); Bordignon (2014); Bagatini (2015).

A pitangueira é uma espécie nativa, porém, não endêmica do Brasil, devido sua adaptabilidade, foi disseminada e é cultivada nas mais variadas regiões, com distribuição geográfica no Paraguai, Argentina e Uruguai. No Brasil ocorre no Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul,

Santa Catarina), habitando os biomas Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (FLORA DO BRASIL, 2020b).

A pitangueira vegeta e produz muito bem em climas quentes e úmidos, embora se adapte a regiões de clima temperado e a diferentes altitudes, crescendo adequadamente em variados tipos de solo. É resistente a fortes ventos, geadas ou temperaturas negativas, e também possui tolerância à seca, desenvolvendo-se bem em condições semiáridas, no entanto para sua sobrevivência é indispensável uma mínima quantidade de água (BEZERRA; LIRA-JUNIOR & SILVA-JUNIOR, 2018).

A pitanga é uma espécie com boa versatilidade dos frutos, muito utilizada pela indústria cosmética brasileira por suas propriedades adstringentes e cheiro agradável. É aplicada principalmente em xampus, condicionadores, sabões, óleos corporais e perfumes (AMORIM *et al.*, 2009). Além de serem utilizados na cosmetologia, é amplamente utilizado na indústria alimentícia, fornecendo geléias, doces, refrescos, sorvetes, licores e vinhos, todos de apreciável qualidade (SILVA & LIMA, 2016).

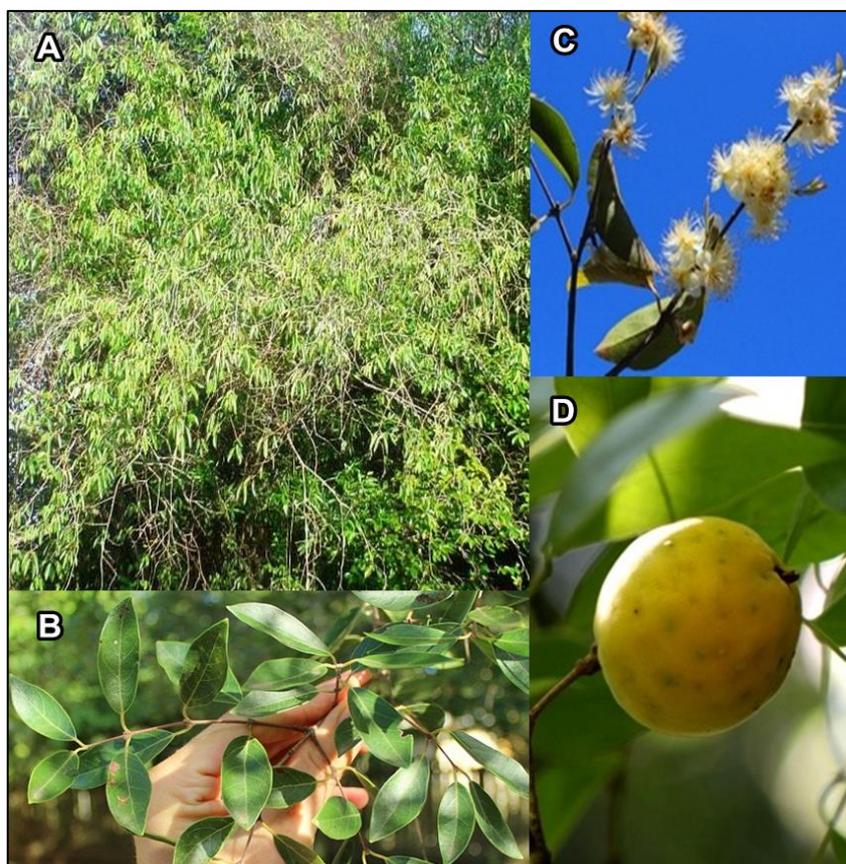
A pitangueira possui potencial medicinal, sendo que suas folhas e frutos são conhecidos por suas inúmeras propriedades terapêuticas. Na medicina popular brasileira, folhas e frutos de *E. uniflora* têm sido amplamente utilizados na forma de infusões com ação antirreumática, antidisentérica, febrífugo e hipoglicêmica (SILVA & LIMA, 2016; MOURA *et al.*, 2018). Alguns autores encontram ação antimicrobiana e antioxidante para os extratos de *E. uniflora* (OGUNWANDE *et al.*, 2005; AMORIM *et al.*, 2009).

Em levantamentos fitoquímicos, os exemplares demonstraram alto teor de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, terpenos, taninos e antraquinonas, responsáveis pelos mais variados tipos de atividades farmacológicas (AMORIM *et al.*, 2009).

Segundo Santos, Braz-Filho e Castro (2015), a idade foliar influencia na composição química e na concentração das substâncias presentes no óleo essencial. Alterações de concentração destes metabolitos podem ser determinados pelo quimiotipo, origem, solo, condições climáticas e métodos de extração (MARGIS *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2009).

### 3.9.4 Pessegueiro-do-mato

A *Eugenia myrcianthes* (sin. *Hexachlamys edulis*) (Figura 18), conhecida popularmente como pessegueiro-do-mato, ivaí, pêsego-do-mato, ibája ou uvaíão, produz frutos comestíveis com utilização na produção de sucos e geléias (BATALHÃO, 2014). É uma espécie nativa, mas não endêmica para o Brasil. Possui distribuição geográfica no Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), habitando os biomas da Mata Atlântica e Savana do Brasil Central (FLORA DO BRASIL, 2020).



**Figura 18. *Eugenia myrcianthes*: (A) Pessegueiro-do-mato; (B) Folhas; (C) Flores, (D) Fruto.**  
Fonte: Santos (2010); Silva (2014); Machado (2018), Machado (2019).

Segundo Romagnolo e Souza (2004), é uma espécie arvorea ou arbórea, medindo de 8 a 15 metros de altura. Possui tronco ereto, com ramificações tortuosas, pouco suberosas e com casca castanho-acinzentada. Os ramos são glabros e pouco ásperos, os mais jovens são comprimidos lateralmente e

densamente pilosos. Suas folhas são simples, aromáticas, com disposição oposta, de formato lanceolado e de pêlos curtos nas nervuras (REYES, 2003).

A floração ocorre de agosto a outubro, suas flores são brancas, pequenas e numerosas, apresenta 5 pétalas e 5 sépalas semelhantes, de formato triangular, entretanto, às vezes três são maiores e duas menores. Presentes em racemos curtos, geralmente em ramos jovens com folhas novas. Possui odor agradável, podendo ser usada na indústria de perfumaria (REYES, 2003; ROMAGNOLO & SOUZA, 2004).

De acordo com Reyes (2003), a frutificação ocorre de outubro a dezembro, resultando em frutos amarelos, do tipo baga, subgloboso ou globoso, de 3 centímetros ou mais, levemente pubescentes. Apresenta uma semente grande de coloração castanho-clara.

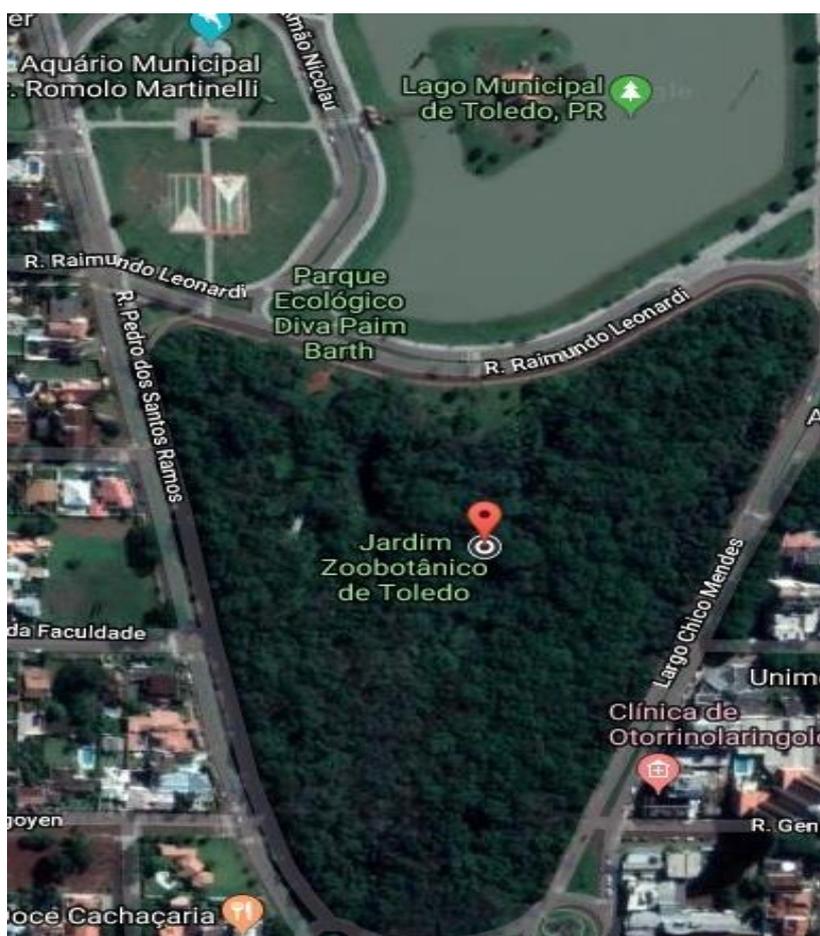
Na medicina popular, as folhas de *E. myrcianthes* são utilizadas para o tratamento da diabetes sob a forma de chás (LORCA; AMAT & GONZÁLEZ, 1995). No óleo essencial de *E. myrcianthes* há predomínio de sesquiterpenos, dos quais o  $\beta$  - selineno (16,1%),  $\beta$  - cariofileno (8,3%) e  $\delta$  - cadadeno (8,3%) são os compostos mais abundantes. Os sesquiterpenos são frequentemente utilizado como antibióticos naturais (APEL *et al.*, 2005).

Segundo Apel *et al.* (2005), o extrato hidroalcoólico de *E. myrcianthes* inibe a enzima xantina oxidase *in vitro*, responsável por gerar espécies reativas de oxigênio, sendo que a presença de flavonoides e taninos, são compostos responsáveis por essa atividade inibidora. Schmeda-Hirschmann *et al.* (1996), isolaram vários flavonoides do extrato aquoso de acetona de *E. myrcianthes*. Os flavonoides eram principalmente miricetina e quercetina com atividade inibitória em relação à xantina oxidase.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da matéria-prima

As folhas da cerejeira (*Eugenia involucrata*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), jambolão (*Eugenia jambolana*) e pessegueiro-do-mato (*Eugenia myrcianthes*) foram coletadas em novembro de 2018 no Jardim Zoobotânico do município de Toledo-PR, com orientação geográfica 24°43'31.8"S 53°44'42.3"W -24.72549, -53.74508 (Figura 19). As amostras foram inicialmente armazenadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório LPS (Laboratório de Processos de Separação – Unioeste). Os espécimes vegetais foram identificados pelo herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – HERBÁRIO UNOP, sob o número de registro UNOP 10444, 10445, 10568 e 10464, respectivamente.



**Figura 19. Jardim Zoobotânico de Toledo.**

Fonte: Google Maps (2019).

## 4.2 Preparo da matéria-prima

As folhas foram desidratadas por meio da secagem natural, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante oito dias. Após secas, as folhas foram moídas em liquidificador comercial, e as partículas resultantes classificadas de acordo com a série padrão de peneiras Tyler. O processo consiste na passagem das partículas através de malhas progressivamente menores, até sua retenção. Para padronização, foram utilizadas as peneiras 20, 24, 35, 48 e 60 mesh, após a distribuição, o material obtido foi armazenado sob refrigeração em temperatura de -15C.

## 4.3 Caracterização da matéria-prima

### 4.3.1 Determinação do diâmetro médio das partículas

Para determinação do perfil granulométrico das partículas, as amostras vegetais foram expostas em agitador eletromagnético, na série padrão de peneiras Tyler de 20, 24, 35, 48 e 60 mesh (Bertel, Caieiras, São Paulo, Brasil) com agitação vertical vibratória durante 15 minutos. Para análise de dados, a massa das frações retidas em cada peneira foi pesada e a média aritmética das aberturas das malhas foram calculadas de acordo com as equações 1 e 2, propostas por Gomide (1983).

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

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad Eq. 2$$

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.

#### 4.3.2 Determinação da umidade do material vegetal

Para determinação do teor de umidade foi utilizado o método gravimétrico, que consiste na perda de massa pela remoção de água e substâncias voláteis por evaporação em estufa de secagem. Em triplicata, foram pesadas aproximadamente 5 gramas da amostra vegetal em balança analítica (AUX220 - Shimadzu), acondicionadas em placa de petri devidamente tarada e encaminhadas a estufa a 105 °C. Após, foram retiradas da estufa e transferidas para dessecador contendo sílica gel durante 1 hora, para resfriamento até temperatura ambiente, e em seguida novamente pesadas, este processo se repetiu até obtenção de massa constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre a massa antes e pós dessecação, de acordo com a equação 3.

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

Em que:

*Mu*: massa da amostra úmida;

*Ms*: massa da amostra seca.

#### 4.4 Obtenção dos extratos

##### 4.4.1 Extração convencional – Método Goldfish

Os extratos das folhas da cerejeira, pitangueira, jambolão e pessegueiro-do-mato foram obtidos por extração convencional, em extrator de óleos e gorduras – Goldfish, utilizando os solventes líquidos etanol (Neon P.A.), acetato de etila (Anidrol, P.A.) e hexano (Anidrol, P.A.). Estes solventes foram escolhidos devido às diferenças de polaridade, o etanol é considerado um solvente polar, o acetato de etila apresenta polaridade intermediária, enquanto o hexano é apolar. Os índices de polaridade distintos estão indicados na Tabela 5.

A extração convencional pelo método Goldfish (Figura 20) foi realizada em extrator de gorduras do Laboratório de Grupo de Pesquisa em Recursos

**Tabela 5. Índice de polaridade de solventes utilizados no processo de extração convencional.**

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

Fonte: adaptado de BYERS, 2009.



**Figura 20. Aparelho extrator de óleos e gorduras - Goldfish**

Fonte: TECNAL (2016).

A análise consiste na passagem constante do solvente pela amostra na concentração de 1:10 massa/volume (10 g de amostra para 100 mL de solvente). A amostra vegetal foi acondicionada em cartucho de celulose e acoplada em frasco reboiler contendo solvente, de modo que a amostra ficasse submersa. O início da extração foi contabilizado a partir do início da fervura do solvente, em aquecimento contínuo a 100C por 90 minutos, em seguida, a amostra foi suspensa, recebendo apenas gotejamento do solvente aquecido a 130C,

percolando a amostra durante 60 minutos, por fim a recuperação do solvente foi realizada aos 30 minutos finais da análise, com o fechamento da válvula.

Após a extração, os extratos foram secos em estufa a 60C até completa evaporação do solvente, sendo armazenados em fracos âmbar e mantidos sob refrigeração. A avaliação de rendimento das extrações foi calculada a partir da razão entre a massa inicial da matéria-prima utilizada e a massa obtida de extrato, de acordo com a equação 4.

$$R(\%) = \frac{m \text{ Extrato}}{m \text{ Massa amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Em que:

$R(\%)$  = rendimento global de extração;

$m_{\text{Extrato}}$  = massa de extrato obtida após o processo de extração;

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

Nesta etapa foram obtidos doze extratos convencionais (Figura 21): Cerejeira/Etanol (CerET), Cerejeira/Acetato de Etila (CerAE), Cerejeira/Hexano (CerHX), Pitangueira/Etanol (PitET), Pitangueira/Acetato de Etila (PitAE), Pitangueira/Hexano (PitHX), Jambolão/Etanol (JamET), Jambolão/Acetato de Etila (JamAE), Jambolão/Hexano (JamHX), Pessegueiro-do-mato/Etanol (PesET), Pessegueiro-do-mato/Acetato de Etila (PesAE) e Pessegueiro-do-mato/Hexano (PesHX).

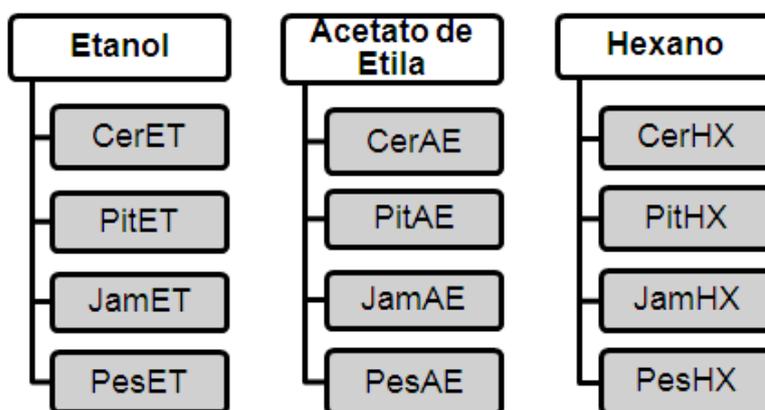


Figura 21. Fluxograma dos extratos obtidos por método Goldfish

## 4.5 Caracterização dos extratos

Os extratos foram avaliados quanto a sua composição fitoquímica, flavonoides totais, teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

### 4.5.1 Testes fitoquímicos

Testes fitoquímicos preliminares de colorimetria e precipitação foram realizados de acordo com metodologia previamente descrita (GOYAL; MIDDHA & 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. A amostra foi aquecida até fervura, em banho-maria. Após resfriamento, realizou-se a solução para determinação de taninos e saponinas.

Para o teste de taninos, em tubo de ensaio contendo 2 mL de S1 foi adicionado 1 mL de cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ). A formação de um precipitado preto-azulado ou preto-esverdeado, confirma a presença de taninos.

Para saponinas, em tubo de ensaio adicionou-se 0,5 mL da S1 e 5 mL de água deionizada. O tubo foi vedado com papel alumínio e agitado vigorosamente por 30 segundos. Em tubos com formação de espuma, 5 gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado foram adicionadas sobre a amostra. A permanência da espuma no tubo indica a presença de saponinas.

O teste de flavonoides baseia-se na reação de Shinoda, onde é pesado 100 mg do pó da amostra, e acrescentados 2,5 mL de etanol, agitando até a extração dos compostos. Transferiu-se 1 mL desta solução para tubo de ensaio, e adicionou-se 2 fragmentos de magnésio metálico. Pela parede do tubo, gotejou-se de 5 a 10 gotas de HCl concentrado. Após alguns minutos reagindo, o aparecimento de coloração rosa, laranja ou vermelha, caracteriza resultado positivo para flavonoides.

Para teste de alcaloides, pesaram-se 100 mg de pó da amostra e adicionou-se 10 mL de uma solução de etanol 50% à 1% de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), esta mistura foi colocada em banho-maria até fervura, após, resfriada e filtrada, foram adicionadas 3 gotas de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) concentrado

juntamente com 10 mL de clorofórmio, agitando-a vagarosamente, coletando a camada de clorofórmio formada. Em seguida evaporou-se todo o clorofórmio em banho-maria, e o resíduo foi ressuspenso com 1 mL de ácido clorídrico diluído a 1%. Por fim, adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer, o aparecimento de precipitado de cor vermelho-alaranjado ou vermelho acastanhado indica a presença de alcaloides.

Para presença de antraquinonas, realizou-se o teste de Borntrager, em 80 mg da amostra adicionou-se 4 mL de clorofórmio, mantendo sob agitação. A solução obtida foi filtrada e 2 mL do filtrado transferido para um tubo de ensaio. Cuidadosamente adicionou-se pela parede do tubo 2 mL de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) a 10%. O aparecimento de precipitado ou a formação de um anel rosa ou roxo na solução confirma a presença de antraquinonas.

#### *4.5.2 Determinação do teor de flavonoides totais (TFC)*

O teor de flavonoides totais (TFC) dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Chang *et al.* (2002). Uma porção (0,5 mL) de solução etanólica (1 mg·mL<sup>-1</sup>) de extrato foi acrescida a 1,5 mL de etanol 95%, 0,1 mL de uma solução de cloreto de alumínio a 10%, 0,1 mL de uma solução 1 M de acetato de potássio e 2,8 mL de água destilada. As soluções foram mantidas em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos, as absorvâncias das misturas foram medidas a 415 nm contra o branco (todos os reagentes sem extrato) usando espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão). A Quercetina foi utilizada como padrão para obter a curva de calibração (0–200 mg·mL<sup>-1</sup>) e os resultados foram expressos em miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ·gextrato<sup>-1</sup>) por meio da equação da regressão linear (R<sup>2</sup>=0,999).

#### *4.5.3 Determinação da atividade antimicrobiana pela Concentração Bactericida Mínima (CBM)*

A Concentração Bactericida 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 grande interesse, conforme Tabela 6.

**Tabela 6. Classificação de Gram.**

<b>Gram-Positivo</b>	<b>Gram-Negativo</b>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i>

Fonte: Autora, 2020.

Foram adicionados 90 µL de caldo nutriente nos orifícios das microplacas (Figura 22). A partir da terceira coluna adicionou-se 90 µL dos extratos na concentração de 80 mg/mL e em seguida transferiu-se 90 µL para a coluna subsequente e assim sucessivamente, até chegar na décima coluna. As concentrações dos extratos nos poços encontram-se descritas na Tabela 7.

**Tabela 7. Concentrações (mg/mL) dos extratos nos poços das microplacas.**

<b>Coluna</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
3 <sup>o</sup>	80
4 <sup>o</sup>	40
5 <sup>o</sup>	20
6 <sup>o</sup>	10
7 <sup>o</sup>	5
8 <sup>o</sup>	2,5
9 <sup>o</sup>	1,25
10 <sup>o</sup>	0,625

Fonte: Autora, 2020.

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

A incubação das microplacas em estufa bacteriológica ocorreu a 37C por período de 24 horas. Para visualização dos resultados, transferiu-se 5 µL do conteúdo de cada orifício para placas contendo meio ágar Mueller Hinton, após 24 horas de incubação a 37C foi verificado o aparecimento de unidades formadoras

de colônia (UFC), avaliando a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada extrato testado.

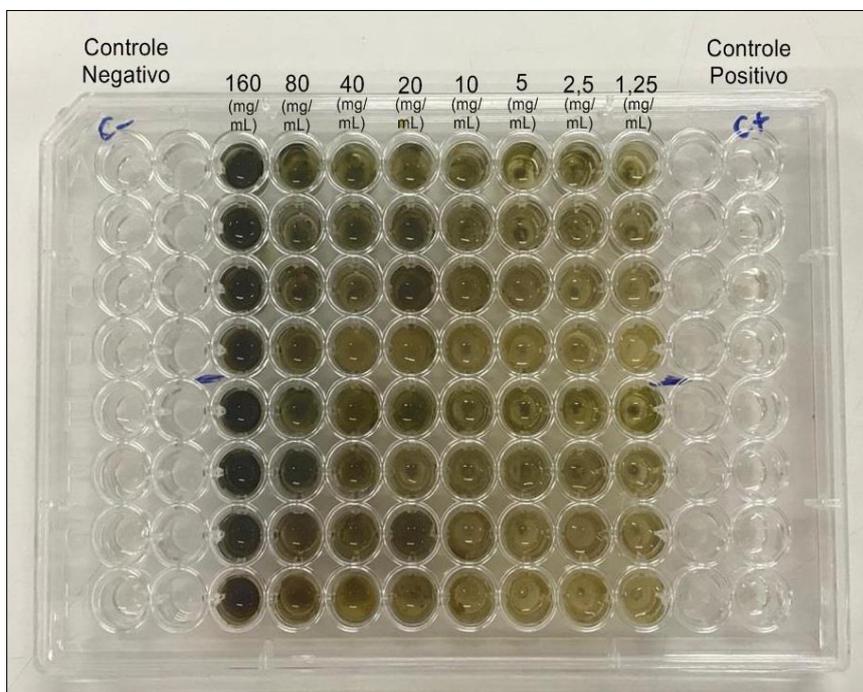


Figura 22. Microplaca com os extratos diluídos

#### 4.5.4 Determinação do teor de compostos fenólicos (TFT) pelo método Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, a técnica utilizada foi adaptada de Aspé e Fernández (2011), e consiste na utilização de ácido gálico como padrão de referência. Para o teste, os extratos foram diluídos em etanol, obtendo-se concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Uma alíquota de 0,3 mL de amostra foi transferida para tubo de ensaio e lhe foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% e mantido em repouso durante 5 minutos. Em seguida, adicionado 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%, o tubo foi homogeneizado e incubado por 5 minutos em banho-maria a 50°C. A absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro. 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.

Para quantificação de fenóis totais, foi construída uma curva analítica de calibração contendo 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ácido

gálico e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico (EAG)  $\text{mg}^{-1}$  de amostra. A partir da curva, foi calculado o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.5.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando o método DPPH de acordo com Barzotto *et al.* (2019) com pequenas modificações. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL de cada diluição dos extratos para tubos de ensaio contendo 3,8 mL da solução etanólica do radical DPPH 0,1 mM (Sigma Aldrich, GE). Os tubos foram homogeneizados e permaneceram por 40 minutos no escuro à temperatura ambiente para reação. As análises foram preparadas em duplicatas, e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 517 nm. Para calibração do equipamento, foi utilizado álcool etílico como branco para subtrair a leitura de outras interações indesejáveis.

O teor de antioxidantes por DPPH foi quantificado por curva de calibração preparada com 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 e 0  $\mu\text{moles}$  de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), os resultados foram expressos em micromoles equivalentes de Trolox por g de amostra. A porcentagem de atividade antioxidante foi realizada utilizando a equação 5.

$$\text{Inibição do radical DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}}{\text{Massa amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}}{\text{Abs. controle}} \times 100$$

#### 4.5.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP

O ensaio FRAP foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Tiveron *et al.* (2012), com modificações. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução etanólica dos extratos ( $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foi adicionada em tubo de ensaio contendo 3 mL do reagente FRAP (preparado utilizando a mistura 25 mL de tampão acetato a 0,3 M e pH 3,6 com 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C durante 30 minutos, realizando as medições

em espectrofotômetro com absorvância de 593 nm, utilizando como branco o reagente FRAP.

O teor de antioxidantes foi quantificado por meio de uma curva padrão preparada com sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) nas seguintes concentrações: 2000, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250, 100, 0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A partir da curva, foi calculado o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). A curva de calibração foi usada para determinar a capacidade antioxidante e os resultados foram relatados como o equivalente a micromoles de sulfato ferroso por g de extrato ( $\mu\text{M EFe}^{2+}$  por g-extrato).

#### **4.6 Síntese do biodiesel**

A síntese do biodiesel foi realizada utilizando óleo de soja refinado comercial, hidróxido de potássio (KOH) como catalisador de reação e o metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) como álcool de cadeia curta, por meio de reação de transesterificação.

A produção iniciou-se com a mistura de 5,46 g de hidróxido de potássio (2% da massa de óleo) em 126,316 mL de álcool metílico. Em um balão de três bocas, 300 mL de óleo de soja refinado foi previamente aquecido a 75C, e posteriormente adicionado ao balão a mistura homogeneizada contendo álcool e catalisador, mantidos em sistema fechado sobre agitação magnética e aquecimento a 80C por 4 horas.

Após finalizada a reação, transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de decantação, armazenado durante 24 horas para separação de fases em duas camadas nítidas, a fase inferior, mais densa, cuja constituição básica é o glicerol, e a fase superior, menos densa, denominada biodiesel.

Para retirada de impurezas e resíduos da reação, o biodiesel foi lavado várias vezes com água a 65C, realizando suave agitação. A mistura foi separada por decantação, e o biodiesel foi seco em estufa a 60C por doze horas, para evaporação de toda água e umidade restante, posteriormente armazenado em frasco vidro âmbar.

#### **4.7 Caracterização do biodiesel**

A partir do biodiesel (B100) obtido, foram determinadas as seguintes características físico-químicas: aspecto, índice de acidez, teor de água e teor de

éster. As análises foram realizadas em triplicatas e seus valores médios comparados com as normas pré-estabelecidas pela ANP nº45/2014.

#### 4.7.1 Aspecto

O biodiesel deve apresentar-se límpido e isento de impurezas. Para determinação, as amostras foram acondicionadas em recipiente transparente e posicionadas contra a luz, verificando a turbidez e presença de impurezas, como sedimentos e materiais em suspensão.

#### 4.7.2 Índice de acidez

Para determinação da acidez, é definido quantas mg de hidróxido de potássio (KOH) são necessárias para neutralizar ácidos livres em 1 grama de biodiesel. A partir de 5 g da amostra foram adicionados 100 mL de uma mistura de éter dietílico e etanol 95% (1:1), seguidos de 5 gotas de fenolftaleína. A amostra foi titulada por meio de titulador eletrônico (848 Titrino plus, Metrohm), utilizando solução de KOH 0,1 M, até a mudança da tonalidade transparente para rosada, que se mantivesse durante 30 segundos. O índice de acidez foi encontrado por meio da equação 6.

$$\text{Índice de Acidez (\%)} = \frac{56,1.V.M}{\text{Massa amostra}} \quad \text{Eq. 6}$$

Em que:

V: volume gasto da titulação de KOH;

M: molaridade da solução de KOH.

#### 4.7.3 Teor de água

A determinação do teor de água presente no biodiesel foi realizada em equipamento Karl Fischer (V20 KF Volumetric, Mettler Toledo). Para a análise, aproximadamente 1 mL da amostra é injetada no equipamento, dando-se início à

titulação. Na titulação, é utilizado reagente de Karl Fischer, considerando o volume gasto na titulação. O conteúdo em água é obtido pelo equação 7.

$$W = \frac{mH_2O}{M \cdot 10^{-3}} \quad \text{Eq. 7}$$

Em que:

W: conteúdo em água no biodiesel, expresso em g H<sub>2</sub>O/kg;

M: massa de líquido injetado, expresso em gramas;

mH<sub>2</sub>O: massa de água obtida pelo titulador Karl Fisher, expressa em miligramas.

#### 4.7.4 Teor de éster

As amostras foram preparadas conforme a Normativa Européia EN 14103 (2003), a partir de 0,3 g de amostra é adicionado 10 mL de heptano (99%), em seguida 100 µL da mistura é transferida para balão volumétrico de 1 mL contendo 100 µL de padrão interno heptadecanoato de metila, completando o volume do balão com heptano. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás (PERKINELMER - CLARUS 680), equipado com coluna capilar de sílica fundida de cianopropilpolisiloxano (Elite-WAX - 30m x 0,25 mm X 0,5 µm) e detector de ionização em chama. A temperatura inicial da coluna foi de 160C sendo elevada a 230C à uma taxa de 5C/min<sup>-1</sup>, permanecendo nesta temperatura por 2 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 250C. O volume de amostra injetado foi de 2,0 µL. As velocidades de fluxo dos gases foram 2 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (H<sub>2</sub>), 45 mL/min<sup>-1</sup> para o gás nitrogênio, 45 e 450 mL min<sup>-1</sup> para os gases hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra foi 1/50. As áreas dos picos foram determinadas a partir do software Workstation versão 5.0 (Varian).

### 4.8 Teste de Estabilidade Oxidativa do Biodiesel

#### 4.8.1 Rancimat

Para analisar a influência das espécies como antioxidantes naturais na estabilidade termo-oxidativa do biodiesel, os extratos que obtiveram os melhores

resultados de caracterização em testes preliminares foram selecionados e diluídos no biodiesel.

Foram preparadas amostras de 3 g de Biodiesel aditivado com os extratos das folhas da cerejeira (*E. involucrata*), pitangueira (*E. uniflora*), jambolão (*E. jabolana*) e pessegueiro-do-mato (*E. myrcianthes*), obtendo a concentração de 1000 ppm. Em seguida, as amostras foram submetidas ao teste de aquecimento acelerado a 110C, com taxa de insuflação de ar de 10 L.h<sup>-1</sup>, 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.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da Matéria-Prima

#### 5.1.1 Diâmetro médio das partículas

As Tabelas 8, 9, 10 e 11 apresentam os resultados da análise granulométrica das folhas trituradas da cerejeira (*E. involucrata*), jambolão (*E. jabolana*), pitangueira (*E. uniflora*) e pessegueiro-do-mato (*E. myrcianthes*), respectivamente. Para padronização, foram utilizadas as partículas retidas entre as peneiras de 24 a 60 mesh, possuindo granulometria intermediária e apresentando maior proporção mássica. A maior parte do material ficou retido na fração 20/24 mesh, com diâmetro médio de 0,780mm. Considerando apenas as partículas retidas nas peneiras de interesse (24 a 60 mesh), tem como resultado o diâmetro médio de 0,421 mm.

Além da técnica de extração e dos demais parâmetros específicos, o tamanho das partículas é considerado um dos fatores mais significativos para eficiência da extração, afetando inclusive no rendimento do extrato. É possível obter melhor eficiência utilizando partículas menores do material vegetal. A redução do tamanho das partículas oferece maior área de superfície para transferência de massa, resultando em aumento da difusão dos princípios ativos no solvente (PĂTRĂUȚANU *et al.*, 2019; MEULLEMIESTRE *et al.*, 2016).

**Tabela 8. Distribuição Granulométrica das folhas de cerejeira após secagem e moagem**

<b>Mesh</b>	<b>Fração</b>	<b>Abertura das peneiras (mm)</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Amostra retida (g)</b>	<b>Amostra retida (%)</b>
20	<20	0,850	>0,850	10,735	8,91
24	20/24	0,710	0,780	34,464	28,62
35	24/35	0,425	0,567	27,967	23,22
48	35/48	0,300	0,362	17,345	14,40
60	48/60	0,250	0,275	9,173	7,62
Fundo	>60	-	<0,250	20,743	17,22

**Tabela 9. Distribuição Granulométrica das folhas de jambolão após secagem e moagem**

<b>Mesh</b>	<b>Fração</b>	<b>Abertura das peneiras (mm)</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Amostra retida (g)</b>	<b>Amostra retida (%)</b>
20	>20	0,850	>0,850	12,503	9,45
24	20/24	0,710	0,780	52,122	39,39
35	24/35	0,425	0,567	24,787	18,73
48	35/48	0,300	0,362	9,481	7,16
60	48/60	0,250	0,275	5,921	4,47
Fundo	>60	-	<0,250	27,520	20,80

**Tabela 10. Distribuição Granulométrica das folhas de pitanga após secagem e moagem**

<b>Mesh</b>	<b>Fração</b>	<b>Abertura das peneiras (mm)</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Amostra retida (g)</b>	<b>Amostra retida (%)</b>
20	>20	0,850	>0,850	13,600	7,19
24	20/24	0,710	0,780	45,210	23,89
35	24/35	0,425	0,567	37,250	19,68
48	35/48	0,300	0,362	29,554	15,62
60	48/60	0,250	0,275	23,726	12,54
Fundo	>60	-	<0,250	39,892	21,08

**Tabela 11. Distribuição Granulométrica das folhas de pessegueiro-do-mato após secagem e moagem**

<b>Mesh</b>	<b>Fração</b>	<b>Abertura das peneiras (mm)</b>	<b>Diâmetro médio (mm)</b>	<b>Amostra retida (g)</b>	<b>Amostra retida (%)</b>
20	>20	0,850	>0,850	26,504	11,62
24	20/24	0,710	0,780	68,007	29,82
35	24/35	0,425	0,567	39,868	17,48
48	35/48	0,300	0,362	23,272	10,20
60	48/60	0,250	0,275	22,985	10,08
Fundo	>60	-	<0,250	47,406	20,79

### 5.1.2 Umidade

A umidade das folhas resultaram em umidade média para cereja de  $10,57\% \pm 0,03$ , jambolão  $10,45\% \pm 0,08$ , pitanga  $10,53\% \pm 0,06$  e pessegueiro-do-mato  $10,62\% \pm 0,05$ . De modo geral, a umidade das folhas das quatro espécies foi relativamente baixa, ponderando que o processo de secagem foi realizado à sombra e temperatura ambiente, com intuito de preservar o material vegetal.

As plantas apresentam elevado teor de água, suas sementes podem chegar ao mínimo de 4% e o teor de água nas folhas compreende entre 80 e 90%, podendo apresentar alterações em decorrência das condições hídricas ambientais (GUIMARÃES & STONE, 2008).

A posição foliar no dossel da planta é um dos fatores capazes de afetar o potencial de água nas folhas. As folhas posicionadas na parte superior apresentam teor de água menor se comparado as folhas dispostas na porção inferior. Folhas mais expostas a luz, e conseqüentemente a menores condições de umidade, estão sujeitas a grandes estresses, podendo sofrer várias modificações, inclusive na taxa de água (GUIMARÃES & STONE, 2008; TRIBUZY, 2005).

O teor de umidade é um importante parâmetro a ser analisado, sendo utilizado comumente como um indicador da qualidade. Para sua determinação são utilizados métodos gravimétricos, capazes de determinar a umidade através da diferença de massa entre o material úmido e o material seco (AMOEDO & MURADIAN, 2002).

O processo de secagem tem como objetivo retardar a deterioração do material vegetal, com a redução do nível de água, é minimizado a ação de enzimas, bactérias, leveduras e bolores, permitindo sua conservação por um período de tempo superior (BELESSIOTIS & DELYANNIS, 2011). Entretanto, os constituintes voláteis presentes nas plantas são sensíveis ao processo de secagem, vários fatores alteram as concentrações destes compostos, entre eles, as condições do método de secagem e parâmetros fisiológicos da espécie que foi submetida ao processo (VENSKUTONIS, 1997).

A secagem deve ser realizada de modo que não prejudique as propriedades físico-químicas da planta, não alterando sua aparência, bem como, sua composição (BELESSIOTIS & DELYANNIS, 2011). Pereira e Meireles

(2010), recomendam que a matriz vegetal tenha um teor de água em torno de 4 a 14% para ser considerado ideal. Na maioria dos casos, a água presente no material vegetal compete com o soluto para interagir com o solvente, desta forma, diminuindo o rendimento do extrato. Ainda, a presença de água pode causar outros efeitos indesejáveis, sua co-extração pode aumentar a formação de blocos de gelo devido ao efeito Joule-Thomson, bem como a ionização e hidrólise de compostos, enfatizando novamente a importância da secagem da matéria-prima (VENSKUTONIS, 1997; MEIRELES, 2010).

Nagy e Simándi (2008) observaram em sua pesquisa uma correlação entre a eficiência da extração supercrítica com o teor de umidade presente nas amostras de paprica (*Capsicum annuum* L.). Amostras que possuíam mais de 18% de água apresentaram baixo rendimento na extração, quando o teor de umidade foi aumentado, foi observado diminuição na eficiência. No caso de alto teor de umidade ( $\pm 85\%$ ), a extração foi quase inibida, presumindo-se que o teor de água tenha afetado a solubilidade.

## **5.2 Extração Convencional - Goldfish**

### *5.2.1 Rendimento*

Este trabalho avaliou a influência dos solventes orgânicos etanol, acetato de etila e hexano no método de extração convencional com extrator de óleos e gorduras Goldfish. Após evaporação total dos solventes utilizados, calculou-se o rendimento da extração, a partir da razão entre a massa do extrato e a massa inicial da amostra, de acordo com Equação (4). Os resultados estão expressos na Tabela 12.

Comparando os dados,  possível perceber que todas as amostras obtiveram maior interação com o solvente etanol, fornecendo maiores resultados de rendimento, seguido pelas amostras extraídas com acetato de etila e hexano.

Para Bezerra *et al.* (2008), muitas variáveis tem a capacidade de afetar na resposta do sistema, dificultando na identificação e controle dos efeitos de cada variável, sendo necessário selecionar as variáveis principais. A eficiência da extração é influenciada pelas condições do processo, a temperatura, tempo de contato, tipo e razão de solvente, são algumas das principais variáveis

comumente relatadas com grande influência no rendimento do extrato (PINELO *et al.*, 2005). Ainda, a matriz vegetal, bem como, os tipos de compostos extraíveis, possuem grande importância no processo de extração (REZAIE *et al.*, 2015).

**Tabela 12. Rendimento global das extrações convencionais com extrator de gordura - Goldfish.**

<b>Matéria-prima</b>	<b>Solvente</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Cerejeira</b>	Etanol	12,36±0,37
<b>Cerejeira</b>	Acetato de Etila	5,24±0,46
<b>Cerejeira</b>	Hexano	2,39±0,52
<b>Jambolão</b>	Etanol	9,32±0,42
<b>Jambolão</b>	Acetato de Etila	5,25±0,45
<b>Jambolão</b>	Hexano	0,89±0,53
<b>Pitangueira</b>	Etanol	15,03±0,36
<b>Pitangueira</b>	Acetato de Etila	3,34±0,49
<b>Pitangueira</b>	Hexano	1,88±0,51
<b>Pessegueiro</b>	Etanol	12,84±0,40
<b>Pessegueiro</b>	Acetato de Etila	4,71±0,47
<b>Pessegueiro</b>	Hexano	1,98±0,49

A influência das variáveis na transferência de massa não são sempre previsíveis, as características químicas do solvente e a estrutura e composição específica do material vegetal garantem que cada sistema material/solvente apresente comportamento singular que não pode ser previsto (PINELO *et al.*, 2005).

A escolha correta do solvente pode melhorar consideravelmente o rendimento na extração de antioxidantes (REZAIE *et al.*, 2015). Um solvente adequado é caracterizado por uma extração de considerável rendimento e pela eficácia em conservar a estrutura química dos compostos desejados (HARBORNE, 1988). Dos três solventes utilizados, o etanol apresenta o maior índice de polaridade (5,2), capaz de solubilizar maior diversidade de compostos, no entanto, apresenta baixa seletividade. Já o hexano é o solvente com menor polaridade (0), sendo apolar e apresentando menor afinidade em solubilizar

compostos, no entanto é um solvente mais seletivo (CAETANO, 2009; AGUIAR *et al.*, 2013).

Avaliando a polaridade dos solventes, os extratos apresentaram rendimentos mais elevados com solventes que possuem índices de polaridade maior, como o etanol, seguido pelo acetato de etila, sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade de intermediária a alta. Nas extrações com hexano, que é um solvente de baixa polaridade, foram encontrados os menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos apolares presentes nas quatro espécies estudadas. Este resultado é consistente com o rendimento encontrado por Witt (2018) na extração da casca da romã, e por Sousa (2019) na extração foliar da guaxupita e abacateiro, no qual a extração etanólica obteve melhor rendimento no extrator de gorduras Goldfish, se comparado com acetato de etila e hexano.

A viscosidade do solvente também é um dos parâmetros capazes de afetar a capacidade de extração de compostos bioativos do material vegetal (REZAIE *et al.*, 2015). De acordo com Naczki e Shahidi (2006), solventes com baixa viscosidade têm alta difusividade, permitindo que a difusão seja facilitada nos poros das plantas, percolando os constituintes bioativos.

Teoricamente, em condições de altas temperaturas, os tecidos vegetais sofrem alterações, afetando as membranas celulares, desta forma, os compostos presentes nas plantas podem ser facilmente extraídos no solvente (CHE-SULAIMAN *et al.*, 2017). Entretanto, elevadas temperaturas diminuem o rendimento da extração, causando a oxidação e degradação dos compostos desejados (NACZKI & SHAHIDI, 2004; SILVA *et al.*, 2007). Contudo, mantendo a temperatura em um nível mínimo e por um período máximo de extração, é possível produzir maiores rendimentos, através da exposição prolongada da amostra no solvente, permitindo que os compostos desejados migrem para o solvente (CHE-SULAIMAN *et al.*, 2017).

O tamanho da partícula do material vegetal também interfere no rendimento do extrato. Segundo Franco *et al.* (2007), partículas menores promovem uma grande transferência de sólidos, já que aumentando-se o contato superficial entre as fases, é reduzida a distância de difusão do soluto dentro do sólido, aumentando assim a taxa de extração.

### 5.3 Testes Fitoquímicos Preliminares

Entende-se por metabolismo o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células, responsável pela degradação e síntese de compostos orgânicos, capazes de suprir o organismo e regular seus processos (ALMEIDA, 2017). Ao contrário dos metabólitos primários, o metabolismo secundário não é essencial para a vida vegetal, mas contribui para a adaptação das espécies e sua sobrevivência, servindo como atrativo para agentes polinizadores, atuando na resistência de estresses abióticos e protegendo as plantas contra herbívoros e patógenos (TAIZ & ZEIGER, 2006). Os metabólitos secundários das plantas incluem alcaloides, compostos fenólicos e terpenos, comumente conhecidos e referidos como fitoquímicos (GOLOLO, 2018).

Os testes fitoquímicos são essenciais para a identificação dos compostos presentes nas plantas, principalmente quando estes apresentam bioatividade e é pretendido isolar substâncias a fim de encontrar princípios ativos (SOARES, 2008). Com a caracterização fitoquímica foi possível identificar os grupos de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos na triagem fitoquímica das folhas da cerejeira (*E. involucrata*), jambolão (*E. jambolana*), pitangueira (*E. uniflora*) e pessegueiro-do-mato (*E. myrcianthes*).

**Tabela 13. Triagem Fitoquímica**

<b>Compostos</b>	<b>Cereja</b>	<b>Jambolão</b>	<b>Pitanga</b>	<b>Pessegueiro</b>
<b>Analizados</b>				
Taninos	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+
Alcaloides	-	+	-	+
Antraquinonas	-	-	-	-

Compostos detectados (+); Compostos não detectados (-).  
Fonte: a autora, 2020.

Na triagem fitoquímica de *Eugenia uniflora* e *E. involucrata*, foi detectado a presença de taninos e flavonoides. Para *E. jambolana* e *E. myrcianthes* foram identificados a presença de taninos, flavonoides e alcaloides. Saponinas e

antraquinonas não foram detectados nas espécies em estudo, pela não formação de espuma, precipitados e/ou surgimento de coloração.

Os taninos são compostos fenólicos de origem vegetal, sendo encontrados em grande parte das espécies vegetais, presentes em raízes, lenho, casca, folhas, frutos, sementes e nos tecidos condutores. O tipo e teor de taninos podem variar dependendo da espécie e do local no qual foi extraído (SANTOS, 2000). Os taninos são classificados segundo sua estrutura química, dividido em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Taninos hidrolisáveis incluem os galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico, enquanto taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, compreendem um grupo de polihidroxi-flavan-3-ol e apresentam uma estrutura semelhante aos flavonoides, com coloração variando do vermelho ao marrom (BERNARDES *et al.*, 2011; SCHOFIELD; MBUGUA & PELL, 2001).

Os taninos hidrolisáveis são menos atraentes que os taninos condensáveis, eles possuem alto valor agregado e apresentam baixa disponibilidade, com uma produção mundial limitada, com menos de 10% da produção comercial do mundo (ÁVILA; ÂNGULO & VARGAS, 2017). Os taninos condensados estão distribuídos em diversas famílias, especialmente em plantas lenhosas. Ocorrem amplamente nas gimnospermas e angiospermas, enquanto que os hidrolisáveis são mais restritivos, encontrados geralmente em angiospermas dicotiledôneas (MELLO & SANTOS, 2001). Os taninos apresentam muitas características farmacológicas, atuando como antioxidantes, anticancerígenos, antialérgicos, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antimicrobianos e antivirais (GHOSH, 2015).

Os flavonoides são onipresentes nas plantas, ou seja, quase todos os tecidos vegetais são capazes de sintetizá-los (SHAHIDI & HO, 2005). Atuam atraindo insetos polinizadores e disseminadores de sementes. São responsáveis pela pigmentação de frutas, flores, sementes e folhas, auxiliando na sinalização entre plantas e microrganismos, atuando na fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes antimicrobianos e na proteção à radiação ultravioleta (HUBER & RODRIGUEZ-MAYA, 2008; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Os flavonoides destacam-se por suas múltiplas propriedades biológicas, com ação antimicrobiana, citotoxicidade, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante, propriedade esta descrita para quase todos os grupos de flavonoides (BORS *et al.*, 1990). Os flavonoides são antioxidantes com potencial

ação contra os radicais livres, pois atuam como sequestradores de radicais e mostram essas atividades devido à sua capacidade de doação de hidrogênio. A natureza química dos flavonoides depende da classe da estrutura, grau de hidroxilação, substituição e conjugação e grau de polimerização (SENEVIRATHNE *et al.*, 2009).

Os alcaloides são compostos naturais, constituídos por carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, encontrados principalmente em plantas, especialmente em algumas famílias de angiospermas (GIRDHAR *et al.*, 2015). Os alcaloides podem ocorrer em qualquer parte da planta, embora alguns compostos específicos sejam limitados a uma determinada parte (ROBBERS; SPEEDIE & TYLER, 1996)

A maioria dos alcaloides desempenha papel importante na ecologia das plantas, atuando como produtos químicos, na defesa contra herbívoros e, em menor grau, contra bactérias, fungos e vírus, capaz de fornecer um meio de interação com outras plantas (WINK, 1998). Os alcaloides possuem grande potencial farmacológico, agindo como analgésico, anti-hiperglicêmico, antiarrítmico e antibacteriano, alguns exibem efeitos estimulantes no SNC (Sistema Nervoso Central), bem como efeitos psicotrópicos (NG; OR & IP, 2015).

Na literatura foram encontrados resultados condizentes com os observados no presente trabalho, onde as espécies apresentaram predominantemente presença de flavonoides e taninos. Silva e Lima (2016) investigaram os extratos etanólicos das folhas e frutos de *E. uniflora* obtidos por extração simples, entre os compostos encontrados, os autores evidenciaram a presença de alcaloides, flavonoides e taninos, com resultados negativos para saponinas e triterpenos. Toledo (2018) também detectou a presença de flavonoides e taninos na prospecção fitoquímica dos extratos de *E. involucrata*. Encontrando ainda, saponinas e esteróides. Batalhão (2014), em sua pesquisa de caracterização fitoquímica de *E. myrcianthes*, isolou 8 tipos flavonoides, 2 triterpenos e uma cumarina. Jayachandra e Devi (2012) avaliaram a composição química de extrato metanólico do caule de jabolão (*E. jabolana*) e verificaram a presença de flavonoides e taninos. Os resultados também detectaram a presença de saponinas e terpenóides.

Uma grande variedade de estresses ambientais são potencialmente prejudiciais às plantas, podendo alterar a taxa de produção de metabólitos

secundários. As fortes pressões externas acabam determinando as características desejadas, logo afetando qualitativamente e quantitativamente na síntese de metabólitos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). A produção e acúmulo de componentes fitoquímicos dependem criticamente das condições ambientais, como temperatura, umidade, pluviosidade, solo, radiação, infecção por patógenos e época de coleta, afetando na composição química vegetal (MAHAJAN & TUTEJA, 2005). Desta forma, a quantidade de metabólitos secundários e os efeitos biológicos são determinados pelas mudanças do ambiente.

#### 5.4 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais são mostrados na Tabela 14. O conteúdo de flavonoides totais dos extratos foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama (mg EQ.gextrato<sup>-1</sup>). O conteúdo de flavonoides totais foi maior para os extratos de acetato de etila em todas as espécies analisadas, seguido por hexano. Extratos etanólicos apresentam a menor concentração. A espécie *E. uniflora* extraída a partir de acetato de etila obteve o melhor resultado, com 353 mg EQ.gextrato<sup>-1</sup>.

Tabela 14. Teor de flavonoides totais dos extratos foliares.

Matéria-prima	Solvente	TFC (EQ.gextrato-1)
Cerejeira	Etanol	77,41±0,83
Cerejeira	Acetato de Etila	111,60±1,39
Cerejeira	Hexano	80,69±0,39
Jambolão	Etanol	81,39±0,42
Jambolão	Acetato de Etila	123,62±3,31
Jambolão	Hexano	104,18±2,31
Pitangueira	Etanol	89,12±3,53
Pitangueira	Acetato de Etila	353,88±0,98
Pitangueira	Hexano	127,37±4,53
Pessegueiro	Etanol	105,51±0,71
Pessegueiro	Acetato de Etila	291,43±0,31
Pessegueiro	Hexano	116,59±0,65

O acetato de etila é utilizado para extrair compostos polares intermediários, como agliconas pilihidroxiladas e flavonas, enquanto solventes polares, como o etanol, são usados para extrair compostos polares como heterosídeos e catequinas. O hexano é utilizado para a extração de compostos não polares, como os carotenóides (JAYAPRAKASHA; GIRENNAVAR & PATIL, 2008).

Os resultados obtidos sugerem que a maioria dos flavonoides presentes nas folhas da pitangueira (*E. uniflora*), cerejeira (*E. involucrata*), jambolão (*E. jambolana*) e pessegueiro (*E. myrcianthes*), sejam menos polares ou semi-polares por natureza. Desta forma, o teor de flavonoides extraídos são decorrentes da diferença de polaridade dos solventes, que afetam a solubilidade dos flavonoides (PRASAD *et al.*, 2010).

Thavamoney *et al.* (2018), investigaram os componentes fitoquímicos e as propriedades antioxidantes em partes de frutos de *Dacryodes rostrata*, utilizando diferentes solventes de extração. O maior conteúdo total de flavonoides foi obtido no extrato de acetato de etila da polpa dos frutos. Sanvido *et al.* (2015), analisaram o teor de flavonoides e a atividade antioxidante de extratos de *Baccharis uncinella*, e os resultados obtidos indicaram que o extrato metanólico particionado com acetato de etila foi o que apresentou a melhor atividade antioxidante e maior percentual de flavonoides.

A propriedade mais bem descrita de quase todos os grupos de flavonoides é sua capacidade de agir como antioxidantes. Flavonas e catequinas aparecem como importantes flavonoides na eliminação de radicais livres derivados de oxigênio (NIJVELDT *et al.*, 2001). A ação antioxidante dos flavonoides se deve ao fato de serem quelantes de metais, agindo contra os radicais livres, inclusive o radical hidroxila ou radical peróxido, neutralizando espécies oxidantes como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e atuar em sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E (SANTOS & RODRIGUES, 2017).

## **5.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Segundo Duarte (2006), os extratos naturais são capazes de controlar o crescimento de uma ou mais espécies de microrganismos, mostrando bom potencial de aplicação como antimicrobiano. De acordo com Ahmad e Beg, (2001), as plantas produzem uma variedade de substâncias com propriedades

antimicrobianas, e através de pesquisas e triagens é possível descobrir compostos para o desenvolvimento de novos antibióticos para microrganismos patogênicos.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi testada frente às cepas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. Os testes aplicados tiveram como objetivo determinar a menor concentração de extrato capaz de destruir os microrganismos. Os resultados constam na Tabela 15.

**Tabela 15. Concentração Bactericida Mínima (mg/mL) dos extratos foliares**

Microrganismo	EXTRATOS CONVENCIONAIS			
	Acetato Etila	Etanólico	Hexânico	
<b>Cereja</b>	<i>B. cereus</i>	-	80	80
	<i>S. aureus</i>	40	20	-
	<i>E. coli</i>	-	20	10
	<i>Salmonella</i>	-	20	10
<b>Pitanga</b>	<i>B. cereus</i>	80	80	20
	<i>S. aureus</i>	20	20	-
	<i>E. coli</i>	80	2,5	10
	<i>Salmonella</i>	80	5	10
<b>Jambolão</b>	<i>B. cereus</i>	-	40	40
	<i>S. aureus</i>	40	20	-
	<i>E. coli</i>	-	10	10
	<i>Salmonella</i>	-	20	80
<b>Pessegueiro do mato</b>	<i>B. cereus</i>	-	40	80
	<i>S. aureus</i>	-	20	-
	<i>E. coli</i>	80	10	40
	<i>Salmonella</i>	-	10	80

(-) indica que não houve atividade antimicrobiana.

Todos os extratos apresentaram ação à pelo menos um microrganismo patogênico. No que diz respeito ao biodiesel, os resultados são satisfatórios, principalmente por esse biocombustível ser acometido por contaminações microbianas, seja pela presença de sedimentos biológicos, nutrientes, temperatura, pH, presença de oxigênio e água, fatores que favorecem sua degradação pela ação de microrganismos (VAZ, 2010). Segundo Arantes *et al.* (2017), mesmo conhecendo os efeitos da ação microbiana nos combustíveis líquidos, atualmente não há legislação específica no Brasil que regule esse parâmetro. No entanto, a utilização de compostos bioativos pode favorecer essa condição.

Os extratos etanólicos de todas as espécies vegetais apresentaram ação antimicrobiana, sendo o etanol o único solvente cujos extratos eliminaram todos os microrganismos, obtendo inclusive a menor CBM (2,5 mg/mL) entre todos os extratos e microrganismos avaliados. Foi observado a não ocorrência de atividade antimicrobiana em alguns extratos, principalmente para os extratos de acetato de etila, sendo ainda o extrato que apresentou as menores atividades antimicrobianas, com valores de CBM variando de 20 a 80 mg/mL. Além disso, o extrato hexânico não apresentou atividade frente à *S. aureus* em nenhuma espécie vegetal testada.

Os extratos da cerejeira (*Eugenia involucrata*) obtidos a partir do solvente acetato de etila mostraram atividade apenas frente à cepa de *S. aureus*. Para *E. involucrata* a CBM foi observada em extrato hexânico, tanto para *E. coli* quanto para *Salmonella* sp, sendo utilizado 10 mg/mL do extrato.

Para jambolão (*E. jabolana*), o extrato de acetato de etila mostrou ação antimicrobiana apenas para *S. aureus* em concentração de 40 mg/mL, igualmente observado em *E. involucrata*. A CBM ocorreu em extrato etanólico e hexânico, ambos para *E. coli*, sendo necessário 10 mg/mL de extrato para eliminar o microrganismo.

Para pessegueiro-do-mato (*E. myrcianthes*), o extrato a base de acetato de etila também apresentou ação somente para um microrganismo, a bactéria Gram-negativa *E. coli*. O extrato etanólico foi o que apresentou a CBM, com 10 mg/mL frente a bactéria *E. coli* e *Salmonella* sp.

Diferente da cerejeira, jambolão e pessegueiro-do-mato, o extrato da pitangueira (*E. uniflora*) a partir de acetato de etila foi o único a matar todos os

microrganismos testados. Ainda, sua CBM foi a menor obtida se comparado a todos os extratos avaliados, utilizando apenas 2,5 mg/mL de extrato etanólico na eliminação de *E. coli*.

Como observado, a atividade dos extratos variou de acordo com o microrganismo e o solvente extrator. A solubilidade dos compostos em determinado solvente é uma característica peculiar do fitoquímico, na múltipla polaridade dos fenóis deve ser considerada, portanto, o uso de solventes com diferentes polaridades, possibilitando a extração de mais compostos (CAETANO *et al.*, 2009).

Cada microrganismo possui características próprias, inclusive quanto aos diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana, podendo apresentar uma capacidade adquirida ou uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana, naturalmente resistente a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos (KHAMENEH *et al.*, 2019). De modo geral, a ação antibacteriana ocorre pela interferência da permeabilidade da membrana celular, bem como inibição da síntese da parede celular, síntese de DNA, síntese de proteínas e síntese de compostos metabólicos biológicos (TORTORA; FUNKE & CASE, 2012).

A atividade antimicrobiana positiva na maioria dos extratos, pode ser decorrente da presença de compostos fenólicos, principalmente taninos e flavonoides, uma vez que estes compostos têm comprovada ação antimicrobiana e foram previamente encontrados em todas as espécies avaliadas. Os compostos fenólicos possuem ação inespecífica sobre microrganismos, eles provocam alterações físico-químicas que rompem a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos (HASLAM, 1996).

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água e em solventes orgânicos polares, que complexam com proteínas, alcaloides, íons metálicos e polissacarídeos, formando a base de algumas de suas principais propriedades biológicas, tais como controle de insetos, fungos e bactérias (RODRIGUES; SANDINI & PEREZ, 2010; CASTEJON, 2011). Ao precipitar proteínas, os taninos favorecem a ação antimicrobiana e antifúngica (MONTEIRO *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana de taninos ocorre pela inibição de enzimas microbianas extracelulares, privação dos substratos necessários ao crescimento, ou ação direta no metabolismo bacteriano através da inibição da fosforilação oxidativa (SCALBERT, 1991). A atividade antibacteriana inclui ação direta na membrana

dos microrganismos, pela competição por íons metálicos, que são fundamentais ao metabolismo bacteriano (MELLO & SANTOS, 2001).

Cushnie e Lamb (2005), relataram o mecanismo de ação dos flavonoides, que compreende três vias principais para inativação de microrganismos: Uma das vias é a inibição da síntese de ácidos nucleicos. A rota leva a inibição da síntese de DNA e RNA através da ligação de hidrogênio entre flavonóide e a cadeia de DNA, ou pela intercalação dos anéis do flavonóide com as bases dos ácidos nucleicos (SANTOS, 2012). Outro mecanismo de ação é a inibição do funcionamento da membrana plasmática por modificações das regiões hidrofílicas e hidrofóbicas da membrana. Através da interação com a bicamada lipídica pela penetração direta, gerando perda da permeabilidade seletiva (CUSHNIE & LAMB, 2005; SALAS *et al.*, 2011). O terceiro mecanismo é a inibição do metabolismo de energia, através do bloqueio do consumo do oxigênio celular e da absorção de metabólitos para a biossíntese de macromoléculas (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Na triagem fitoquímica, além dos taninos e flavonoides que foram encontrados nas quatro espécies, também foi detectado a presença de alcaloides em jambolão (*E. jabolana*) e pessegueiro-do-mato (*E. myrcianthes*), o que pode ter influenciado nos resultados. Segundo Sawer, Berry e Ford (2005), alguns alcaloides inibem a ação de bactérias causando quebra 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, 2003).

Conforme Koyama *et al.* (1997), a ação antimicrobiana é realizada por diversos componentes com habilidade específica para romper ou penetrar na estrutura bacteriana. Para se conhecer o modo de ação é necessário avaliação de cada componente, separadamente e em combinação para determinar se eles têm ação sozinhos ou sincronizadamente (FERRONATO *et al.*, 2007).

## **5.6 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (TFT) Método Folin Ciocalteau**

Os metabólitos secundários são bem conhecidos por exercer efeitos promotores de saúde (MAISETTA, 2019). Existe uma grande variedade de

componentes fitoquímicos nas plantas, entre eles, os compostos fenólicos destacam-se pelos vários interesses de pesquisa (THOURI *et al.*, 2017). Os fenólicos possuem ampla gama de substâncias orgânicas, derivadas de plantas com muitas atividades biológicas, desde a capacidade de inibir e matar microrganismos patogênicos até propriedades antioxidantes, podendo retardar a rancificação da gordura e melhorar a estabilidade da oxidação lipídica (MAISETTA, 2019; YEN; DUH & TSAI, 1993).

Na Tabela 16, os resultados evidenciam que as amostra extraídas usando etanol como solvente apresentaram os valores mais altos de TFT nas quatro espécies testadas, sendo a pitangueira a espécie com maior concentração (305,97mg EAG-gextrato<sup>-1</sup>). Os extratos hexânicos obtiveram os menores valores para o teor de compostos fenólicos, com 60,57±1,45 mg de EAG/g para cerejeira, 49,34±1,67 mg de EAG/g para jambolão, 54,72±0,11 e 66,18±0,98 mg de EAG/g para pitangueira e pessegueiro-do-mato, respectivamente.

**Tabela 16. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos foliares.**

<b>Matéria-prima</b>	<b>Solvente</b>	<b>TFT (mg EAG-gextrato<sup>-1</sup>)</b>
<b>Cerejeira</b>	Etanol	276,74±1,10
<b>Cerejeira</b>	Acetato de Etila	134,67±0,33
<b>Cerejeira</b>	Hexano	60,57±1,45
<b>Jambolão</b>	Etanol	161,50±2,42
<b>Jambolão</b>	Acetato de Etila	73,14±0,22
<b>Jambolão</b>	Hexano	49,34±1,67
<b>Pitangueira</b>	Etanol	305,97±0,51
<b>Pitangueira</b>	Acetato de Etila	89,98±0,51
<b>Pitangueira</b>	Hexano	54,72±0,11
<b>Pessegueiro</b>	Etanol	299,98±3,04
<b>Pessegueiro</b>	Acetato de Etila	84,92±0,55
<b>Pessegueiro</b>	Hexano	66,18±0,98

A variação dos resultados encontrados para o teor de compostos fenólicos é encontrado em diversos estudos referente ao gênero *Eugenia*, Stieven, Moreira e Silva (2009), analisaram o óleo essencial de diferentes partes do fruto de uvaia (*Eugenia pyriformis*). A quantificação de compostos fenólicos totais não foi

possível pois os valores médios encontrados foram inferiores ao 5 mg de EAG/g. No entanto, Batista e Gonçalves (2017) também avaliaram os frutos da uvaia, e observaram teores mais elevados de fenólicos totais, apresentando 1477,00 mg equivalentes de ácido gálico<sup>-1</sup>.

A extração de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada por sua natureza química, o método de extração, tamanho de partícula da amostra, tempo e condições de armazenamento, bem como presença de substâncias interferentes (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Para Thouri *et al.* (2017), o solvente utilizado na extração, bem como sua polaridade, podem ter um impacto significativo no nível de fenóis extraídos. As polaridades dos fenóis variam de polares a não polares. Segundo Liu *et al.* (2007), geralmente uma extração eficiente de compostos fenólicos é obtida utilizando solvente polar, que possui uma melhor solvatação, resultante de interações (ligações de hidrogênio) entre os locais polares dos compostos antioxidantes e do solvente, do que um não polar, desta forma, o etanol é frequentemente utilizado para recuperação de fenóis.

Os compostos fenólicos que ocorrem comumente em alimentos e produtos naturais podem ser classificados em fenóis simples, ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico, cumarinas, flavonoides, estilbenos, ligninas e taninos hidrolisáveis e condensados (SHAHIDI & HO, 2005). Os polifenóis apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas. Sua estrutura química confere atividade redutora, que podem atuar doando elétrons ou agindo no sequestro de radicais livres (PIRES *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos exercem alguns de seus principais papéis em virtude de três características gerais: complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio e cálcio); atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, e capacidade de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1995).

Em extratos vegetais, os compostos fenólicos reagem com reagentes redox específicos, como o reagente Folin-Ciocalteu, formando um complexo azul que pode ser quantificado por espectroscopia (SCHOFIELD; MBUGUA & PELL, 2001). Sua composição química inclui o ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, que são reduzidos a partir dos extratos que, originalmente, possuem coloração amarela. Meios alcalinos propiciam que substâncias

reduzidoras, como as substâncias fenólicas, dissociando um próton, que formará o ânion fenolato, reduzindo o reagente de Folin-Ciocalteu a uma mistura de óxidos azuis formada de óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, podendo ser detectados espectrofotometricamente a 750-765 nm. Quanto mais intensa a coloração final, maior a concentração de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas (PIRES *et al.*, 2017; ROQUE; FORTUNY & BELLOSO, 2017).

Atualmente, o método de Folin-Ciocalteu é um dos mais aceitos e utilizados para avaliação de compostos fenólicos totais, inclusive por apresentar correlação positiva da concentração de compostos fenólicos totais com a capacidade antioxidante vegetal (CHITARRA & CHITARRA, 2005). No entanto, a técnica apresenta algumas desvantagens e limitações. Os extratos brutos das plantas podem conter outros compostos redutores, que são substâncias interferentes capazes de reagir com o reagente Folin-Ciocalteu, distorcendo os resultados de TFT (SÁNCHEZ-RANGEL *et al.*, 2013). Os possíveis contribuintes mencionados incluem proteínas, carboidratos, açúcares redutores, aminoácidos, nucleotídeos, tióis, ácidos graxos insaturados, vitaminas, aminas, aldeídos e cetonas (EVERETTE *et al.*, 2010).

O ácido ascórbico, ácido fólico, ácido folínico, NADH, piridoxina, ácido retinóico (derivado da vitamina A), tiamina e Trolox (derivado da vitamina E) apresentaram atividade significativa, com capacidade de reagir ao reagente Folin-Ciocalteu. Os ácidos ascórbico e retinóico tiveram a maior reatividade, como estes derivados vitamínicos estão presentes em muitas espécies vegetais, é esperado que eles contribuam para a estimativa de fenóis pelo método (EVERETTE *et al.*, 2010).

A presença de açúcares redutores também é um importante interferente, a maior parte da resposta pode ser gerada por sua presença na amostra. A interferência produzida pelos açúcares provém dos redutores de atenol formados sob as condições alcalinas do ensaio (SINGLETON; ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

## **5.7 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH e FRAP**

A atividade antioxidante dos extratos foliares foi determinada pelos métodos DPPH e FRAP e os resultados estão apresentados na Tabela 17.

A maior atividade antioxidante foi obtida utilizando os extratos etanólicos, com valores muito superiores ao acetato de etila, segundo solvente com maior atividade. Os extratos a base de hexano apresentaram os menores resultados, com grande diferença entre os demais. O extrato hexânico de jambolão apresentou a menor atividade antioxidante, tanto para método DPPH ( $6,55 \mu\text{mol ETrolox}\cdot\text{gextrato}^{-1}$ ) quanto para método FRAP ( $0,33 \mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot\text{gextrato}^{-1}$ ). O mesmo foi observado para o extrato com maior atividade antioxidante, sendo o extrato etanólico de pitanga, com melhores resultados nos dois métodos avaliados, para DPPH o resultado foi de  $550,17 \mu\text{mol ETrolox}\cdot\text{gextrato}^{-1}$  e para FRAP  $5,52 \mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot\text{gextrato}^{-1}$ .

**Tabela 17. Atividade antioxidante dos extratos pelo Método DPPH e FRAP**

<b>Matéria-prima</b>	<b>Solvente</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Cerejeira</b>	Etanol	$536,36 \pm 1,25$	$3,29 \pm 0,35$
<b>Cerejeira</b>	Acetato de Etila	$355,03 \pm 0,62$	$1,30 \pm 0,08$
<b>Cerejeira</b>	Hexano	$15,27 \pm 0,39$	$0,51 \pm 0,00$
<b>Jambolão</b>	Etanol	$526,91 \pm 2,05$	$3,30 \pm 0,00$
<b>Jambolão</b>	Acetato de Etila	$102,84 \pm 3,59$	$0,46 \pm 0,01$
<b>Jambolão</b>	Hexano	$6,55 \pm 0,80$	$0,33 \pm 0,01$
<b>Pitangueira</b>	Etanol	$550,17 \pm 1,02$	$5,52 \pm 0,00$
<b>Pitangueira</b>	Acetato de Etila	$324,87 \pm 1,41$	$1,25 \pm 0,20$
<b>Pitangueira</b>	Hexano	$43,25 \pm 3,53$	$0,46 \pm 0,02$
<b>Pessegueiro</b>	Etanol	$534,91 \pm 0,62$	$5,19 \pm 0,59$
<b>Pessegueiro</b>	Acetato de Etila	$200,23 \pm 0,56$	$0,77 \pm 0,06$
<b>Pessegueiro</b>	Hexano	$138,09 \pm 3,08$	$0,64 \pm 0,12$

Para Roginsky e Lissi (2005), os fenólicos são os principais componentes antioxidantes nos alimentos, e a atividade antioxidante dos extratos está relacionada aos compostos fenólicos totais, cuja presença representa uma boa estimativa desta propriedade. Comportamento semelhante foi encontrado, na análise que determinou o teor de compostos fenólicos totais (TFT), a maior atividade foi encontrada para extrato etanólico de pitanga com  $305,97 \text{ EAG}\cdot\text{gextrato}^{-1}$ , e a menor atividade para extrato hexânico de jambolão, com  $49,34 \text{ EAG}\cdot\text{gextrato}^{-1}$ , evidenciando uma correlação.

A baixa atividade antioxidante pode estar relacionada à pequena quantidade de compostos com atividade antioxidante frente ao DPPH e FRAP, ou pela presença de compostos com polaridade de intermediária a alta, uma vez que o hexano, solvente apolar, não favorece a solubilização de tais compostos (BENELLI, 2010; KRÜMMEL, 2018). A capacidade antioxidante possui grande relação com o tipo de solvente utilizado, devido ao diferente potencial antioxidante dos compostos com diferentes polaridades (MOURE *et al.*, 2001).

Fabiane (2019) avaliou a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de *E. uniflora* nas quatro estações do ano. Pelo método DPPH obteve média de 416,15 EAG·gextrato<sup>-1</sup>, e FRAP 1639,94  $\mu\text{mol EFe}^{2+}$ ·gextrato<sup>-1</sup>. Santos, Braz-Filho, Castro (2015), avaliaram a composição química do óleo essencial da pitangueira a partir de folhas jovens e adultas, e observaram que a idade foliar influencia na composição química e na concentração dos compostos presentes no óleo essencial.

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para determinar a atividade antioxidante, sendo FRAP e DPPH as mais comuns. As metodologias possuem diferentes mecanismos de reação onde os resultados dependem do método utilizado, portanto, é recomendado combinar mais de um método para determinar a capacidade antioxidante, fornecendo dados confiáveis da amostra (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2008; BOEING *et al.*, 2014). Entretanto, a variedade de métodos existentes gera resultados numéricos difíceis de serem comparados, pois os mecanismos antioxidantes se demonstram diferentes, e não é possível medir a capacidade antioxidante com precisão (PRIOR; WU & SCHAICH, 2005).

O DPPH é um radical livre, orgânico e estável, com absorção a 517 nm. Sua absorção é perdida ao aceitar um elétron ou uma espécie de radical livre, resultando em descoloração, visualmente perceptível do roxo ao amarelo (DO *et al.*, 2014). Quanto menor a absorbância, maior a atividade antioxidante das amostras, pois este valor equivale a quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a atividade do radical livre (KRÜMMEL, 2018).

O FRAP é um ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, baseado na produção do íon  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa) a partir da redução do íon  $\text{Fe}^{3+}$  (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016). Na presença dos compostos antioxidantes e sob

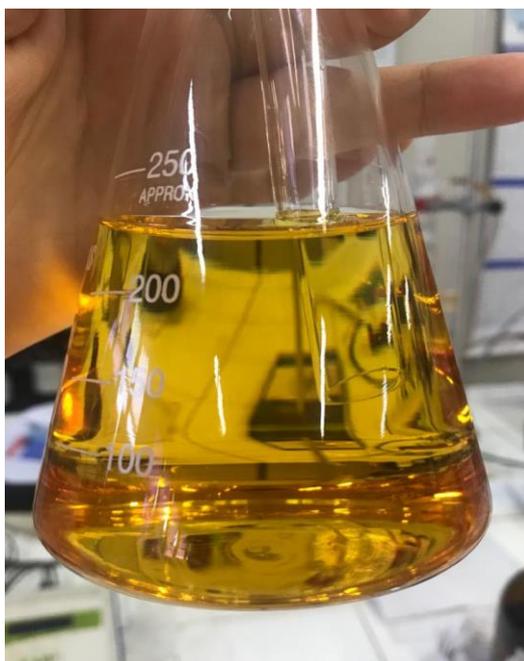
condições ácidas, há uma alteração na tonalidade para coloração azul intensa, com absorção a 593 nm (GULLON *et al.*, 2017).

Diante dos resultados, se destacaram nos teste preliminares os extratos etanólicos das quatro espécies avaliadas, com excelentes valores quantitativos, sendo então escolhidos para prosseguir com os ensaios em equipamento Rancimat. Os extratos etanólicos obtiveram alto rendimento em comparação aos demais extratos. Ainda, com altíssima concentração de antioxidantes pelos dois métodos empregados (DPPH e FRAP), bem como, com alto teor de compostos fenólicos (TFT), que segundo Del-Ré e Jorge (2012), é o principal parâmetro atribuído ao potencial antioxidante das plantas.

## 5.8 Caracterização do Biodiesel

### 5.8.1 Aspecto

De acordo com a norma estabelecida pela Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel obtido está dentro dos padrões determinados em legislação, apresentando-se límpido e isento de impurezas, sem resquício de água no recipiente (Figura 23).



**Figura 23. Aspecto do biodiesel de soja**

O aspecto do biodiesel trata-se de uma análise preliminar e visual, onde é verificado se há impurezas na amostra, como materiais em suspensão, sedimentos ou turvação, decorrente da presença de água. Na ausência destes contaminantes, o biodiesel é classificado como límpido e isento de impurezas. Seu aspecto é suscetível as características moleculares do biodiesel, a cor é uma característica físico-química que pode indicar alterações, podendo estar relacionadas a problemas durante a produção, contaminações, bem como com o processo de degradação durante a estocagem (LÔBO; FERREIRA & CRUZ, 2009; CUNHA; SOUSA & ROCHA, 2014).

### 5.8.2 Índice de Acidez

O índice de acidez do biodiesel sintetizado estava dentro dos limites máximos propostos pela ANP, mantendo-se abaixo do limite estabelecido de 0,50 mg de KOH/g, sendo de 0,23 mg de KOH/g.

O índice de acidez corresponde à quantidade de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para neutralizar ácidos graxos livres presentes por grama de biodiesel. Quanto maior a acidez, maior a quantidade de solução base será consumida na titulação, liberando íons hidrogênio (LIMA *et al.*, 2015).

O alto índice de acidez é indicativo de que o óleo esteja sofrendo quebras em sua cadeia lipídica, liberando ácidos graxos, desta forma, sua determinação é fundamental na avaliação do estado de deterioração do biodiesel, indicando a rancidez hidrolítica no qual o óleo se encontra (LIMA *et al.*, 2015). A acidez do biodiesel deve ser baixa para garantir que não haja ácidos graxos livres residuais ou em processamento. O excesso de acidez leva ao desgaste da bomba e filtro de combustível, além de depósitos de sedimentos, que acarretam em corrosão e danos ao motor (ALLEMAN; FOUTS & CHUPKA, 2013; MIYASHIRO *et al.*, 2013).

### 5.8.3 Teor de água

O teor de água estava dentro dos valores preconizados em legislação, mantendo-se abaixo do limite estabelecido de 200 ppm, obtendo umidade de 194 ppm  $\pm$  0,0091. A remoção do conteúdo de água presente no biodiesel é importante para adequar o biocombustível aos padrões de comercialização.

A presença de água no biodiesel é capaz de promover a sua hidrólise, resultando em ácidos graxos livres, favorecendo a corrosão em tanques de estocagem com deposição de sedimentos, bem como na proliferação de microrganismos (LÔBO; FERREIRA & CRUZ, 2009). Ainda, a umidade aumenta o índice de acidez, favorecendo o processo de saponificação (MA & HANNA, 1999).

O teor de água tem impacto significativo na filtrabilidade do biodiesel, este apresenta hidroscolicidade específica, e a presença de umidade afeta sua qualidade, tornando seu monitoramento fundamental durante o processo de armazenamento (LÔBO; FERREIRA & CRUZ, 2009; ALLEMAN; FOUTS & CHUPKA, 2013).

#### *5.8.4 Teor de Éster*

Os óleos vegetais e as gorduras animais têm sido amplamente empregados na produção de ésteres sintéticos, como o biodiesel, através da reação de transesterificação (MA & HANNA, 1999).

O principal parâmetro para avaliar a taxa de conversão de óleos vegetais em biodiesel é a determinação do teor de ésteres metílicos provenientes de ácidos graxos formados ao final do processo de transesterificação (RIBEIRO; CALERA & FLUMIGNAN, 2017).

O resultado obtido para teor de ésteres foi de  $99,7\% \pm 0,14$ , mostrando-se apto para a realização dos testes quanto à estabilidade oxidativa do biodiesel. A legislação exige que a porcentagem mínima de éster presente em uma amostra seja de 96,5%, sendo determinada através do método cromatográfico. A massa de éster é obtida por comparação da área total dos picos correspondentes com a área do pico de heptadecanoato de metila, utilizado como referência na análise (LÔBO; FERREIRA & CRUZ, 2009).

### **5.9 Estabilidade Oxidativa do Biodiesel**

#### *5.9.1 Rancimat*

A estabilidade oxidativa é um dos parâmetros avaliados para determinação da qualidade do biodiesel. É definida como a resistência da amostra à oxidação

lipídica, sendo expressa pelo período de indução (PI), tempo entre o início da medição e o aumento brusco na formação dos produtos de oxidação, acompanhados pela condutividade.

A Figura 24 expõe o período de indução encontrado para o controle, ou seja, para amostra de biodiesel puro sem adição de antioxidantes. Como observado, o PI foi de 5,21, valor este abaixo do limite mínimo estabelecido pela Resolução ANP nº 45/2014, que determina período mínimo de 12 horas. A degradação lipídica depende da presença de ácidos graxos insaturados em sua composição, óleos vegetais que possuem grandes quantidades, como o óleo de soja, estão mais sujeitos à oxidação (CORSINI & JORGE, 2006).

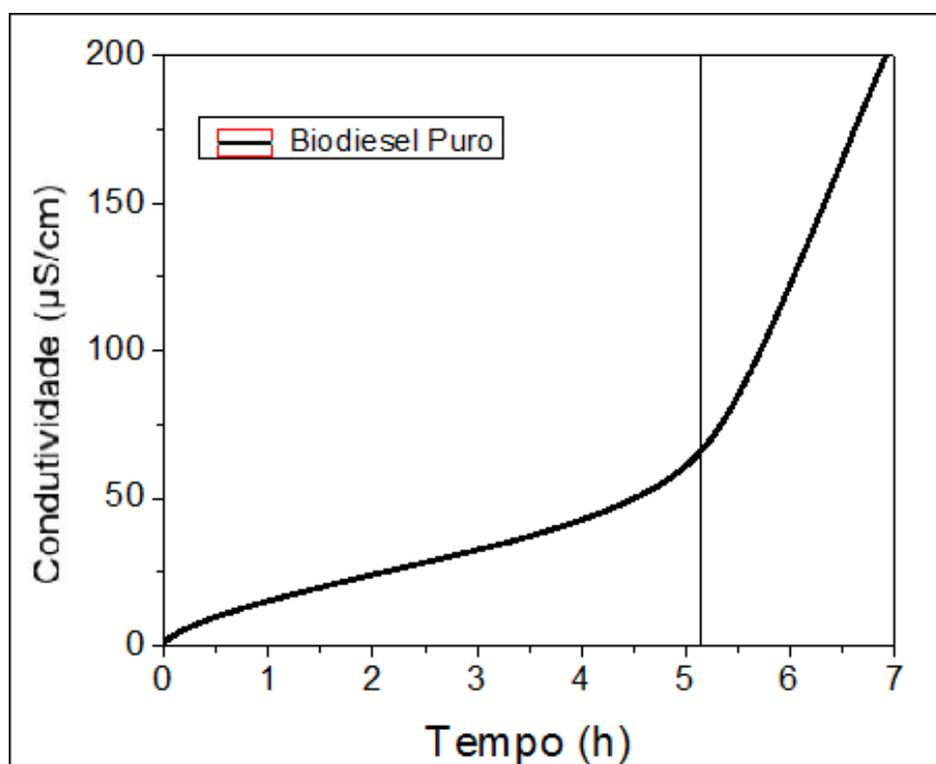


Figura 24. Gráfico da condutividade em função do tempo, da avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel comercial (controle) sem adição de antioxidantes.

Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes (RAMALHO & JORGE, 2006). Antioxidantes de origem sintética ou natural se mostram como uma opção viável para resolver o problema de oxidação em derivados de ácidos graxos.

O antioxidante sintético BHT (butil-hidroxi-tolueno) foi adicionado na concentração de 1000 ppm ao biodiesel, a fim de elevar o período de indução. Como expresso na Figura 25, o tempo de indução obtido foi de 7,50. A amostra de biodiesel com adição do composto sintético apresentou PI superior a amostra pura, entretanto, o período de indução atingido está bem abaixo do tempo preconizado em legislação.

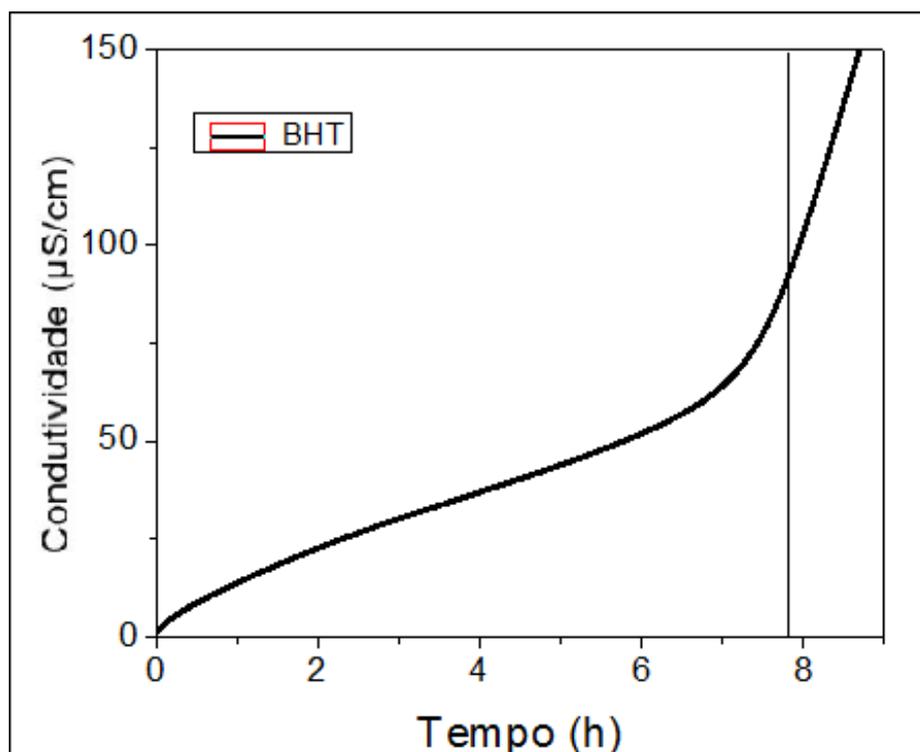


Figura 25. Gráfico que indica o tempo de indução do biodiesel aditivado com o antioxidante sintético BHT.

O BHT é um antioxidante que tem demonstrando bons resultados na inibição dos processos oxidativos, com aumento no tempo de indução do biodiesel. Sua estabilidade em elevadas temperaturas, solubilidade em óleo, alto grau de pureza e eficiência em pequenas quantidades, são características favoráveis ao desempenho (GONDIM *et al.*, 2010).

O aumento no tempo de indução pela adição de antioxidantes sintéticos no biodiesel foi relatado por muitos autores, entre eles estão Domingos *et al.* (2007), que encontram bons resultados antioxidantes do BHT para biodiesel de soja, Gondim *et al.* (2010) para biodiesel de algodão e Ferrari e Souza (2009) em biodiesel de girassol.

Os extratos naturais etanólicos das folhas da cerejeira (*E. involucrata*), pitangueira (*E. uniflora*), jambolão (*E. jabolana*) e pessegueiro-do-mato (*E. myrcianthes*), foram adicionados ao biodiesel, seguindo metodologia descrita, na concentração de 1000 ppm. Os valores do período de indução medidos pelo Rancimat são mostrados na Tabela 18.

**Tabela 18. Tempo de indução obtido pela análise em Rancimat para amostra de biodiesel puro e aditivado com os antioxidantes naturais e sintético (BHT)**

	Controle	BHT	Cereja	Jambolão	Pitanga	Pessegueiro
PI (h)	5,21	7,50	6,16	4,24	3,42	3,60

PI: Período de Indução; (h) horas.

O extrato etanólico da cerejeira foi o que apresentou o maior tempo de indução (6,16) dentro dos extratos naturais avaliados, sendo inclusive o único extrato natural a aumentar a estabilidade oxidativa do biodiesel. Os demais extratos apresentam PI menor que 5,21 (controle). Apesar da cerejeira apresentar melhora na estabilidade oxidativa, seu valor está muito abaixo do limite estabelecido pela ANP, ainda seu efeito antioxidante é menor se comparado ao composto sintético BHT.

A eficácia de um antioxidante depende de uma variedade de fatores, incluindo sua estrutura e concentração, condições de armazenamento, natureza do biodiesel, perfil de ácidos graxos do óleo ou gordura, dentre outras condições (KNOTHE, 2007). Melhorança-Filho e Pereira (2012), relatam que à estabilidade de compostos antioxidantes podem ser genéticas, e a exposição a temperaturas mais altas podem acarretar em sua oxidação ou volatilização.

Segundo Carvalho (2014), a diversidade de substâncias pode apresentar um comportamento diferente daquele que é esperado, simplesmente pela soma dos efeitos proporcionais. Ou seja, a interação entre os componentes presentes, não terão necessariamente o mesmo efeito do que sua contribuição individual.

Sch lindwein (2017), analisou a vitamina E, vitamina D, tanino, cafeína e o ácido cítrico, que segundo o autor são antioxidantes alternativos e ambientalmente corretos para a estabilidade oxidativa do biodiesel de soja. A vitamina D e E não apresentaram potencial antioxidante, com PI de 3,1 e 2,6, respectivamente. O biodiesel puro obteve 4,1 e o antioxidante sintético BHT na mesma concentração (1000 ppm) atingiu PI em 7,4 horas.

De acordo com Lastra e Villegas (2007), alguns antioxidantes como vitaminas e polifenóis, tais como flavonoides, taninos e curcumina, apresentam efeito pró-oxidante. Para Dai e Mumper (2010), antioxidantes fenólicos podem se comportar como pró-oxidantes em condições favoráveis a sua auto-oxidação, como pH elevado, altas concentrações de íons de metais de transição e a presença de moléculas de oxigênio, onde os compostos fenólicos de pequena estrutura são facilmente oxidados, possuindo atividade pró-oxidante.

A vitamina C (ácido ascórbico) atua na eliminação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (FARBSTEIN; KOZAK-BLICKSTEIN & LEVY, 2010). Entretanto, a vitamina C é reativa com íons de ferro, produzindo radicais livres, causando danos oxidativos. A interação do ácido ascórbico com os íons metálicos de transição pode promover sua redução, acompanhada pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), resultando na formação de ânions superóxido e radicais hidroxila (OH), espécies reativas de oxigênio (POLJŠAK & IONESCU, 2009).

Antioxidantes apolares exibem poder de ação maior em emulsões, pois estes se concentram na superfície lipídica, garantindo alta proteção. Os antioxidantes polares remanescentes da fase aquosa são mais diluídos, devido à sua menor afinidade com a superfície, onde a taxa de oxidação é maior, portanto, são menos eficazes na proteção lipídica (KOLEVA *et al.*, 2002). Segundo Martins, Lopes e Andrade (2003), a vitamina C pode ser considerada com uma substância polar, pois possui uma estrutura menor e um maior número de grupos OH.

Carvalho-Junior *et al.* (2014), destaca o valor nutricional das espécies do gênero *Eugenia*, principalmente por serem ricos em vitamina C e carotenóides. Na literatura é possível encontrar autores que relatam a presença da vitamina C nos frutos das 4 espécies analisadas. O teor médio de vitamina C de *E. involucrata*, é de 54,64 mg/100g<sup>-1</sup> (CAMLOFSKI, 2008). Para *E. jambolana*, 292,59 mg/100g<sup>-1</sup> (AUGUSTA *et al.*, 2010). *E. uniflora*, 127,12 mg/100g<sup>-1</sup> (PESSANHA, 2010). *E. myrcianthes* apresentou concentração de vitamina C de 75,1 mg/100g<sup>-1</sup> (ROZYCKI *et al.*, 1997).

Na presente pesquisa foram obtidos 12 extratos naturais, a partir da pitangueira, cerejeira, jabolão e pessegueiro-do-mato, utilizando três solventes extratores (etanol, hexano e acetato de etila). Apenas os extratos etanólicos foram analisados pelo teste de oxidação acelerada, por terem apresentado melhores

resultados em análises preliminares, considerando principalmente os dados obtidos da determinação de compostos fenólicos totais (TFT). Tais compostos apresentam elevada capacidade antioxidante, e foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu, sendo o mais extensivamente empregado (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Entretanto, a presença de ácido ascórbico geralmente trás problemas na determinação de TFT. Espécies com concentrações significativas de vitamina C reagem rapidamente com o polifosfotungstato, dando coloração azul a mistura do extrato da planta com o reagente, interferindo para a estimativa de fenóis (LEE & KADER, 2000; SÁNCHEZ-RANGEL *et al.*, 2013).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa foi desenvolvida a fim de estudar os extratos das folhas da cerejeira (*Eugenia involucrata*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), jambolão (*Eugenia jambolana*) e pessegueiro-do-mato (*Eugenia myrcianthes*). Os extratos foram obtidos por extração convencional, método Goldfish, empregando etanol, hexano e acetato de etila como solventes extratores.

O biodiesel sintetizado a partir do óleo de soja comercial apresentou resultados satisfatórios quanto as suas características físico-químicas frente aos parâmetros analisados.

A atividade antimicrobiana dos extratos foram analisados pelo teste de CBM, sendo o etanol o único solvente cujos extratos inibiram todos os microrganismos, obtendo a menor CBM, 2,5 mg/mL de extrato de pitanga frente a *E. coli*.

Em testes preliminares de determinação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, os extratos etanólicos de todas as espécies avaliadas obtiveram os melhores resultados, com excelentes valores quantitativos. Sendo estes então avaliados pelo teste de Oxidação Acelerada a 110C em Rancimat.

Os períodos de indução determinados pelo Rancimat demonstraram que o extrato da cerejeira apresentou tempo de estabilidade oxidativa de 6h16min, superior ao biodiesel B100 (controle). Embora apresente melhora na estabilidade oxidativa, o PI está muito abaixo do limite estabelecido pela ANP, que exige tempo mínimo de 12 horas. Ainda, o antioxidante sintético BHT apresentou maior efeito antioxidante sobre o biodiesel em relação às adituações de extratos etanólicos obtidos de folhas de espécies pertencentes ao gênero *Eugenia*, com PI de 7h50min.

As amostras de biodiesel aditivados com extratos de pitanga, jambolão e pessegueiro-do-mato são considerados baixos, com PI de 3,42, 4,24 e 3,60, respectivamente. Estes extratos não apresentaram ação antioxidante no biodiesel, uma vez que o tempo de indução das amostras contendo os compostos naturais não foram superiores ao PI do biodiesel B100 (5,21).

Apesar da grande diversidade de espécies relatadas em literatura que melhoram a estabilidade oxidativa, as espécies analisadas no presente trabalho não foram satisfatórias para substituição de antioxidantes sintéticos no biodiesel.

O efeito antioxidante depende de muitos fatores, ainda, a presença de compostos com potencial pró-oxidante também podem ter influenciado para baixa estabilidade oxidativa do biodiesel. Neste sentido, outros estudos podem ser realizados usando estes extratos e misturas com aditivos sintéticos, podendo vir a aprimorar sua ação antioxidante, além disso, os testes preliminares de atividade antimicrobiana mostraram que há potencialidade também para ser utilizado como biocidas e evitar a degradação microbiológica do biodiesel.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGOKE, G. O.; VIJAY KUMAR, M.; GOPALA KRISHNA, A. G.; VARADARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. **Antioxidants and Lipid Oxidation in Foods - A Critical Appraisal**. Journal of Food Science and Technology, v. 35, n. 4, p. 283-298, 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 CO<sub>2</sub> extraction of Capsicum pepper oleoresin**. Journal Supercritical Fluids, v. 81, p. 210-216, 2013.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism**. Nutrition, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. **Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens**. Journal of Ethnopharmacology, v. 74, p.113-123, 2001.
- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. **Caracterização farmacognóstica do jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 11, n. 1, p. 37–50, 2001.
- ALLEMAN, T. L.; FOUTS, L.; CHUPKA, G. **Quality Parameters and Chemical Analysis for Biodiesel Produced in the United States in 2011**. National Renewable Energy Laboratory. 28 p. 2013.
- ALMEIDA, C. L. B. **Estudo químico e farmacológico de frutos silvestres obtidos de Santa Catarina e Mato Grosso**. Itajaí: UNIVALI, 2013. 64 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2013.
- ALMEIDA, D. F. L. S. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais**. Porto: UFP, 2017. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017.
- ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. **Optimization of transesterification for methyl ester production from chicken fat**. Fuel, v. 90, p. 2630–2638, 2011.
- AMOEDO, L. H. G.; MURADIAN, L. B. A. **Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real**. Química Nova, v.25, n. 4, p.676-679, 2002.
- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. **Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga)**. Phytomedicine, v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014**. Disponível em: <<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2014/agosto&item=ranp-45-2014>>. Acesso em: 21 de novembro de 2019.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel**. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/simp-biodiesel>>. Acesso em 13 de jan de 2018.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel**. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 21 de novembro de 2019.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Dados estatísticos**. 2020. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Informações de mercado**. 2020b. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

ANWAR, H.; HUSSAIN, G.; MUSTAFA, I. **Antioxidants from Natural Sources**. In: SHALABY, E. Antioxidants in Foods and Its Applications. 1 ed. p. 3-28, 2018.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; MENUT, C.; BASSIERE, J. M.; ZUANAZZI, J. A.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T. **Volatile constituents of four *Hexachlamys* species growing in South Brazil**. Flavour and Fragrance Journal, v. 20, n. 2, p. 176–179, 2005.

AQUINO, I. P., HERNANDEZ, R. P. B.; CHICOMA, D. L.; PINTO, H. P. F.; AOKI, I. V. **Influence of light, temperature and metallic ions on biodiesel degradation and corrosiveness to copper and brass**. Fuel, v. 102, p. 795–807. 2012.

ARANTES, A. F. B.; TAMIETTI, M. S.; ARAUJO, A. C. B.; BRUNALE, B. P. M.; MORAES, B. R. L.; FRANCO, P. F.; COSTA, P. P. K. G.; JARAMILLO, P. M. D.; QUIRINO, B. F.; SOUTO, B. M.; SOARES, I. P.; FÁVARO, L. C. L. **Contaminação microbiana de biodiesel (B100), diesel (B0), e blendas (B7) comercializadas no Estado de Goiás e no Distrito Federal**. Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, 4. Brasília, 25 – 27 de Setembro, 2017.

ARAUJO, V. F.; BIALVES, T. S.; VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; FERRI, N.; POSSER-SILVEIRA, C. A. **PROPRIEDADES FUNCIONAIS E QUALIDADE FÍSICOQUÍMICA DA CEREJA-DO-RIO-GRANDE (*Eugenia involucrata* DC.) IN NATURA E PROCESSADA NA FORMA DE GELEIA**. Simpósio de Segurança Alimentar, 4. Gramado: RS. 2012.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. **The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus***

*radiata* Bark. Industrial Crops and Products, v. 34, n. 1, p. 838–844, 2011.

AUGUSTA, I. M.; RESENDE, J. M.; BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; COUTO, M. A. P. G. **Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl & Perry).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 4, p. 928-932, 2010.

ÁVILA, J. M.; ANGULO, G. L.; VARGAS, F. D. **Tannins in fruits and vegetables: chemistry and Biological Functions.** In: YAHIA E. M. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health. 2. Ed. New Jersey: Wiley Blackwell. p. 221-268, 2017.

AZEVEDO, A. N. G.; LIMA, B. C. A. **Biocombustíveis: desenvolvimento e inserção internacional.** Revista Direito Ambiental e Sociedade, v. 6, n. 1, p. 77-100, 2016.

BAGATINI, J. A. ***Eugenia involucrata* DC.** 2014. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=12366](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=12366)>. Acesso em: 30 jan. 2020.

BAGATINI, J. A. ***Eugenia involucrata* DC.** 2014b. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=12372](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=12372)>. Acesso em 30 jan. 2020.

BAGATINI, J. A. ***Eugenia uniflora* L.** 2015. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=14368](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=14368)>. Acesso em 30 jan. 2020.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products.** 5 ed., John Wiley: New York, 1996.

BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. **Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review.** Food Research International, v. 44, n. 7, p. 1776–1789, 2011.

BARBA, F. J.; PUTNIK, P.; KOVACEVIC, D. B.; POOJARY, M. M.; ROOHINEJAD, S.; LORENZO, J. M.; KOUBAA, M. **Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear (*Opuntia* spp.) and their derived products: From preservation of beverages to valorization of byproducts.** Trends in Food Science and Technology, v. 67, p. 260-270, 2017.

BARZOTTO, I. L. M.; SANTOS, K. A.; SILVA, E. A.; SENE, A. C.; SILVA, N. S.; VIEIRA, L. **Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and  $\alpha$ -tocopherol content.** Journal of Supercritical Fluids, v. 143, p. 55–63, 2019.

BATALHÃO, J. R. **Estudo fitoquímico de *Eugenia myrcianthes*: busca de substâncias bioativas.** São Carlos: UFSCar, 2014. 143 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de

São Carlos, São Carlos, 2014.

BATISTA, A. F. A. R.; GONÇALVES, E. M. **Avaliação da polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*) nativa da Mata Atlântica da região de Capão Bonito - SP.** In: Workshop de Pós-Graduação e Pesquisa do Centro Paula Souza, 4. São Paulo, 03 - 05 de outubro de 2017.

BELESSIOTIS, V.; DELYANNIS, E. **Solar drying.** *Solar Energy*, v.85, n. 8, p. 1665-1691, 2011.

BENELLI, P. **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração.** Florianópolis: UFSC, 2010. 229 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. **Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 21, p. 411–420, 2013.

BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; NUNES, C. R.; PESSANHA, F. F.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. **Quantificação dos Teores de Taninos e Fenóis Totais e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Frutos de Aroeira.** *Vértices*, v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

BEZERRA, J. E. F.; LIRA-JUNIOR, J. S.; SILVA-JUNIOR, J. F. ***Eugenia uniflora* – Pitanga.** In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. *Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial – Plantas para o Futuro – Região Nordeste.* 1311 p. 2018

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** *Talanta*, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BINGÖL, E. B.; BOSTAN, K. **Effect of sodium lactate on the microbiological quality and shelf life of sausages.** *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 31, p.33-39, 2007.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; COSTA-SILVA, B.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. C.; VISENTAINER, J. V. **Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis.** *Chemistry Central Journal*, v. 8, n. 48, p. 1–9, 2014.

BOLLAND, J. L.; TEN-HAVE, P. **Kinetic studies in the chemistry of rubber and related materials. IV. The inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate.** *Transactions of the Faraday Society*, v. 43, p. 201-210, 1947.

BONA, E. A. M. D.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. **Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos.** Arquivos Do Instituto Biológico, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BORDIGNON, S. ***Eugenia uniflora* L.** 2014. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=11820](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=11820)>. Acesso em 30 jan. 2020.

BORDIGNON, S. ***Eugenia involucrata* DC.** 2013. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=10753](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=10753)>. Acesso em 30 jan. 2020.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. **Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies.** Methods in Enzymology, v. 186, p. 343–355, 1990.

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 de oxidação de biodiesel B100 em mistura com antioxidantes.** Química Nova, v. 33, n. 8, p. 1726–1731, 2010.

BOUAZIZ, A.; HORCHANI, H.; SALEM, N. B.; CHAARI, A.; CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. **Enzymatic propyl gallate synthesis in solvent-free system: Optimization by response surface methodology.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 67, p. 242–250, 2010.

BRANCO, L. G. B. **BIOCOMBUSTÍVEIS: VANTAGENS E DESAFIOS.** Revista Eletrônica de Energia, v. 3, n.1, p. 16-33, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Alimentos regionais brasileiros.** 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 484 p. 2015.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. **Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica:** de Jawetz, Melnick e Adelberg. 25. ed. Porto Alegre: AMGH, 875 p. 2012.

BUTNARIU, M.; GROZEA, I. **Antioxidant (Antiradical) Compounds.** Journal of Bioequivalence and Bioavailability, v. 4, n. 6, 2012.

BYERS, J. A. **Catálogo Phenomenex.** 2009. Disponível em: <<https://www.phenomenex.com/Info/Page/technicalguides>> Acesso em: 05 dez. 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.

CÁMARA, M.; SÁNCHEZ-MATA, M. C.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, R. M.; MANZOOR, S.; CACERES, J. O. **Lycopene.** In: Rahman, A. U. Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier BV, v. 63, p. 383–426, 2013.

CAMLOFSKI, A. M. O. **CARACTERIZAÇÃO DO FRUTO DE CEREJEIRA (*Eugenia involucrata* DC) VISANDO SEU APROVEITAMENTO TECNOLÓGICO.** Ponta Grossa: UEPG, 2008. 102 P. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Ponta Grossa, 2008.

CARASCHI, J. C.; GOVEIA, D.; DEZAJACOMO, G.; PRATES, G. A. **Evaluation of Biomass Properties for the Production of Solid Biofuels.** Floresta e Ambiente, v. 26, n. 2, 2019.

CARVALHO, A. L. **BIODIESEL DE SOJA: ESTUDO SOBRE ESTABILIDADE E PRODUTOS DE OXIDAÇÃO.** Salvador: UFBA, 2014. 189 p. Doutorado (Tese) - Programa de Pós-Graduação em Química Analítica. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

CARVALHO, A. F.; SILVA, D. M.; SILVA, T. R. C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M. R. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 16, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARVALHO, J. F. **COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS E INSUSTENTABILIDADE.** Ciência e Cultura. v. 60, n. 3, 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais.** Embrapa Algodão. Documentos 221. 1. ed. 19 p. 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Cerejeira - *Eugenia involucrata*.** Embrapa Florestas- Comunicado Técnico, n. 224, 8 p. 2009.

CARVALHO-JUNIOR, A. R.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. **Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (*Myrtaceae*).** Química Nova, v. 37, n. 3, 2014.

CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas.** Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 26 p. 2011.

CAZAROLLI, J. C. **POTENCIAL DETERIOGÊNICO DA MICROBIOTA NATIVA DE BIODIESEL DE SOJA (RS), BRASIL.** Porto Alegre: UFRGS, 2019. 234 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods.** Journal of Food and Drug Analysis, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CHAVES, M. C. C.; GOMES, C. F. S. **Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão.** Production, v. 24, n. 3, p. 495-507, 2014.

CHE-SULAIMAN, I. S.; BASRI, M.; FARD MASOUMI, H. R.; CHEE, W. J.; ASHARI, S. E.; ISMAIL, M. **Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology.** Chemistry Central Journal, v. 11, n.1, 2017.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças. Fisiologia e Manuseio.** 2. Ed, Lavras, MG: Ed. UFLA, 785 p., 2005.

CHOE, E.; MIN, D. B. **Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. v. 8, p. 345-358, 2009.

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

CONCEIÇÃO, M. M.; VALTER-JUNIOR, J. F.; ARAÚJO, A. S.; FARIAS, M. F. SANTOS, I. M. G.; SOUZA A. G. **Thermal and Oxidative Degradation of Castor Oil Biodiesel.** Energy and Fuels, v. 21, p. 1522–1527, 2007.

CORDEIRO, A. M. T. M.; MEDEIROS, M. L.; SILVA, M. A. A. D.; SILVA, I. A. A.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA, A. L.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. **Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 114, p. 827–832, 2013.

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

CORSINI, M. S.; JORGE, N. **ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEOS VEGETAIS UTILIZADOS EM FRITURAS DE MANDIOCA PALITO CONGELADA.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 1, p. 27-32, 2006.

COSTA, A.; YAMAOKA, R. S.; COSTA, M. A. T. **Matérias primas para produção de biodiesel.** IAPAR - Seminário Regional sobre a Produção e Uso Biodiesel na Bacia do Paraná III. 15 p., 2006.

COSTA, D. N. M. **AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES BHT E EXTRATO DE**

**MUFUMBO (Combretum leprosum) EM SÊMEN CRIOPRESERVADO DE EQUINOS, AVALIADO POR TESTES *IN VITRO*.** Teresina: UFPI, 2015. 94 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

COSTA, D. P.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. **Variabilidade sazonal de óleos essenciais de folhas de *Eugenia uniflora*.** Revista da Sociedade Brasileira de Química, v.20, n.7, 2009.

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

CRUZ, R. G. **Atividade antioxidante de extratos vegetais: estudo das condições de extração e aplicação em sistema lipídico.** Piracicaba: USP, 2014. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2014.

CUNHA, N. C. V. **COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE LÍPIDOS TOTAIS E AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO MÉTODO NA ANÁLISE DO PERFIL DOS ÁCIDOS GORDOS.** Viana do Castelo: IPVC, 2011. 189 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Gestão da Qualidade em Laboratórios, Instituto Politécnico de Viana do Castelo. Viana do Castelo, 2011.

CUNHA, R. P.; SOUSA, L. C.; ROCHA, C. P. **Caracterização e produção do biodiesel a partir do óleo de algodão como fonte de matéria prima para geração de energia sustentável.** In: Simpósio Internacional de Gestão de Projetos, 3.; Simpósio Internacional de Inovação e Sustentabilidade, 2., 2014, São Paulo. Anais... São Paulo, p. 1-9, 2014.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. **Antimicrobial activity of flavonoids.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.

DANLAMI, J. M.; ARSAD, A.; ZAINI, M. A. A.; SULAIMAN, H. **A comparative study of various oil extraction techniques from plants.** Reviews in Chemical Engineering, v. 30, n. 6, p. 605-626, 2014.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. **Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria.** Química Nova, v. 32, n. 3, 2009.

DAI, J.; MUMPER, R. J. **Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties.** Molecules, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.

DAMASCENO, S. S.; SANTOS, N. A.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. L.; SOUZA, A. G.; QUEIROZ, N. **Caffeic and ferulic acids: An investigation of the effect of antioxidants on the stability of soybean biodiesel during storage.** Fuel, v.

107, p. 641–646, 2013.

DE BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. **Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos.** Arquivos do Instituto Biológico, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

DECKER, E. A. **Antioxidant mechanisms.** In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 517-542, 2002.

DÉGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedade antioxidante de compostos fenólicos.** Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEGENHARDT, J.; FRANZON, R. C.; COSTA, R. R. **Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*)** Pelotas: Embrapa Clima Temperado – Documento 211, 22 p., 2007.

DEL-RÉ, P. V.; JORGE, N. **Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 14, n. 2, 2012.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y.H. **Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*.** Journal of Food and Drug Analysis, v. 22, n. 3, p.296–302, 2014.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B.; VECHIATTO, W. W. D.; WILHELM, H. M.; 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, n. 2, p. 416–423, 2007.

DUARTE, M. C. T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.** Revista Multiciência, v.2, n. 7, p. 1-16, 2006.

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

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. **Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol.** Energy Fuels, v. 16, n. 2, p. 443-450, 2002.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. **Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

FABIANE, K. C. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos vegetais**

**de folhas de espécies nativas de Myrtaceae.** Pato Branco: UTFPR, 2019. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

FARBSTEIN, D.; KOZAK-BLICKSTEIN, A.; LEVY, A. P. **Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease.** *Molecules*. v. 15, n.11, p. 8098–8110, 2010.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. **Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions.** *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1571–1578, 2011.

FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas.** *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1900–1905, 2007.

FARIAS, D. P.; NERI-NUMA, I. A.; ARAÚJO, F. F.; PASTORE, G. M. **A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims.** *Food Chemistry*, v. 306, 16 p., 2020.

FATTAH, I. 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*, v. 30, p. 356-370, 2014.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. **OXIDATIVE STABILITY OF BIODIESEL FROM SOYBEAN OIL FATTY ACID ETHYL ESTERS.** *Scientia Agricola*. v.62, n.3, p.291-295, 2005.

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

FERRONATO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDINARSKI, F.; ONOFRE, S. B. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C.(Asteraceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FLORA DO BRASIL. ***Eugenia myrcianthes* Nied.** - Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10466>>. Acesso em 29 jan 2020.

FLORA DO BRASIL. ***Eugenia uniflora* L.** - Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10560>>. Acesso em 29 jan. 2020

FOCKE, W. W.; WESTHUIZEN, I. V. D. ; 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.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 192 p., 2013.

FRANCO, D.; PINELO, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. **Processing of Rosa rubiginosa: Extraction of oil and antioxidant substances.** Bioresource Technology, v. 98, n. 18, p. 3506–3512, 2007.

FRANZOM, R. **Frutíferas nativas do sul do Brasil.** In: Simpósio Nacional do Morango, 2; Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 1., Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 124) p.251-264. 2004.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. **Araças do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos.** Embrapa Cerrados – Documentos 266, Planaltina, 48 p., 2009.

FREITAS, J. P. A.; FRANÇA, F. R. M.; SILVA, M. S.; TOMS, R. J.; SILVA, G. F. **AValiação DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS NATURAIS NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE BODIESEL DE ALGODÃO.** Revista Brasileira de Engenharia Química, v. 36, n. 2, 2019.

GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. **Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química.** Química Nova, v. 32, n. 3, p. 571-581, 2009.

GALVÃO, L. P. F. C. **Avaliação termoanalítica da eficiência de antioxidantes na estabilidade oxidativa do biodiesel de mamona.** Natal: UFRN: 2007, 159 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos.** São Paulo: Nobel, 284 p. 1977.

GAZINEU, M. H. P. **Teores de Radionuclídeos em Processos de Extração e de Produção de Petróleo no Nordeste do Brasil.** Recife: UFPE, 2005. 163 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

GERPEN, J. V. **Biodiesel processing and production.** Fuel Processing Technology, v. 86, n. 10, p. 1097–1107, 2005.

GIEHL, E. L. H. **Eugenia uniflora L.** 2008. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=147](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=147)>. Acesso em 30 jan. 2020.

GHOSH, D. **Tannins from foods to combat diseases**. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v. 4, n. 5, p. 40–44, 2015.

GIRDHAR, S.; GIRDHAR, A.; VERMA, S. K.; LATHER, V.; PANDITA, D. **Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases : from animal models to clinical trials**. Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine, v. 1, n. 3, p. 91–100. 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374–381. 2007.

GOLDEMBERG, J. **Ethanol for a sustainable energy future**. Science, v. 315, p. 808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. **Energias renováveis: um futuro sustentável**. Revista USP, n. 72, p. 6-15, 2007.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B. N.; COELHO, S. T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 152 p., 2008.

GOLOLO, S. S. **Potential Adverse Effects of Alteration of Phytochemical Accumulation in Fruits and Vegetables**. In: ASAO, T. Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention. 1. Ed. London: IntechOpen, p. 179-187, 2018.

GOMIDE, R. **Operações unitárias: operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Gomide, 1983.

GONDIM, A. D.; ALBUQUERQUE, M. H. O.; MARTINS, A. F.; BRASIL, R. C. O. D.; ARAÚJO, A. S.; FERNANDES-JÚNIOR, V. J. **Avaliação da Estabilidade Oxidativa de Biodiesel Metílico de Girassol com Adição de Diferentes Concentrações de BHT pelo Método Rancimat e PDSC**. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 4. Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: Anais... Campina grande: Embrapa Algodão, p. 18-23, 2010.

GOYAL, A. K.; MIDDHA, S. K.; SEN, A. Evaluation of the DPPH radical scavenging activity, total phenols and antioxidant activities in Indian wild *Bambusa vulgaris* "Vittata" methanolic leaf extract. **Journal of Natural Pharmaceutical**, v. 1, n. 1, p. 34-39, 2010.

GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F. **Métodos de Avaliação das Condições Hídricas das Plantas**. Embrapa Arroz e Feijão - Comunicado Técnico 161. Santo Antônio de Goiás, 8 p. 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes**. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUITTAT, L. **Interaction of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures.** Biochemistry, v.85, p.535-541, 2003.

GULLON, B.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; EIBES, G. **RUTIN: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability.** Trends in food science and technology, v. 67, p. 220-235, 2017.

GUPTA, R. B.; DEMIRBAS, A. **Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants.** New York: Cambridge, 230 p. 2010.

HAAS, M. J.; FOGLIA, T. A. **Matérias primas alternativas e tecnologias para produção de biodiesel.** In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual de Biodiesel. São Paulo: Edgard Blücher, p. 46-66, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **The definition and measurement of antioxidants in biological systems.** Free Radical Biology and Medicine, v. 18, p. 125–126, 1995.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** Chapman & Hall, London, 3 ed. p. 320, 1988.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action.** Journal of Natural Products, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASSAN, M. H.; KALAM, M. A. **An Overview of Biofuel as a Renewable Energy Source: Development and Challenges.** Procedia Engineering. v. 56, p. 39–53, 2013.

HAY, F. J. **Soybeans for Biodiesel Production.** Farm Energy, 2019. Disponível em: <<https://farm-energy.extension.org/soybeans-for-biodiesel-production/>>. Acesso em 07 dez. 2019.

HILL, E. C.; HILL, G. C. **Microbial Contamination and Associated Corrosion in Fuels, during Storage, Distribution and Use.** Advanced Materials Research, v. 38, p. 257–268, 2008.

HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, W. **A mini review on renewable sources for biofuel.** Bioresource Technology, v. 169, p. 742–749, 2014.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e Fatores que Influenciam a Composição em Alimentos.** Alimentos e Nutrição, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

HURRELL, R. F. **Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability.** The Journal of Nutrition. v. 133, n. 9, p. 2973-2977, 2003.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. **Atividade Antioxidante de Resíduos**

**Agroindustriais de Frutas Tropicais.** Alimentos e Nutrição. v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

JABEEN, K.; JAVAID, A. **Antifungal activity of *Syzygium cumini* against *Ascochyta rabiei*—The cause of chickpea blight.** Natural Product Research, v. 24, p. 1158–1167, 2010.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Considerações sobre Biodiesel como Biocombustível Alternativo ao Diesel.** Embrapa Informática Agropecuária – Documentos 93. 25 p., 2009.

JAYACHANDRA, K; DEVI, V. S. ***In vitro* antioxidant activity of methanolic extract of *Syzygium cumini* Linn.bark.** Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, v. 2, n. 12, p. 45-49, 2012

JAYAPRAKASHA, G. K.; GIRENNAVAR, B.; PATIL, B. S. **Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems.** Bioresource Technology, v. 99, n. 10, p. 4484–4494 2008.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Companhia Editora Nacional, 634 p. 1966.

JORGENSEN, J. H.; FERRERO, M. J. **Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices.** Clinical Infectious Diseases, v. 26, p. 973-80, 1998.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. **Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils.** Current Medicinal Chemistry, v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.

KEBEDE, M.; ADMASSU, S. **Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products.** Advances in Food Technology and Nutritional Sciences – Open Journal. v. 5, n. 2, p. 38-49, 2019.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; FOLEY, W. J. **A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae.** Australian Journal of Botany. v. 56, p. 197–213, 2008.

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; BAZZAZ, B. S. F. **Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint.** Antimicrobial Resistance and Infection Control, v. 8, n.118, 2019.

KHOO, H. E.; AZLAN, A.; TANG, S. T.; LIM, S. M. **Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits.** Food and Nutrition Research, v. 61, n. 1, 2017.

KNOTHE, G.; RAZON, L. F. **Biodiesel fuels.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 58, p. 36–59, 2017.

KOLEVA, I. I.; VAN-BEEK, T. A.; LINNSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. **Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative**

**Study on Three Testing Methods.** *Phytochemical Analysis*, v. 13, n. 1, p. 8–17, 2002.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. **Anthocyanins-more than nature's colours.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 5, p. 239–240, 2004.

KOYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYASHIMA, J. **A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kiso hinoki), *Chamaecyparis obtusa*.** *General Pharmacology*, v. 28, p. 797-804, 1997.

KREIVAITIS, R.; GUMBYTĖ, M.; KAZANCEV, K.; PADGURSKAS, J.; MAKAREVIČIENĖ, V. **A comparison of pure and natural antioxidant modified rapeseed oil storage properties.** *Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 511–516, 2013.

KRÜMMEL, A. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE COGUMELO OSTRÁ (*Pleurotus sajor-caju*).** Florianópolis: UFSC, 2018. 135 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

KUMAR, V. N. P.; ELANGO, P.; ASMATHULLA, S.; KAVIMANI, S. **A Systematic Review on Lycopene and its Beneficial Effects.** *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 10. n. 4, 2017.

KURUTAS, E. B. **The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state.** *Nutrition journal*, v. 15, n. 1, 71 p., 2016.

LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. **Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications.** *Biochemical Society Transactions*, v. 35, n. 5, p. 1156–1160, 2007.

LEE, S. K.; KADER, A. A. **Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops.** *Postharvest Biology and Technology*, v. 20, n. 3, p. 207–220, 2000.

LIMA, B. A. G.; MOREIRA, I. R.; MIRANDA, P. K. B.; SOUZA, M. P. G.; ABRANTES, A. C. N. **Análise Comparativa do Índice de Acidez e Purificação do Óleo Residual Usado em Frituras para Sintetização do Biodiesel.** In: Congresso Brasileiro de Química, 55. Goiânia-GO, 2 a 6 novembro, 2015.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A. M.; LIMA, D. E. S. **FENÓLICOS E CAROTENÓIDES TOTAIS EM PITANGA.** *Scientia Agricola*, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. **Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*.** *Food Chemistry*, v. 105, n. 2, p. 548–554, 2007.

LIU, Y.; TIKUNOV, Y.; SCHOUTEN, R. E.; MARCELIS, L. F. M.; VISSER, R. G. F.; BOVY, A. **Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review**. *Frontiers in Chemistry*, v. 6, 2018.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos**. *Química Nova*, v.32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LOFTHUS, S.; NETZER, R.; LEWIN, A. S.; HEGGESET, T. M. B.; HAUGEN, T.; BRAKSTAD, O. G. **Biodegradation of n-alkanes on oil-seawater interfaces at different temperatures and microbial communities associated with the degradation**. *Biodegradation*, v. 29, n. 2, p. 141–157, 2018.

LORCA, G. G.; AMAT, A. G.; GONZÁLEZ, C. **Análisis Comparativo de Caracteres Diagnósticos para la Identificación de Tres Especies Argentinas de Myrtaceae empleadas en la Medicina Popular**. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v. 14, n. 2, p. 81-86, 1995.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, 368 p., 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512 p., 2002.

LOSEKANN, L.; HALLACK, M. **NOVAS ENERGIAS RENOVÁVEIS NO BRASIL: DESAFIOS E OPORTUNIDADES**. In: NEGRI, J. A.; ARAÚJO, B. C.; BACELETTE, R. *Desafios da Nação: artigos de apoio*. v. 2. p. 631-655, 2018.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. **Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob processo de termoxidação**. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 68, n.1, 2009.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. **Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jambolão (*Syzygium cumini* L.)**. *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 2, p. 219-223, 2009b.

MA, F.; HANNA, M. A. **Biodiesel Production: a review**. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.

MACHADO, P. F. S. ***Eugenia myrcianthes* Nied**. 2018. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=18486](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=18486)>. Acesso em 30 jan. 2020.

MACHADO, P. F. S. ***Eugenia myrcianthes* Nied**. 2019. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=19334](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=19334)>. Acesso em 30 jan. 2020.

MAHAJAN S, TUTEJA N. **Cold, salinity and drought stresses: An overview**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 444, n. 2, p. 139–158.

2005.

MAHDI-POUR, B.; JOTHY, S. L.; LATHA, L. Y.; CHEN, Y.; SASIDHARAN, S. **Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara***. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 2, n. 12, p. 960–965, 2012.

MAISETTA, G.; BATONI, G.; CABONI, P.; ESIN, S.; RINALDI, A. C.; ZUCCA, P. **Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus***. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 19, n. 1, p 1-12, 2019.

MARCINIUK, L. L. **Catalisadores heterogêneos ácidos inéditos para a produção de ésteres metílicos e etílicos de óleos vegetais**. Campinas: UNICAMP, 2007. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

MARGIS, R.; CALDAS, J. F.; FELIX, D. B.; SALGUEIRO, F.; ARAUJO, D. S. D.; BREYNE, P.; MONTAGU, M. V.; OLIVEIRA, D.; MARGIS-PINHEIRO, M. **Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest**. Biodiversity and Conservation, v. 11, p. 149–163, 2002.

MARIN, R.; APEL, M. A.; LIMBERGER, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. **Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Southern Brazil**. Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, n. 2, p. 172-177, 2008.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. **Solubilidade das substâncias orgânicas**. Química Nova, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. **Drug development: Lessons from nature**. Biomedical Reports, v. 6, n. 6, p. 612-614, 2017.

MAXWELL, A. **DNA gyrase as a drug target**. Trends Microbiology, v. 5, n. 3, p. 102–109, 1997.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. **The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding**. Molecular Nutrition and Food Research. v. 51, n. 6, p. 702-713, 2007.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.

MEHTA, N.; PATANI, P.; SINGHVI, I. **A REVIEW ON TOMATO LYCOPENE**. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 9, n. 3, p. 916-923, 2018.

MELHORANÇA-FILHO, A. L.; PEREIRA, M. R. R. **ATIVIDADE**

**ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS EXTRAÍDOS DE AÇAÍ E DE PUPUNHA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Staphylococcus aureus*.** Bioscience Journal, v. 28, n. 4, p. 598-603, 2012.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. **Taninos.** In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. Ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, p. 517-543, 2001.

MERWE, M. M.; WYK, A. E.; BOTHA, A. M. **Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa.** Plant Systematic and Evolution, v. 251, n. 1, p. 21-34, 2005.

MEULLEMIESTRE, A.; PETITCOLAS, E.; MAACHE-REZZOUG, Z.; CHEMAT, F.; REZZOUG, S. A. **Impact of ultrasound on solid-liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 28, 230-239, 2016.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. **Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels.** Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 25, n. 2, 2006.

MITTELBAACH, M.; SCHOBER, S. **The influence of antioxidants on the oxidation stability of biodiesel.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 80, p. 817-823, 2003.

MIYASHIRO, C. S.; OLIVEIRA, C.; CAMPOS, E.; TELEKEN, J. G. **Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos residuais.** Revista Brasileira de Energias Renováveis, v. 1, p. 63-76, 2013.

MOLZ, M. ***Eugenia uniflora* L.** 2009. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=949](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=949)>. Acesso em 30 jan. 2020.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia.** Química Nova, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, T. O. **SENSORES FOTOELETROQUÍMICOS EXPLORANDO O TETRACIANOETILENETO DE LÍTIO (LITCNE) NA DETERMINAÇÃO DO ANTIOXIDANTE TERC-BUTIL HIDROQUINONA (TBHQ).** São Luís: UFMA, 2017. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

MORITZ, B.; TRAMONTE, V. L. C. **Biodisponibilidade do licopeno.** Revista de Nutrição, v. 19, n. 2, p. 265-273, 2006.

MORTON, J. **Jambolan - *Syzygium cumini* Skeels.** In Morton, J. Fruits of warm climates. FL: Creative Resource Systems Inc. p. 375-378, 1987.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel**. Química Nova, v. 32, n.3, p. 639–648, 2009.

MOURA, G. S.; OLIVEIRA, I. J.; BONOME, L. T. S.; FRANZENER, G. ***Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant**. Arquivos Do Instituto Biológico, v. 85, 2018.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. **Natural antioxidants from residual sources**. Food Chemistry, v. 72, n. 2, p. 145–171, 2001.

MÜLLER, C.; MARTINI, F.; MEDINA, R. **A Evolução e os Microrganismos**. 1. ed. Porto Alegre: PUCRS, 6 p., 2010.

NASCIMENTO, R. S.; ALVES, G. M. **Fontes Alternativas e Renováveis de Energia no Brasil: Métodos e Benefícios Ambientais**. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 20; Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 16; Encontro de Iniciação à Docência, 6. Maringá, 6 p., 2016.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 41 n.5, p.1523-1542, 2006.

NAGY, B.; SIMÁNDI, B. **Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika**. The Journal of Supercritical Fluids. v. 46, n. 3, p. 293-298, 2008.

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/servicos/saude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2019.

NEVES, A. C. **AVALIAÇÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM ÓLEO DIESEL**. Cascavel: Unioeste, 2018. 66 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

NG, Y. P.; OR, T. C. T.; IP, N. Y. **Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease**. Neurochemistry International, v. 89, p. 260–270, 2015.

NIELSEN, S. S. **Food Analysis**. 5. Ed. Springer: Indiana, 649 p. 2017.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. E. V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K. V.; LEEUWEN, P. A. V. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**. The American Journal of Clinical Nutrition, v.

74, n. 4, p.418–425, 2001.

NOGUEIRA, H. S.; XAVIER, A. R. E. O.; XAVIER, M. A. S.; CARVALHO, A. A.; MONÇÃO, G. A.; BARRETO, N. A. P. **ANTIBACTERIANOS: PRINCIPAIS CLASSES, MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA**. Revista Unimontes Científica, v. 18, n. 2, 2016.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. **Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13, p. 5-7, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; ANDRADE, F. S.; DIAZ, M. E. P.; IQUIAPAZA, R. A. **Colonização por micro-organismo resistente e infecção relacionada ao cuidar em saúde**. Acta Paulista de Enfermagem, v. 25, n. 2, 2012.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes**. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, J. F. G.; LUCENA, I. L.; SABOYA, R. M. A.; RODRIGUES, M. L.; TORRES, A. E. B.; FERNANDES, F. A. N.; CAVALCANTE-JUNIOR, C. L.; PARENTE, E. J. S. **Biodiesel production from waste coconut oil by esterification with ethanol: The effect of water removal by adsorption**. Renewable Energy, v. 35, n. 11, p. 2581–2584, 2010.

OGUNWANDE, I.; OLAWORE, N.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.; SCHMIDT, J.; SETZER, W. **Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L.** International Journal of Aromatherapy, v. 15, n. 3, p. 147–152, 2005.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; 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, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. **BIOFUELS: ALTERNATIVE FEEDSTOCKS AND CONVERSION PROCESSES**. 1 ed. Academic Press. 642 p. 2011.

PARR, A. J.; BOLWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. **The potential of possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 7, p. 985-1012, 2000.

PASSMAN, F. J. **Manual 47 – Fuel and Fuel System Microbiology: Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control**. ASTM International, West Conshohocken, 114 p., 2003.

PASSMAN, F. J. **Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review.** International Biodeterioration and Biodegradation, v. 81, p. 88–104, 2013.

PĂTRĂUȚANU, O. A.; LAZĂR, L.; POPA, V. I.; VOLF, I. **INFLUENCE OF PARTICLE SIZE AND SIZE DISTRIBUTION ON KINETIC MECHANISM OF SPRUCE BARK POLYPHENOLS EXTRACTION.** Cellulose Chemistry and Technology, v. 53, p. 71-78, 2019.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. **Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives.** Food and Bioprocess Technology, v. 3, p. 340–372, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. **Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results.** Food Research International, v. 41, n. 3, p. 274–285, 2008.

PESSANHA, F. F. ***Eugenia uniflora L. (Myrtaceae): caracterização e avaliação dos compostos fenólicos, da vitamina C e da atividade antioxidante dos frutos da pitangueira.*** Campos Dos Goytacazes: UENF, 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos Dos Goytacazes, 2010.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. **Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 6, p. 2111–2117, 2005.

PINHO, L. A.; TEIXEIRA, F. L. **BIODIESEL NO BRASIL: UMA ANÁLISE DA REGULAÇÃO E SEUS REFLEXOS NA DIVERSIFICAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS USADAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO.** Revista Brasileira de Administração Política, v. 8, n. 2, p.141-161, 2015.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. **Biodiesel: an overview.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, n. 6, p. 1313–1330, 2005.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas.** Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 5, 2017.

POLJŠAK, B.; IONESCU, J. **Pro-oxidant vs. Antioxidant effects of Vitamin C.** In: KUCHARSKI, H.; ZAJAC, J. Handbook of Vitamin C Research: Daily Requirements, Dietary Sources and Adverse Effects, p.153-183, 2009.

PRADO, A. C. P. **Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]**. Florianópolis: UFSC, 2008. 131 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PRASAD, K. N.; CHEW, L. Y.; KHOO, H. E.; KONG, K. W.; AZLAN, A.; ISMAIL, A. **Antioxidant Capacities of Peel, Pulp, and Seed Fractions of *Canarium odontophyllum* Miq. Fruit**. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 8 p., 2010.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n.10, p. 4290–4302, 2005.

QUEIROZ, J. M. G.; SUZUKI, M. C. M.; MOTTA, A. P. R.; NOGUEIRA, J. M. R.; CARVALHO, E. M. **Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico**. Revista Fitos, v. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, L.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, W. J. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. **The path forward for biofuels and biomaterials**. Science. v. 311, n. 27, p. 484-489, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos**. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

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

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

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. **Antioxidants**. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. 2. Ed. New York: Marcel Dekker, p. 489-516, 2002.

REYES, A. E. L. **Árvores Frutíferas - Pessegueiro-do-Mato**. 2003. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/trilhas/fruti/fr06.php>>. Acesso em 30 jan. 2020.

REZAIE, M.; FARHOOSH, R.; IRANSHAHI, M.; SHARIF, A.; GOLMOHAMADZADEH, S. **Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties**. Food Chemistry, v. 173, p. 577-583, 2015

RIBEIRO, E. T. S. **EMPREGO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO A ALTA E BAIXA**

**PRESSÃO PARA OBTENÇÃO DE POLIFENÓIS ANTIOXIDANTES DO SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL DE MAÇÃ.** Florianópolis: UFSC, 2007. 133 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

RIBEIRO, M. D.; CALERA, G. C.; FLUMIGNAN, D. L. **DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÉSTERES EM BIODIESEL PROVENIENTES DE MATÉRIAS-PRIMAS DE BAIXA QUALIDADE POR CROMATOGRAFIA GASOSA.** Revista Brasileira de Energias Renováveis, v.6, n.1, p.29-38, 2017.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. **Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral.** Química Nova, v. 30, n. 5, p. 1374–1380, 2007.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.** Baltimore: Williams and Wilkins. 337 p. 1996.

ROCCHETTI, G., BLASI, F., MONTESANO, D., GHISONI, S., MARCOTULLIO, M. C., SABATINI, S.; LUCINI, L. **Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of *Moringa oleifera* leaves.** Food Research International, v. 115, p. 319-327, 2019.

RODRIGUES, N. M.; SANDINI, T. M.; PEREZ, E. **Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., Myrtaceae (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR.** Biosaúde, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2010.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** Food Chemistry, v. 92, n. 2, p. 235–254, 2005.

ROLLINS, D. M. **Basic Mechanisms of Antibiotic Action and Resistance.** 2000. Disponível em: <<https://science.umd.edu/classroom/bsci424/Chemotherapy/AntibioticMechanisms.htm>>. Acesso em 16 jan. 2020.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. **Os gêneros *Calycorectes* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg, *Myrcianthes* O. Berg, *Myrciaria* O. Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil.** Acta Botanica Brasilica, v. 18, n. 3, p. 613-627, 2004.

ROQUE, M. J. R.; FORTUNY, R. S.; BELLOSO, O. M. **Methods for Determining the Antioxidant Capacity of Food Constituents.** In: YAHIA E. M. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health. 2. Ed. New Jersey: Wiley Blackwell. p. 803-816, 2017.

ROSA, J. S.; GODOY, R. L. O.; NETO, J. O.; CAMPOS, R. S.; MATTA, V. M.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, R. S. **Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n.4, p. 837–846. 2007.

ROSA, R. L. **Avaliação do potencial gastroprotetor e antiúlcera das sementes**

da *Eugenia involucrata* DC. (cereja do mato) e *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jaca) em roedores. Itajaí: UNIVALI, 2013. 95 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2013.

ROZYCKI, V. R.; BAIGORRIA, C. M.; FREYRE, M. R.; BEMARD, C. M.; ZANNIER, M. S.; CHARPENTIER, M. **Composición de nutrientes en especies vegetales autóctonas de la región Chaqueña, Argentina.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 47, n. 3, p. 265-270, 1997.

SABINO, L. B. S.; BRITO, E. S.; SILVA-JÚNIOR, I. J. **Jambolan— *Syzygium jambolanum*.** Exotic Fruits, p. 251–256, 2018.

SÁEZ-LLORENS, X.; WONG, M. M. C.; CASTAÑO, E.; SUMAN, O.; MORÖS, D.; ATENCIO, I. **Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country.** The Pediatric Infectious Disease Journal, v. 19, p. 200-206, 2000.

SALAS, M. P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H.; DAZ, M.; RESNIK, S. L. **Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species.** Food Chemistry, v. 124, n. 4, p. 1411-1415, 2011.

SALES, H. J. S. P. ***Lavandula* L. - application of in vitro cultivation for the essential oils production and their economic potential in Portugal.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.17, n. 4, supl. 2, 2015.

SALLET, C. L.; ALVIM, A. M. **Biocombustíveis: uma análise da evolução do biodiesel no Brasil.** Economia e Tecnologia, v. 25, 2011.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. **The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination.** Analytical Methods, v. 5, n. 21, p. 5990–5999, 2013.

SANTOS, D. N. **Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.).** Pirassununga: USP, 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências. Universidade Estadual de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. **Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão.** Estação Científica, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SANTOS, F. R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R. N. **Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na composição química do óleo essencial.** Química Nova, v. 38, n. 6, p. 762-768, 2015.

SANTOS, J. R. J. **BIODIESEL DE BABAÇU: Avaliação Térmica, Oxidativa e**

**Misturas Binárias.** João Pessoa: UFPB, 2008. 103 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.

SANTOS, K. C. **PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIA (TRANS)ESTERIFICAÇÃO ETÍLICA SUPERCRÍTICA EM REATOR CONTÍNUO.** Curitiba: UFPR, 2018. 84 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal Do Paraná. Curitiba, 2018.

SANTOS, M. A. T. **Caracterização química das folhas de brócoli e couve-flor (*Brassica oleracea* L.) para utilização na alimentação humana.** Lavras: UFLA, 2000. 81 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

SANTOS, N. Q. *A RESISTÊNCIA BACTERIANA NO CONTEXTO DA INFECÇÃO HOSPITALAR. Texto e Contexto Enfermagem, v. 13, p. 64-70, 2004.*

SANTOS, S. R. ***Eugenia myrcianthes* Nied.** 2010. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=2240](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=2240)>. Acesso em 30 jan. 2020.

SANTOS, W. J. **EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA FOLHA DE MANGUEIRA (*Mangifera indica* L.) UTILIZANDO CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO, ÁGUA E ETANOL.** Campinas: UNICAMP, 2013. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SANVIDO, M. E.; SCOPEL, J. M.; CASSEL, E.; LUCAS, A. M. **ANÁLISE COMPARATIVA DO TEOR DE FLAVONOÍDES E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE BACCHARIS UNCINELLA OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E MACERAÇÃO.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 11. Campinas, v. 1, n.3, p. 708-713, 2015.

SAWER, I. K; BERRY, M. I.; FORD, J. L. **The killing effect on *Staphylococcus aureus*.** Letters in Applied Microbiology, v.40, p. 24-29, 2005.

SAXENA, M.; SAXENA, J.; PRADHAN, A. **FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS AS ANTIOXIDANTS IN PLANTS AND HUMAN HEALTH.** International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v. 16, n.2, p. 130-134, 2012.

SCALBERT, A. **Antimicrobial properties of tannins.** Phytochemistry, v. 30, n.12, p. 3875–3883, 1991.

SCHLINDWEIN, C. **AÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL.** Guarapuava: Unicentro, 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Bioenergia. Unicentro. Guarapuava, 2017.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ZÚÑIGA, J.; DUTRA-BEHRENS, M.; HABERMEHL, G. **Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Flavonoids and Tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae)**. *Phytotherapy Research*, v. 10, n. 3, p. 260–262, 1996.

SCHOFIELD, P. MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. **Analysis of condensed tannins: a review**. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, p. 21-40, 2001.

SENEVIRATHNE, M.; JEON, Y.; HA, J.; KIM, S. **Effective drying of citrus by-product by high speed drying: A novel drying technique and their antioxidant activity**. *Journal of Food Engineering*, v.92, p. 157-163, 2009.

SHAHIDI, F.; HO, C. **Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products**. American Chemical Society, Washington, DC. 320 p, 2005.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. **Phenolic antioxidants**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. **Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils**. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. 2. Ed. New York: Marcel Dekker, p. 464-488, 2002.

SHEBIS, Y.; ILUZ, D.; KINEL-TAHAN, Y.; DUBINSKY, Z.; YEHOSHUA, Y. **Natural antioxidants: Function and sources**. *Biomedical And Life Sciences*, v. 4, n. 6, p. 643-649, 2013.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. **Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L.** *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 20, n. 1, p. 381–388, 2016.

SILVA, C. R. ***Eugenia myrcianthes* Nied.** 2014. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=12494](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=12494)>. Acesso em 30 jan. 2020

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. **Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region**. *Food Chemistry*, v.101, n. 3, p. 1012–101, 2007.

SILVA, F. A. M., BORGES, M. F. M., & FERREIRA, M. A. **Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante**. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.

SILVA, J. C. ***Eugenia involucrata* DC.** 2010. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=4509](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4509)>. Acesso em 30 jan. 2020.

SILVA, N. L. **PRODUÇÃO DE BIODIESEL: PROCESSO E CARACTERIZAÇÕES**. Campinas: UNICAMP, 2010. 192 p. Tese (Doutorado) -

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010b.

SINGH, L.; SURUCHI, S.; SHARMA, S. K. **A review on medicinal plants having antioxidant potential.** Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology. v. 1, n. 3, p. 404-409, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.** Methods in Enzymology, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOARES, B. V. **Estudo fitoquímico e antifúngico de extratos de plantas contra *Microsporum canis* e *Cândida* spp. isolado de cães.** Fortaleza: UECE, 2008, 95 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

SOFOS, J. N.; GEORNARAS, I. **Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157: H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products.** Meat Science, v. 86, n. 1, p. 2-14, 2010.

SONIA, N. S.; MINI, C.; GEETHALEKSHMI, P. R. **Vegetable peels as natural antioxidants for processed foods – a review.** Agricultural Reviews. v. 37, n. 1, p. 35-41, 2016.

SORIANO, A. U.; MARTINS, L. F.; VENTURA, E. S. A.; LANDA, F. H. T. G.; VALONI, É. A.; FARIA, F. R. D.; CARMO, F. L. **Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration.** International Biodeterioration and Biodegradation, v. 99, p. 102-114, 2015.

SOUSA, D. M. **AVALIAÇÃO DE EXTRATOS NATURAIS NA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO BODIESEL E ANTIMICROBIANO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.** Toledo: Unioeste, 2019. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. **Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties.** Chemistry and Biodiversity, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. **Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante.** Eclética Química, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** 4. Ed. Sinauer Associates Inc.,

Sunderland, Massachusetts: 2006.

TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.; CLIVER, D. **Antimicrobial herb and spice compounds in food**. Food Control, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

TAPANES, N. C.; ARANDA, D. A. G.; PEREZ, R. S.; CRUZ, Y. R. **Biodiesel no Brasil: matérias primas e tecnologias de produção**. Acta Scientie and Technicae, v.1, n.1, 2013.

TASAN, M.; DEMIRCI, M. **Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining**. European Food Research and Technology, v. 220, p. 251–254, 2005.

THAVAMONEY, N.; SIVANADIAN, L.; TEE, L. H.; KHOO, H. E.; PRASAD, K. N.; KONG, K. W. **Extraction and recovery of phytochemical components and antioxidative properties in fruit parts of *Dacryodes rostrata* influenced by different solvents**. Journal of Food Science and Technology, v. 55, n. 7, p. 2523–2532, 2018.

THOURI, A.; CHAHDOURA, H.; EL AREM, A.; OMRI HICHRI, A.; BEN HASSIN, R.; ACHOUR, L. **Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti)**. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 17, n. 1, 2017.

TIVERON, A. P.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; ALENCAR, S. M. **Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition**. International Journal of Molecular Sciences, v. 13, n. 7, p. 8943–8957, 2012.

TOLEDO, A. G. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata* DC**. Cascavel: Unioeste, 2018. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

TOMAZIN-JUNIOR, C. **Extração de óleo de soja com etanol e transesterificação etílica na miscela**. Piracicaba: USP, 2008, 64 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2008.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 760 p., 2008.

TRESSELER, J. F. M.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MACHADO, T. F.; DELFINO, C. M.; SOUSA, P. H. M. **Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas**. Ciência e Agrotecnologia. v. 33, 2009.

TRIBUZY, E. S. **Variações da Temperatura Foliar do Dossel e o seu Efeito na Taxa Assimilatória do CO<sub>2</sub> na Amazônia Central.** São Paulo: USP, 2005. 84 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ecologia de Agroecossistemas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. **Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas.** Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 6 p. 2016.

VAN-GERPEN, J. **Biodiesel processing and production.** Fuel Processing Technology, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

VAZ, F. S. **Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento.** Goiânia: UFG, 2010. 46 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

VECHI, G. **Potencial Biológico e Composição Química das Folhas de *Eugenia involucrata* DC. (cerejinha do mato).** Itajaí: UNIVALI, 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2015.

VENSKUTONIS, P. R. **Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.).** Food Chemistry, v. 59, n. 2, p. 219-227, 1997.

VIDAL, M. F. **PRODUÇÃO E USO DE BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL.** Caderno Setorial ETENE, v. 4, n. 79, 2019.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. **Caracterização das Propriedades Funcionais do Jambolão. Embrapa Clima Temperado.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 79, 26 p., 2008.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. **Application of NMR spectroscopy to assess oxidative stability of canola and soybean oils.** Journal Food Lipids. v.1, p. 15-24, 1993.

WCED - WORLD COMMISSION ON ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT. **Our Common Future.** Oxford and New York: Oxford University Press, 1987.

WHITE, J.; GILBERT, J.; HILL, G.; HILL, E.; HUSE, S. M.; WEIGHTMAN, A. J.; MAHENTHIRALINGAM, E. **Culture-Independent Analysis of Bacterial Fuel Contamination Provides Insight into the Level of Concordance with the Standard Industry Practice of Aerobic Cultivation.** Applied and Environmental Microbiology, v. 77, n. 13, p. 4527-4538, 2011.

WILSON, D. W.; NASH, P.; BUTTAR, H. S.; GRIFFITHS, K; SINGH, R.;

MEESTER, F.; HORIUCHI, R.; TAKAHASHI, T. **The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview.** *Antioxidants* (Basel). v. 6, n. 4, p. 81, 2017.

WINK, M. **Modes of action of alkaloids.** In: ROBERTS, M. F.; WINK, M. *Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications.* New York: Plenum, p. 301-326, 1998.

WINKEL-SHIRLEY, B. **Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology.** *Plant Physiology*, v.126, p.485-493, 2001.

WITT, E. P. **Avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel (B100) comercial na presença de antioxidantes naturais da casca de romã.** Toledo: Unioeste, 2018. 139 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2018.

XIN, J.; IMAHARA, H.; SAKA S. **Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidant.** *Fuel*, v. 88, p. 282–286, 2009.

XU, D. P.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; LI, H. B. **Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, 2017.

YADAV, A.; KUMAR, R.; YADAV, A.; MISHRA, J. P. **Antioxidants and its functions in human body - A Review.** *Research in Environment and Life Sciences*, v. 9, n. 11, p. 1328-1331, 2016.

YASHIN, A.; YASHIN, Y.; XIA, X.; NEMZER, B. **Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review.** *Antioxidants*, v. 6, n. 3, 2017.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; TSAI, C. L. **Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 1, p. 67–70, 1993.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. **Antioxidants in health and disease.** *Journal of Clinical Pathology*, v. 54, n. 3, p. 176–186, 2001.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R.; MORIM, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZIMMER, A. R. **Monitoramento e controle da contaminação microbiana durante o armazenamento simulado de misturas diesel/biodiesel com uso de biocida.** Porto Alegre: UFRGS, 2014. 241 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. M.; COIMBRA, J. S. R.; MARTINS, E. C. A.; SILVA,

D. X.; TELIS-ROMERO, J. **REVISÃO: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO BIODIESEL.** Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 21, p. 55-72, 2011.