

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA – MESTRADO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA ERVA MATE (*Illex paraguariensis* St.
Hill) PARA USO NA ESTABILIZAÇÃO OXIDATIVA DO BIODIESEL**

ALINI RAFAELA NEITZKE PETERS

TOLEDO – PR - BRASIL

Setembro de 2022

ALINI RAFAELA NEITZKE PETERS

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA ERVA MATE (*Illex paraguariensis* St.
Hill) PARA USO NA ESTABILIZAÇÃO OXIDATIVA DO BIODIESEL**

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. Salah Din Mahmud Hasan

TOLEDO – PR - BRASIL

Setembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador, Professor Doutor Salah Din Mahmud Hasan, por ter aceito ser meu orientador, apoiando-me e conduzindo os estudos da melhor forma possível, sendo sempre compreensível e maleável com a condição e situação de vida em que me encontrava durante o período de execução das atividades de laboratório e escrita. Levarei para a vida não somente seus ensinamentos técnicos, mas também, a forma como teve empatia por minha pessoa durante todo o período em que juntos convivemos. Certamente é um exemplo de professor e de pessoa. Ao professor Edson Antônio da Silva, pelo apoio técnico e utilização da estrutura de seu laboratório.

Ao meu filho, Kaleo, que sempre me mostrou que tudo se ajeita da forma como deve ser e que mesmo com tantos atributos e tarefas, sou capaz de conseguir dar início e seguimento àquilo que desejo, chegando da melhor maneira possível a conquista dos meus objetivos. A minha mãe Lenir, que mesmo distante, se desdobrou sempre que possível para me ajudar e me apoiar.

Aos colegas de laboratório, Elissandro Klein, Carina Triques, Calisto Nonato Silva Junior e Tales Prado que jamais mediram esforços para me auxiliar quando necessitei, transmitindo seus conhecimentos e sempre mostrando interesse em ajudar da melhor forma possível. Aos alunos de graduação, Matheus Fellipe Labigalini Santos, Gabriel Konipaski e Juan Lucca de Siqueira Reis, por me auxiliarem em tudo que precisei para executar este trabalho. Vocês foram de fundamental importância para a conclusão dessa dissertação.

A amiga querida, Carla Ishihara Casagrande, por todo apoio prestado, incentivo, e cuidados quando se fizeram necessários.

Ao Cnpq pela concessão de bolsa durante os dois anos de curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E NOMENCLATURA

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Biocombustíveis	4
3.2. Biodiesel	5
3.2.1. Produção de biodiesel	7
3.2.2. Qualidade do biodiesel	9
3.3. Processo oxidativo	10
3.3.1. Oxidação e estabilidade oxidativa do biodiesel	12
3.3.1.1. Método Rancimat	13
3.4. Antioxidantes	13
3.4.1. Antioxidantes sintéticos	14
3.4.2. Antioxidantes naturais	15
3.5. Erva mate	16
3.5.1. Aspectos químicos	19
3.6. Métodos de extração de antioxidantes	20
3.6.1. Maceração	22
3.6.2. Soxhlet	22
3.6.3. Ultrassom	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Reagentes	27

4.2.	Obtenção e preparo da matéria prima	27
4.3.	Caracterização da matéria prima.....	27
4.3.1.	Determinação do diâmetro médio das partículas	27
4.3.2.	Determinação da umidade	28
4.4.	Obtenção dos extratos	29
4.4.1.	Extração convencional - Maceração	29
4.4.2.	Extração convencional - Soxhlet	30
4.4.3.	Extração não convencional – Extração assistida por ultrassom (EAU) – Planejamento experimental.....	31
4.5.	Caracterização dos extratos	33
4.5.1.	Determinação do teor de flavonoides totais (TFLT)	33
4.5.2.	Determinação do teor de fenólicos totais (TFET)	33
4.5.3.	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH	34
4.5.4.	Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP	34
4.5.5.	Determinação da clorofila.....	35
4.6.	Cromatografia em coluna	35
4.7.	Síntese do biodiesel	36
4.8.	Caracterização do biodiesel	39
4.8.1.	Aspecto	39
4.8.2.	Índice de acidez	39
4.8.3.	Teor de éster	39
4.9.	Teste de Rancimat de estabilidade oxidativa do biodiesel	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1.	Caracterização da matéria prima.....	41
5.1.1.	Determinação da umidade	41
5.1.2.	Granulometria	41
5.2.	Rendimento de extração.....	42
5.2.1.	Otimização das condições de operação da extração assistida por ultrassom.....	44
5.3.	Quantificação dos teores de flavonoides e fenólicos totais nos extratos de erva mate	49

5.4.	Determinação da atividade antioxidante pelos métodos de FRAP e DPPH.....	55
5.5.	Otimização da extração assistida por ultrassom.....	59
5.6.	Comparação dos teores de antioxidantes da erva mate com outros trabalhos.....	61
5.7.	Teste de clarificação do extrato por cromatografia em coluna.....	62
	5.7.1. Clorofila	65
	5.7.2. Fenólicos totais, DPPH e FRAP	66
5.8.	Caracterização do biodiesel.....	68
	5.8.1. Aspecto.....	68
	5.8.2. Determinação de Índice de acidez.....	68
	5.8.3. Teor de éster.....	68
5.9.	Teste Rancimat.....	69
6.0.	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	APÊNDICES.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Reação de transesterificação de triglicerídeos	8
Figura 3.2. Mecanismo básico da reação de transesterificação	9
Figura 3.3. mecanismo de oxidação lipídica.....	11
Figura 3.4. Esquema do funcionamento do Rancimat.....	13
Figura 3.5. Antioxidantes sintéticos de uso comercial	15
Figura 3.6. Área de ocorrência natural da Erva Mate <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil. no Brasil	16
Figura 3.7. Distribuição de erva mate plantada no Brasil	17
Figura 3.8. Esquema Equipamento Soxhlet convencional	24
Figura 3.9. Representação do processo de extração pelo fenômeno de cavitação: colapso da bolha de cavitação e liberação do conteúdo vegetal	25
Figura 4.1. Extração assistida por ultrassom.....	31
Figura 4.2. Coluna cromatográfica adaptada.....	36
Figura 4.3. Produção de Biodiesel.....	37
Figura 4.4. Formação de duas fases, a superior contendo biodiesel e a inferior contendo glicerol	38
Figura 4.5. Biodiesel produzido	38
Figura 5.1. Cinética da extração assistida por ultrassom da erva-mate usando etanol como solvente	44
Figura 5.2. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o rendimento da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente	46
Figura 5.3. Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis potência, temperatura e razão no rendimento da EAU ($\alpha = 0,05$)	48
Figura 5.4. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de flavonoides totais (TFLT) da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente	52
Figura 5.5. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de fenólicos totais (TFET) da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente	52
Figura 5.6. Gráfico de Pareto de efeito para a potência, temperatura e RSE no teor de (a) flavonoides totais (TFLT) e (b) fenólicos totais (TFET), da EAU ($\alpha = 0,05$)	53

Figura 5.7. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de FRAP da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente ..	57
Figura 5.8. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de DPPH da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente ..	58
Figura 5.9. Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis potência, temperatura e razão no teor de (a) FRAP e (b) DPPH, da EAU ($\alpha = 0,05$)	58
Figura 5.10. Função <i>desirability</i> do planejamento experimental Box-Behnken para a EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente	61
Figura 5.11. Arraste da clorofila na coluna cromatográfica com extrato de erva mate	63
Figura 5.12. Estrutura molecular clorofila	64
Figura 5.13. Ilustração exemplar da estrutura molecular do antioxidante p-fenilenodiamina	65
Figura 5.14. Ilustração dos tubos de ensaios coletados pós cromatografia em coluna.....	66
Figura 5.15. Concentração de clorofila “a”, “b” e fenólicos totais (TFET) por ensaio pós cromatografia do extrato de erva-mate pós ultrassom	67

FIGURAS DO APÊNDICE

Figura A-1. Gráfico dos resíduos vs valores preditos do rendimento no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$)	85
Figura A-2. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do rendimento no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$)	85
Figura A-3. Gráfico dos resíduos vs valores preditos do teor de (a) flavonoides totais (TFLT) e (b) fenólicos totais (TFET), no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$)	86
Figura A-4. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de (a) flavonoides totais (TFLT) e (b) fenólicos totais (TFET), no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$)	86
Figura A-5. Gráfico dos resíduos vs valores preditos do teor de (a) FRAP e (b) DPPH, no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$)	87
Figura A-6. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de (a) FRAP e (b) DPPH, no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$)	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Valores experimentais das variáveis independentes utilizadas no planejamento Box-Behnken	32
Tabela 5.1. Análise granulométrica das folhas secas de erva-mate	41
Tabela 5.2. Condições usadas e rendimentos obtidos nas extrações com solventes orgânicos. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de significância de 5%	42
Tabela 5.3. Matriz do planejamento experimental Box-Behnken para a resposta rendimento, da extração assistida por ultrassom da erva-mate, utilizando etanol como solvente	45
Tabela 5.4. Análise de variância para predição do rendimento da extração assistida por ultrassom ($\alpha = 0,05$). ($R^2 = 0,968$; $R^2_{ajustado} = 0,912$)	48
Tabela 5.5. Teor de flavonoides totais (TFLT) e de fenólicos totais (TFET) dos extratos da erva-mate obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de significância de 5%.....	50
Tabela 5.6. Matriz do planejamento experimental Box-Behnken para as respostas TFLT e TFET, da extração assistida por ultrassom da erva-mate, utilizando etanol como solvente	51
Tabela 5.7. Análise de variância para predição do teor de flavonoides totais (TFLT) e fenólicos totais (TFET) da extração assistida por ultrassom ($\alpha=0,05$)	54
Tabela 5.8. Teor de FRAP e DPPH dos extratos da erva-mate obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de significância de 5%	55
Tabela 5.9. Matriz do planejamento experimental Box-Behnken para as respostas FRAP e DPPH, da extração assistida por ultrassom da erva-mate, utilizando etanol como solvente	56
Tabela 5.10. Análise de variância para predição do teor de FRAP e DPPH da extração assistida por ultrassom ($\alpha = 0,05$)	59
Tabela 5.11. Comparação de teores de Flavonoides, fenólicos, FRAP e DPPH da erva-mate com outros trabalhos.....	62

Tabela 5.12. Concentração de clorofila das amostras controle e após a cromatografia	65
Tabela 5.13. Atividade antioxidante dos extratos com maior concentração de fenólicos totais para os métodos de DPPH e FRAP.....	67
Tabela 5.14. Teste de estabilidade oxidativa.....	69

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E NOMENCLATURA

ASTM	American Society Of Testing And Materials
β_i	Coeficiente linear
β_{ii}	Coeficiente quadrático
β_{ijj}	Coeficiente de interação de modelo
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
C7H16	Heptano
CEN	Comitê Europeu De Normalização
CH3OH	Metanol
$d\bar{i}$	Diâmetro médio das partículas que passaram pela peneira i (mm)
$d\bar{s}$	diâmetro médio superficial dos fragmentos (mm)
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
FRAP	Método antioxidante redutor de ferro
KOH	Hidróxido de potássio
M	Massa de solvente (g)
$m_{Amostra}$	Massa seca das folhas de erva mate (g)
$m_{Extrato}$	Massa de extrato obtida após o processo de extração (g)
m_i	Massa de amostra retida na peneira i (g)
m_t	Massa total de amostra (g)
N	Número total de frações
P	Potência ultrassônica efetiva (W)
P (%)	Porcentagem da potência ultrassônica (%)
PG	Propil galato
ppm	Partes por milhão
R (%)	Rendimento global de extração
R	Razão volume de solvente/massa de folha (mL·g ⁻¹)
RFC	Reagente Folin-Ciocalteu
t	Tempo (s)
T	Temperatura (°C)

TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TFLT	Teor de Flavonoides Totais
TFET	Teor de Compostos Fenólicos Totais
EAU	Extração assistida por ultrassom

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA ERVA MATE (*Illex paraguariensis* St. Hill) PARA USO NA ESTABILIZAÇÃO OXIDATIVA DO BIODIESEL

AUTORA: ALINI RAFAELA NEITZKE PETERS

ORIENTADOR: PROF. DR. SALAH DIN MAHMUD HASAN

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 05 de setembro de 2022. 87 p.

RESUMO

Buscando obter menor impacto ambiental, a utilização do biodiesel se tornou uma saída para substituir o diesel. O biodiesel é um combustível de origem renovável, podendo ser fabricado de diferentes matérias-primas sendo uma delas o óleo de soja. Esse combustível sofre com o processo de oxidação devido a presença de ácidos graxos em sua composição, e visando minimizar esse processo de oxidação faz-se a utilização de antioxidantes. Normalmente utiliza-se antioxidantes sintéticos que apresentam alto custo além de características nocivas para o ambiente. Desse modo, a utilização de antioxidantes naturais se torna um meio viável para a substituição dos sintéticos. Nesse trabalho buscou-se avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel B100 com a utilização do extrato obtido de erva-mate como antioxidante. Para a extração dos antioxidantes da erva mate foram testados os métodos de maceração, Soxhlet e ultrassom. No método de extração assistida por ultrassom buscou-se otimizar o processo variando os parâmetros potência (%), temperatura (°C) e razão de solvente/erva ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$). Foram determinados os teores de flavonoides e fenólicos totais das amostras, bem como, a sua capacidade antioxidante utilizando os métodos de 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e pelo método de antioxidante redutor de ferro (FRAP). Os valores no ponto ótimo de extração assistida por ultrassom foram: Rend=19,93%, flavonoides=70,12 mg EQ $\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$, fenólicos=92,69 mg EAG $\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$, FRAP=1915,8 $\mu\text{mol EFe}^{2+}\cdot\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$ e DPPH=495,82 μmol

$ET_{\text{trolox}} \cdot g_{\text{extrato}}^{-1}$, bem como as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas: $T= 52,75 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $P= 77\%$ e $RSE= 11,25 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. A função desejabilidade global alcançada na otimização foi de 0,8928. O biodiesel produzido em laboratório a partir de óleo de soja comercial foi caracterizado e posteriormente testado quanto a sua estabilidade oxidativa utilizando o método de oxidação acelerada a 110°C em equipamento Rancimat. O biodiesel não atendeu ao limite mínimo estabelecido pela Agência Nacional de Petróleo (ANP), que exige 12h de indução. O extrato testado não apresentou resultados satisfatórios na substituição de antioxidantes sintéticos.

Palavras-chave: energias renováveis, biocombustíveis, óleo de soja, extratos naturais, Rancimat

OPTIMIZATION OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS FROM YERBA MATE (*Illex paraguariensis* St. Hill) FOR USE IN OXIDATIVE STABILIZATION OF BIODIESEL

AUTHOR: ALINI RAFAELA NEITZKE PETERS

SUPERVISOR: PROF. DR. SALAH DIN MAHMUD HASAN

Master Dissertation; Bioenergy Master Graduation Program; State University of West Paraná; Faculdade St., 645; z/c: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on September 5th, 2022. 87 p.

ABSTRACT

Seeking to obtain less environmental impact, the use of biodiesel has become a way to replace diesel. Biodiesel is a renewable fuel and can be manufactured from different raw materials, one of which is soybean oil. This fuel suffers from the oxidation process due to the presence of fatty acids in its composition, and in order to minimize this oxidation process, antioxidants are used. Synthetic antioxidants are usually used, which are expensive and have harmful characteristics for the environment. Thus, the use of natural antioxidants becomes a viable way to replace synthetic ones. In this work, we sought to evaluate the oxidative stability of biodiesel B100 using the extract obtained from yerba mate as an antioxidant. For the extraction of yerba mate antioxidants, maceration, Soxhlet and ultrasound methods were tested. In the ultrasound-assisted extraction method, it was sought to optimize the process by varying the parameters potency (%), temperature (°C) and solvent/herb ratio (mL.g⁻¹). The total flavonoid and phenolic contents of the samples, as well as their antioxidant capacity, were determined using the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the iron-reducing antioxidant (FRAP) methods. The values at the optimal point of ultrasound-assisted extraction were: Rend=19.93%, flavonoids=70.12 mg EQ·g_{extracte}⁻¹, phenolics=92.69 mg EAG·g_{extracte}⁻¹, FRAP=1915.8 μmol EFe²⁺·g_{extracte}⁻¹ and DPPH=495.82 μmol ETrolox·g_{extracte}⁻¹, as well as the operating conditions that lead to the optimal response: T= 52.75°C, P= 77% and RSE= 11.25 mL.g⁻¹.

The global desirability function achieved in the optimization was 0.8928. Biodiesel produced in the laboratory from commercial soybean oil was characterized and subsequently tested for its oxidative stability using the accelerated oxidation method at 110°C in Rancimat equipment. Biodiesel did not meet the minimum limit established by the National Petroleum Agency (ANP), which requires 12 hours of induction. The tested extract did not show satisfactory results in the replacement of synthetic antioxidants.

Keywords: renewable energies, biofuels, soybean oil, natural extracts, Rancimat

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), classifica-se o biodiesel como “um combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil”. O biodiesel apresenta uma estrutura química próxima ao do diesel, de modo a não se ter a necessidade de realizar grandes mudanças no atual sistema de motores, possibilitando sua utilização pura ou misturado com o diesel. No Brasil, se tem a obrigatoriedade desde 2008 de haver uma mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel. Atualmente a mistura obrigatoriedade de 13% em volume segundo a ANP.

A utilização do biodiesel produzido por meio de biomassa, apresenta vantagens no âmbito econômico pois apresenta menor custo para a sua fabricação, e no âmbito ambiental ele apresenta menor emissão de gases poluentes que agridem o meio ambiente. Entretanto a sua utilização apresenta problemas, pois o biodiesel tem em sua composição ácidos graxos e gorduras insaturadas que podem sofrer oxidação, resultando na degradação do mesmo. Além disso, o biodiesel pode apresentar a auto-oxidação, sendo a degradação mais comum desse tipo de produto.

A auto-oxidação no biodiesel é responsável por produzir produtos voláteis, como aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e álcoois. Esse fenômeno também causa a resinificação do biodiesel, promovendo o aumento do fator corrosivo, diminuindo a sua vida útil e ocasionando uma redução no desempenho de produção energética com a sua queima. Esse processo ocorre devido a adição de oxigênio aos ácidos graxos insaturados presentes no biodiesel, podendo ser um processo auto catalítico, não sendo possível realizar a neutralização total desse fenômeno. Entretanto pode-se fazer o uso de compostos naturais ou sintéticos que são capazes de reduzir esse processo, inibindo a formação dos radicais livres que são responsáveis por desencadear essa reação de oxidação. As substâncias usadas nesse processo são os antioxidantes, sendo definidos como compostos que apresentam a capacidade de inibir ou retardar a formação de radicais livres retardando os efeitos oxidativos.

Os antioxidantes podem apresentar ácidos fenólicos, polifenóis e flavonoides. Destacando-se os antioxidantes polifenóis que são substâncias sintéticas, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e o propil galato (PG) (GARCÍA *et. al.*, 2017). Com exceção desses, os compostos sintéticos apresentando uma grande capacidade antioxidante, também são compostos que apresentam um alto nível de toxicidade e características poluentes, desse modo se tem o interesse de buscar alternativas de compostos naturais com caráter renovável e menos poluente (KEBEDE & ADMASSU, 2019). Assim, há os antioxidantes naturais que podem ser obtidos em plantas, sementes, folhas, raízes e cascas. Os extratos derivados dessas plantas apresentam compostos flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas e minerais que possuem características antioxidantes.

A *Ilex paraguariensis* (erva mate) é uma espécie nativa da América do Sul que pertence à família Aquifoliaceae. Suas folhas são utilizadas para fazer bebidas como chimarrão, tererê, mate solúvel, chá mate, além de preparações farmacêuticas. O estudo da constituição química das folhas de *Ilex paraguariensis* demonstrou a presença de alcaloides, polifenóis, flavonoides, triterpenos e ácidos orgânicos. Além de altos teores de cafeína, teobromina e taninos. As metilxantinas, cafeína, teobromina e teofilina são os compostos mais conhecidos desta espécie, responsáveis pela ação estimulante atribuída à erva mate (NAKAMURA, 2008).

Dentre os métodos de extração de antioxidantes têm-se a extração assistida por ultrassom (EAU). A EAU ao ser empregada na extração de compostos antioxidantes pode sofrer variações em seu rendimento e na capacidade antioxidante do extrato, essas variações podem ocorrer dependendo do tempo de operação, a intensidade das ondas aplicadas (potência), da temperatura e da razão do volume de solvente/massa de folha utilizada. A potência e temperatura interferem diretamente na extração, pois podem favorecer ou não o choque entre as partículas. Esses choques entre as partículas favorecem a remoção das substâncias de interesse das folhas gerando assim uma maior atividade antioxidante dos extratos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes métodos de extração de antioxidantes naturais de amostras de erva mate (*Illex paraguariensis* St. Hill) para utilização como antioxidante no biodiesel visando a melhoria na sua estabilidade oxidativa.

2.2. Objetivos específicos

- Testar diferentes métodos de extração de antioxidantes naturais da erva-mate comercial, incluindo os métodos de ultrassom, soxhlet e maceração
- Caracterizar o potencial antioxidante dos extratos obtidos
- Otimizar os parâmetros de processo de extração assistida por ultrassom por meio de planejamento experimental
- Clarificar o extrato obtido de erva-mate para remoção de clorofila por meio de cromatografia em coluna
- Sintetizar e caracterizar o biodiesel em laboratório
- Avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel por meio de teste Rancimat utilizando os extratos antioxidantes obtidos

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biocombustíveis

Os combustíveis fósseis são, atualmente, responsáveis pela maior quantidade de energia gerada no mundo e ao mesmo tempo, são fontes limitadas justamente por serem esgotáveis, logo, há um grande interesse em se encontrar fontes alternativas de energia (FERRARI *et al.*, 2005; KIEFER *et al.*, 2019). Uma dessas alternativas, capaz de auxiliar no desenvolvimento sustentável, contribuindo tanto no âmbito econômico, social e ambiental, é a utilização da energia gerada a partir de biomassa (LÔBO *et al.*, 2009).

Anterior ao uso do petróleo nos motores do ciclo diesel, óleos vegetais como combustíveis já haviam sido utilizados nestes motores e, devido a questões técnicas e principalmente econômicas por conta dos custos mais baixos, optou-se em não fazer mais o uso dos mesmos, mantendo assim, a utilização do tradicional diesel de petróleo até os dias atuais (RINALDI *et al.*, 2003).

Podemos citar três como sendo os principais fatores para que os governos estejam estimulando o uso de biocombustíveis para substituir os combustíveis fósseis: as reservas de combustíveis fósseis pelo mundo todo estão se esgotando, os impactos ambientais causados são elevados e os aumentos rotineiros de preços abalam o setor econômico (MOTA *et al.*, 2009).

Uma vez que as principais fontes de energia utilizadas atualmente ainda são provenientes de fontes não renováveis, como petróleo, gás natural e carvão vegetal, se fazem de extrema importância os estudos e aprimoramentos da utilização de fontes de energia renováveis (KOH & GHAZI, 2011; SUVEGES & SILVA, 2014;) tanto pelo fato de essas fontes um dia se esgotarem quanto pelo fato de serem altamente poluentes (SILVA & FREITRAS, 2008).

A síntese de biocombustíveis pode ser realizada utilizando-se as mais variadas fontes de matérias-primas não fósseis, por meio de processos de transformação e fermentação, onde podemos classifica-las em duas categoriais: etanol e biodiesel (MOTA *et al.*, 2009). Países com políticas frágeis e relativamente instáveis possuem um grande risco geopolítico por conta da sua

dependência pelo uso e comercialização do petróleo, e isso, faz com que o uso dos biocombustíveis seja ainda mais visado pelos mesmos (MOTA *et al.*, 2009). Ainda existe uma competição entre a produção de matéria prima para a síntese de biocombustíveis e a produção de alimentos (SILVA & FREITRAS, 2008).

3.2. Biodiesel

A Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM) define o biodiesel como sendo um biocombustível formado por gorduras animais ou óleo vegetais, onde na sua composição estão presentes ésteres de cadeias longas de ácidos graxos (GHESTI, 2009) e o mesmo pode ser utilizado como substituto do óleo diesel (SILVA & FREITRAS, 2008). O nome do combustível formado pela mistura de um biodiesel e outro óleo derivado do petróleo é dado de acordo com a porcentagem que o mesmo recebe de biodiesel, por exemplo, B20 quando possui 20 % de biodiesel em sua formação, sendo que é possível chegar até B100, que seria o biodiesel puro (SILVA & FREITRAS, 2008).

A produção de biodiesel por ser realizada utilizando como matéria prima óleos vegetais, tanto novos quanto residuais, gorduras animais e ainda, resquícios agroindustriais (EMBRAPA, 2006) sendo que pode ser utilizado o biodiesel puro como biocombustível ou ainda, em proporções distintas misturado com óleos derivados do petróleo (SILVA & FREITRAS, 2008).

O biodiesel é considerado o biocombustível de maior capacidade de expansão de produção para atender à demanda no mercado mundial, aumentando a utilização de fontes renováveis, com menor emissão de gases de efeito estufa e contribuindo com a mitigação deste efeito por meio do sequestro de carbono (MOTA *et al.*, 2009). Deve-se levar em consideração, para calcular a eficiência energética do uso do biodiesel, a taxa de óleos presentes nos grãos que foram utilizados e o gasto energético durante a sua produção (SILVA & FREITRAS, 2008).

Em comparação aos combustíveis fósseis, o biodiesel apresenta como vantagens ser proveniente de fontes renováveis, emitir uma baixa quantidade de gases poluentes (CORRÊA & ARBILLA, 2006; RAMOS *et al.*, 2003; SILVA & FREITRAS, 2008), permanecer por menor tempo no solo (SILVA & FREITRAS, 2008). e ainda, não exige que os motores a diesel sofram modificações

consideráveis para que possam funcionar a base de biodiesel (RAMOS *et al.*, 2003). Outra vantagem do biodiesel é sua capacidade de ser transportado e estocado a longas distâncias, inclusive via mar, situação que não pode ocorrer com, por exemplo, a energia elétrica (EMBRAPA, 2006). Por mais que o uso do biodiesel venha apresentando diversas vantagens em relação ao uso dos combustíveis fósseis, ainda se faz necessário estudos que avaliem a cadeia produtiva em seus mais variados elos (SILVA & FREITRAS, 2008).

Em comparação com o etanol, apesar de possuir as mesmas características, o biodiesel possui uma densidade energética superior, e isto contribui para que seu custo de transporte e estocagem seja reduzido (EMBRAPA, 2006). Em relação ao diesel de petróleo, sua capacidade de geração de energia gira em torno de 10 % a menos que este, contudo, no quesito torque e potência, o desempenho de ambos é basicamente igual (LOTERO *et al.*, 2005). Já no quesito eficácia de queima, o biodiesel se sobressai ao óleo diesel, isso por conta de sua menor viscosidade, a qual ainda diminui a sedimentação de partículas nas partes internas do motor (LEUNG *et al.*, 2006).

Outra questão a ser levada em consideração, diz respeito as substâncias tóxicas ao organismo humano que são emitidas pelos combustíveis de origem fóssil, tais como hidrocarbonetos e monóxido de carbono, o que vem a ser um grande problema em centros urbanos com grandes quantidades de veículos transitando, frente a isto, o biodiesel apresenta uma enorme vantagem pois sua emissão de materiais particulados é extremamente pequena (ABIOVE, 2015). Estima-se que por volta de 200 mortes ao ano são evitadas pelo uso do biodiesel B7 bem como são reduzidas inúmeras internações por comorbidades cardiorrespiratórias atreladas a poluição do ar causada por combustíveis fósseis (ABIOVE, 2015).

Todavia, o uso do biodiesel também apresenta desvantagens em relação a produção de combustíveis a óleo diesel, dentre as quais, duas podem ser destacadas: primeiro, o alto custo em sua produção e segundo, o balanço energético menos favorável (SILVA & FREITRAS, 2008). Todavia, graças as constantes inovações tecnológicas e o melhor gerenciamento de processos produtivos e de ordenamento de mercado, o valor do biodiesel vem diminuindo (EMBRAPA, 2006).

3.2.1. Produção de biodiesel

A produção de biodiesel vem sendo encarada como uma saída frente a problemática apresentada pelo uso de petróleo (SILVA & FREITRAS, 2008). Por ser um país tropical, é possível se cultivar no Brasil uma ampla variedade de plantas ricas em óleos que podem ser utilizadas para a produção de biodiesel. Além das culturas tradicionais como as de soja, mamona, amendoim, girassol e dendê, também estão sendo exploradas culturas novas como nabo-forrageiro, macaúba, pinhão-manso, pequi e diversas outras que variam de acordo com cada região do país e este é justamente o desafio: saber explorar o potencial regional quanto a capacidade de cultivo e produção atrelando as tecnologias já existentes e trazendo benefícios sociais (EMBRAPA, 2006).

As matérias primas que formam o biodiesel são de origem lipídica vegetal ou animal (EMBRAPA, 2006; KIEFER *et al.*, 2019; SILVA & FREITRAS, 2008). Em grande parte das vezes, os óleos extraídos das oleaginosas são utilizados para produzirem o biodiesel e, portanto, essas são consideradas matérias primas renováveis (KIEFER *et al.*, 2019). Dejetos e resíduos provenientes do setor agropecuário e da agroindústria também podem ser utilizados como matéria prima para a produção de biodiesel e outras fontes secundárias de energia (EMBRAPA, 2006).

Os óleos vegetais que são utilizados na síntese do biodiesel, podem ser “puros” ou seja, serem extraídos das plantas e utilizados pela primeira vez diretamente no biodiesel ou ainda, podem ser reutilizados de processos prévios, como é o caso do óleo de cozinha que já foi usado para o preparo de alimentos (SILVA & FREITRAS, 2008). Atualmente, 90 % da produção de óleo vegetal no Brasil destinado a síntese de biocombustíveis é proveniente da soja enquanto a mamona apresenta maior resistência a seca e o girassol é o com maior rendimento em teor de óleo (EMBRAPA, 2006).

Existem três processos com os quais pode se obter biodiesel sendo eles o craqueamento, a esterificação e a transesterificação, sendo que o subproduto gerado é a glicerina (SILVA & FREITAS, 2008). O craqueamento consiste na formação de uma mistura de compostos químicos, obtidos pela quebra catalítica ou térmica de moléculas (EMPRAPA, 2006); a esterificação é processo que utiliza álcoois, ácidos graxos livres ou seus derivados para a produção de

biodiesel (EMBRAPA, 2006); já a transesterificação é o método incentivado pelo governo brasileiro para que seja obtido o biodiesel (BRASIL, 2005).

A produção de biodiesel utiliza como principal método a reação de transesterificação, conforme as Figura 3.1 e 3.2 (KNOTH *et al.*, 2005). Nesse processo para obtenção de biodiesel, são utilizados triglicerídeos (onde os ácidos graxos em conjunto com o glicerol resultam na formação de ésteres), e álcoois (metanol ou etanol) (BRASIL, 2005; EMBRAPA, 2006; LÔBO *et al.*, 2009), juntamente com um catalisador que pode ser um ácido, base ou de origem enzimática, que como resultado, geram a ‘substituição do grupo éster do glicerol pelo grupo do etanol ou metanol’ (BRASIL, 2005; EMBRAPA, 2006).

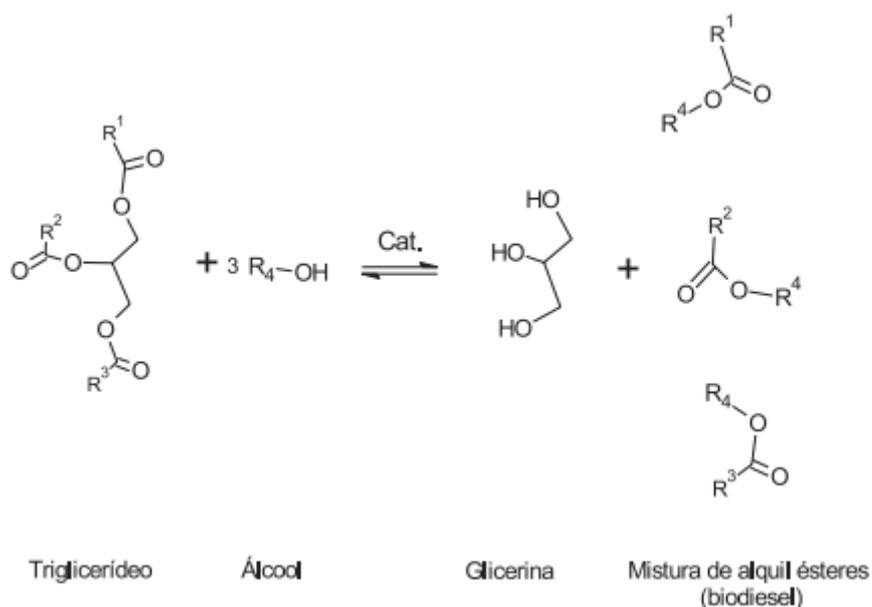


Figura 3.1. Reação de transesterificação de triglicerídeos.
Fonte: LÔBO *et al.*, 2009

No Brasil, a opção mais vantajosa de fonte alcoólica para utilização no processo de transesterificação, é o etanol, pois o mesmo além de ser produzido em grande escala possui custos menos elevados (EMBRAPA, 2006). As desvantagens de se utilizar metanol nesse processo consistem no fato de ele ter que ser importado ou produzido com gás natural e ainda por ser altamente tóxico (EMBRAPA, 2006).

A reação causada pelo processo de transesterificação, representada nas Figuras 3.1 e 3.2, gera como subproduto a glicerina, a qual pode ser purificada

e comercializada, resultando assim, em um aumento significativo de receita e eficiência no processo (BRASIL, 2005; EMBRAPA, 2006).

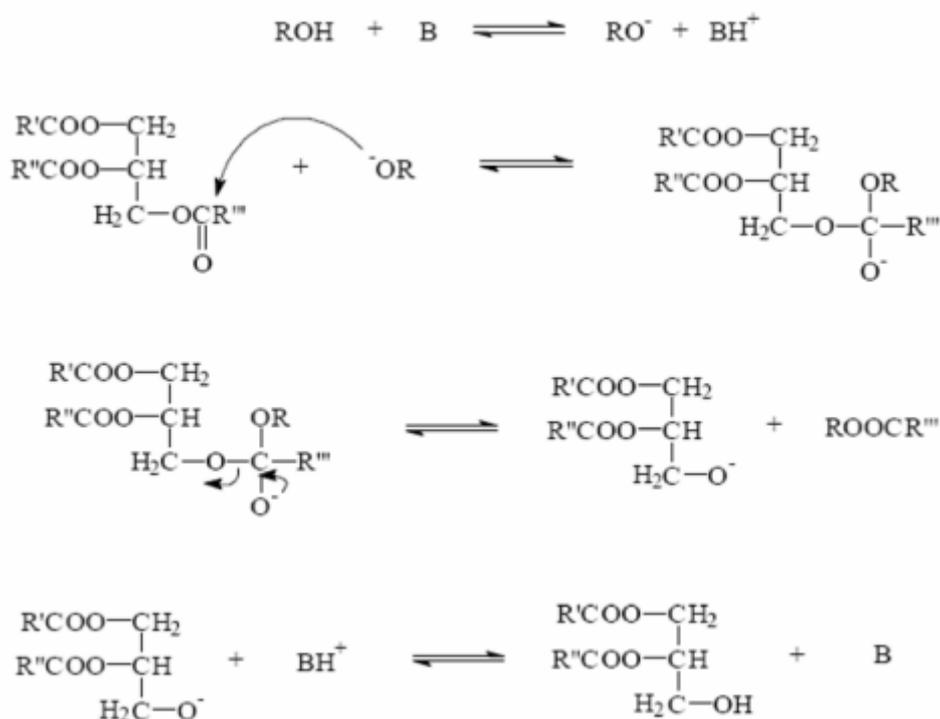


Figura 3.2. Mecanismo básico da reação de transesterificação.
 Fonte: Schuchardt *et al.*, 1998.

Antes de ocorrer a reação de transesterificação, é de suma importância que alguns compostos, como a água, ceras, os ácidos graxos livres e fosfolípidios, sejam retirados do óleo, por serem danosos ao processo (GHESTI, 2009).

3.2.2. Qualidade do biodiesel

Padrões de qualidade do biodiesel são estabelecidos a fim de se garantir que os teores de contaminantes sejam fixados para que estes não interfiram de maneira negativa no desempenho do combustível bem como do motor, garantindo ainda, que não haja riscos com sua integridade durante o manuseio, estocagem e transporte (LÔBO *et al.*, 2009). O primeiro país a estabelecer padrões de qualidade para o biodiesel foi a Áustria e a partir de então outros

países também foram definindo seus padrões (BONDI-OLI *et al.*, 2005). Os padrões de qualidade mais utilizados atualmente são os estabelecidos pela *American Society of Testing and Materials* (ASTM) e pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN) da União Europeia, por meio das normas ASTM D6751 e EM 14214 respectivamente (KNOTHE, 2005).

Oscilações nos padrões de qualidade podem ser observados basicamente por conta de dois fatores, sendo o primeiro, a variação das estruturas moleculares dos ésteres que formam o biodiesel, os quais podem ter cadeias de tamanhos diferentes, suas insaturações podem apresentar posições e quantidades também diferentes e ainda, podem haver grupamentos nas cadeias, e o segundo, devido a existência de contaminantes, como fósforo, cálcio, enxofre, magnésio, sabões, álcool residual e glicerina livre, os quais podem ser provenientes da matéria prima, da produção ou mesmo que foram gerados na estocagem, (LÔBO *et al.*, 2009). Água, ácidos carboxílicos de baixa massa molecular e peróxidos podem estar presentes no biodiesel devido ao armazenamento inadequado, que contribui para que haja uma maior absorção de umidade e estímulo a degradação oxidativa (LÔBO *et al.*, 2009).

Os métodos para avaliar a qualidade do biodiesel podem ser divididos pensando nos contaminantes provenientes da matéria prima, no processo produtivo, na estocagem e nas estruturas moleculares do biodiesel (LÔBO *et al.*, 2009).

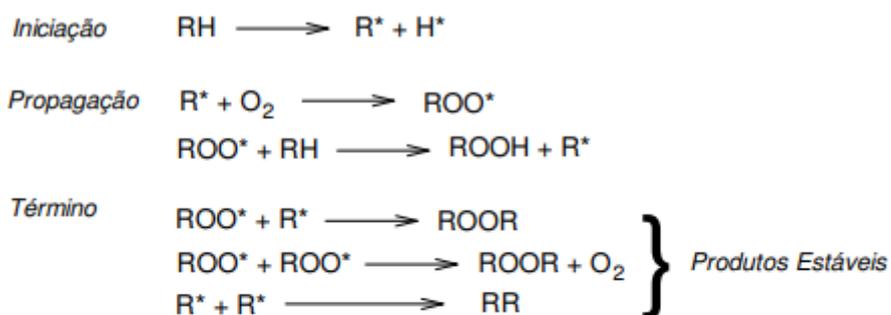
3.3. Processo oxidativo

O processo oxidativo ocorre em associação com a reação entre o oxigênio e os ácidos graxos insaturados (JADHAV, 1996), os quais, devido a presença de duplas ligações, são os principais substratos para que ele ocorra (HAMILTON, 1994). Os ácidos graxos são oxidados com maior velocidade dependendo do grau de insaturação e ainda, com maior facilidade quando estão livres (HAMILTON, 1994). Pelo fato de a formação de radicais livres ser uma reação desfavorável energeticamente, a oxidação não se dá de forma espontânea em ácidos graxos saturados, diferentemente do que ocorre em cadeias insaturadas: as ligações duplas favorecem a oxidação por requisitarem menos energia para quebrar as ligações entre carbono e hidrogênio (C-H) nas posições alílicas e bis-

alílicas (CALIXTO, 2011). A rancidez oxidativa enzimática ocorre nos vegetais devido a presença natural de enzimas lipoxigenases (GÁMEZ-MEZA, 1999).

Podemos reduzir o resultado negativo do processo oxidativo dos lipídios simplesmente com armazenamento, acondicionamento e refrigeração adequados, todavia, não se pode suspender completamente a reação, uma vez que a auto oxidação continua ocorrendo pelo fato de necessitar de energia de ativação reduzida (HAMILTON, 1994). A reação de oxidação ocorre em etapas que consistem em iniciação, propagação e término (JADHAV, 1996).

A formação de radicais livres já ocorre na primeira etapa, onde a incidência luminosa e o calor contribuem para que a molécula de ácido graxo perca um hidrogênio do seu carbono alílico. Os radicais livres são passíveis de sofrerem alterações por conta da presença do oxigênio atmosférico e na segunda etapa, são então convertidos em peróxidos e hidroperóxidos, que são igualmente radicais, porém, produtos primários da oxidação lipídica. A reação então é propagada por meio destes radicais formados, o que gera um processo de autocatalização. E por fim, na última etapa, há formação dos produtos secundários de oxidação, os chamados epóxidos, os quais são estáveis, voláteis e não-voláteis, que se obteve por meio de cisão e rearranjo dos peróxidos. As etapas da oxidação lipídica podem ser observadas na Figura 3.3 (JADHAV, 1996).



Em que:

RH - Ácido graxo insaturado

R* - Radical livre

ROO* - Radical peróxido

ROOH - Hidroperóxido

Figura 3.3. mecanismo de oxidação lipídica.

3.3.1. Oxidação e estabilidade oxidativa do biodiesel

O processo oxidativo que ocorre nas cadeias dos ácidos graxos insaturados presentes nas matérias-primas do biodiesel é complexo e formado por inúmeros mecanismos de ação (ATADAHI *et al.*, 2010). Estas cadeias de ácidos graxos insaturados presentes nas matérias-primas do biodiesel, são mais propensas a passarem pelo processo oxidativo e também de serem polimerizadas, fato que se deve ao maior número de duplas ligações presentes e consequente reatividade maior, resultando assim em uma probabilidade muito mais elevada de reação com o oxigênio presente na atmosfera (SUVEGES & SILVA, 2014). Usada como referência para se determinar a qualidade de gorduras e óleos, a estabilidade oxidativa depende da qualidade da matéria prima, da sua composição química, do processamento e da estocagem (ANTONIASSI, 2001). A estabilidade oxidativa do biodiesel pode sofrer influência de fatores ambientais como a exposição à luz, o contato com o ar, a variação de temperaturas (ATADASHI *et al.*, 2010; KIEFER *et al.*, 2019), presença de peróxidos e metais e condições de armazenagem (ATADASHI *et al.*, 2010).

O biodiesel, em comparação aos combustíveis fósseis, apresenta uma maior taxa oxidativa, o que vem a ser uma grande desvantagem pois compromete a eficiência do biocombustível no motor (SUVEGES & SILVA, 2014), e por consequência, leva os produtores desse biocombustível a terem uma grande preocupação (OLIVEIRA, 2012). O baixo desempenho do biodiesel e o comprometimento dos motores, causados pela sua oxidação, são gerados por conta da elevada acidez e viscosidade do material e pelo acúmulo de resíduos no sistema injetor (SUVEGES & SILVA, 2014). Em outras palavras, a oxidação do biodiesel causa aumento em sua viscosidade, gerando assim, depósito de sedimentos no sistema de injeção e na câmara de combustão, consequentemente levando a um desempenho menos eficaz do motor (JAIN & SHARMA, 2010).

Estudos envolvendo a estabilidade oxidativa do biodiesel se fazem necessários a fim de se prolongar a vida útil deste biocombustível bem como aumentar o desempenho do mesmo e do motor (JAIN & SHARMA, 2010).

3.3.1.1. Método rancimat

O método rancimat consiste em avaliar a formação de compostos voláteis, por meio da medição da elevação da condutividade elétrica (HILL, 1994). Foi desenvolvido por Hardon & Zurcher em 1974, os quais denominaram o equipamento utilizado de Rancimat 617 (Brinkmann Instruments, Inc.) sendo que hoje em dia, é utilizado com maior frequência o modelo Rancimat 679 (Metrohm-Herisau, Switzerland) (ANTONIASSI, 2001). O equipamento Rancimat (Figura 3.4) funciona de modo a permitir a passagem de fluxo de ar pelo óleo aquecido e mantido sob temperatura em torno de 100 a 140°C, com posterior fervura da água deionizada, a qual arrasta os ácidos carboxílicos voláteis provenientes da oxidação, e então se solubilizam, gerando por fim, elevação na condutividade elétrica da água (ANTONIASSI, 2001).

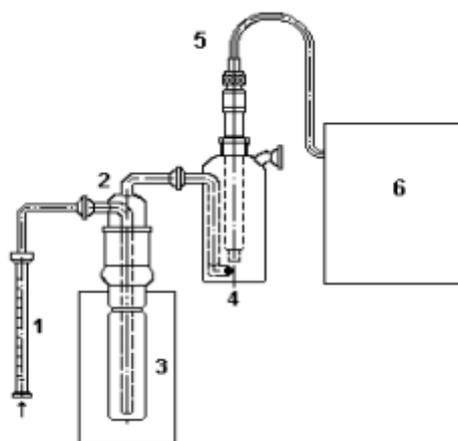


Figura 3.4. Esquema do funcionamento do Rancimat. (1 = rotâmetro; 2 = vaso de reação; 3 = bloco de aquecimento; 4 = vaso de recepção dos voláteis; 5 = eletrodo de platina; 6 = amplificador do sinal de condutividade elétrica.) Fonte: Laubli & Bruttel (1986)

3.4. Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que tem como função natural retardar o processo rancidez e a deterioração dos alimentos em que são presentes (CANTERLE, 2005) sendo assim, moléculas com capacidade de prevenir e

reduzir o dano oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Sua atividade não se restringe aos compostos lipídicos, agindo também sobre as proteínas e o próprio DNA, definindo-se portanto, de forma mais abrangente, como sendo substâncias que, quando em baixas concentrações (+- 0,01%) em meios propícios a sofrerem oxidação, previnem ou retardam o processo oxidativo (HALLIWELL, 1996). Contudo, o processo oxidativo não pode ser revertido pelos antioxidantes bem como a rancidez não pode ser prevenida (CANTERLE, 2005).

Os antioxidantes são classificados em dois grupos: primários e secundários. Os primários atuam rompendo a cadeia de radicais, de forma a ceder um hidrogênio ao radical lipídico livre e dessa forma, tornando-se um radical estável. Já os secundários, fazendo uso de agentes quelantes de metais, possuem a capacidade de reduzir o processo de iniciação da oxidação (GORDON, 1990). Podem ser de origem sintética e natural (MARTINEZ-TOME, 2001). Alguns extratos vegetais possuem uma grande concentração de compostos fenólicos e por isso, podemos chamá-los de antioxidantes naturais (SUVEGES & SILVA, 2014) ou seja, podemos extrair compostos antioxidantes naturais dos mais variados vegetais (RIVE-EVANS, 1996).

Alguns aspectos influenciam diretamente na concentração dos antioxidantes presentes nos vegetais, dentre os quais, podemos citar a variedade da planta, fatores genéticos, influência do meio ambiente e também o grau de maturação (SHAIKI & NACZK, 1995). O tipo de substrato utilizado, o solvente, a técnica de extração e a relação entre tempo e temperatura, são fatores que influenciam na capacidade antioxidante daquele substrato que utilizamos em análises laboratoriais (SHAIKI & NACZK, 1995).

3.4.1. Antioxidantes Sintéticos

A fim de se delongar a vida útil do biodiesel, as indústrias comumente utilizam antioxidantes sintéticos em sua composição (SUVEGES & SILVA, 2014). Com o intuito de se reduzir a reação oxidativa, alguns antioxidantes sintéticos como o Terc-butilhidroquinona (TBHQ), Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-hidroxitolueno (BHT) e Propil Galato (PG), representados na Figura 3.5, são acrescentados, todavia, os mesmos apresentam alta volatilidade e são de fácil

decomposição quando submetidos a altas temperaturas, o que se torna um inconveniente (ANDREO & JORGE, 2006). Esses antioxidantes (TBHQ, BHA, BHT e PG), são os mais utilizados pela indústria (SUVEGES, 2014).

Os efeitos dos antioxidantes sintéticos adicionados ao biodiesel com a finalidade de promover sua estabilidade oxidativa, variam de acordo com sua matéria prima, a qual pode ou não causar alterações na densidade, viscosidade, cinzas sulfatadas, carbono residual e ponto de entupimento do filtro a frio (SUVEGES, 2014).

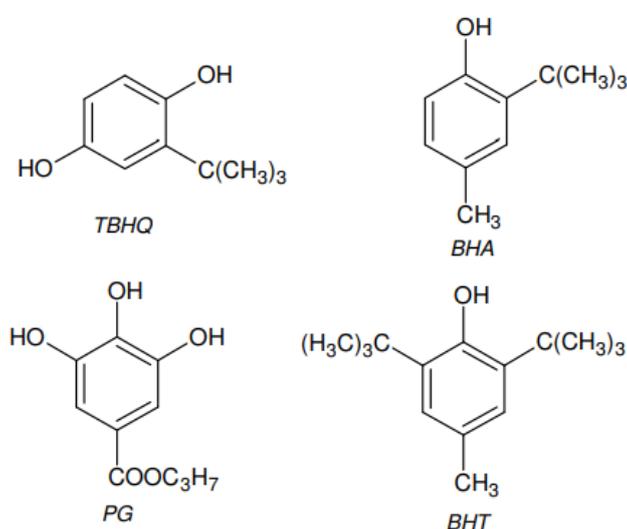


Figura 3.5. Antioxidantes sintéticos de uso comercial. Fonte SUVEGES, 2014.

3.4.2. Antioxidantes Naturais

Como alternativa para o uso dos antioxidantes sintéticos, os estudos têm sido voltados para a adição de compostos antioxidantes naturais, extraídos de matérias primas renováveis, na formulação do biodiesel (SUVEGES & SILVA, 2014). Matérias primas de origem vegetal e animal, fornecem os compostos antioxidantes naturais que podem ser utilizados para os mais variados fins (ANDREO & JORGE, 2006). Os principais responsáveis pela ação antioxidante dos extratos naturais são os compostos fenólicos e vitaminas (SUVEGES, 2014), sendo pertencentes ao grupo de antioxidantes primários (GORDON, 1990). Ácidos fenólicos (como o cafeico, ferúlico, protocatequínico e p-cumárcio),

carotenoides, ácido cítrico, ácido ascórbico, tocoferóis, são os compostos antioxidantes naturais de maior interesse industrial (SUVEGES, 2014).

3.5. Erva mate

A erva mate, *Ilex paraguariensis* St Hill, é originária da América do Sul e ocorre com naturalidade no Paraguai, na Argentina e no Brasil, sendo sua ocorrência neste último, de cerca de 80%, a qual está distribuída principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul (MACCARI E SANTOS, 2000). Na região Sul do Brasil, os produtos naturais provenientes desta erva, possuem papel de destaque no cenário econômico, social e cultural (CENI, 2005). A área de ocorrência natural da erva mate no Brasil pode ser observada pela Figura 3.6.



Figura 3.6. Área de ocorrência natural da Erva Mate *Ilex paraguariensis* St. Hil. no Brasil. Fonte: Sustentável Mata Atlântica: A Exploração De Seus Recursos Florestais. Editora Senac. São Paulo. P. 197, 2002.

No Brasil, a erva é conhecida por diversos nomes populares, como: chá-argentino, chá-do-brasil, chá-dos-jesuítas, chá-das-missões, chá-do-paraguai, chá-do-paraná, chá-mate, carvalho-branco, caúna, congoín, congonha, congonha, congonha, congonha-das-missões, congonha-de-mato-grosso, congonha-genuína, congonha-grande, congonha-mansa, congonha-verdadeira, erva, erva-congonha, ervade-são-bartolomeu, erva-piriquita, erva-mate, erva-mate-peluda, erva-mate-de-talobranco, erva-mate-de-talo-roxo, erva-senhorita, erva-verdadeira, erveira, mate, matedo-paraguai, mate-legítimo, mate-verdadeiro, orelha-de-burro e pau-de-erva (MAZUCHOWSKI, 1989).

A consumação de erva mate é feita, em sua maior parte, por meio de produtos naturais e tradicionais, como o chimarrão (CENI, 2005). Anualmente são produzidas cerca de 650 mil toneladas de folha de erva mate na região sul do Brasil (ESMELINDRO, *et al.*, 2002; MACCARI E SANTOS, 2000), sendo que sua produção se sobressai em 596 municípios sulistas, envolvendo ainda, aproximados 710 mil trabalhadores na atividade ervateira (MACCARI E SANTOS, 2000). A Figura 3.7 demonstra a taxa anual de produção de erva mate no Brasil:

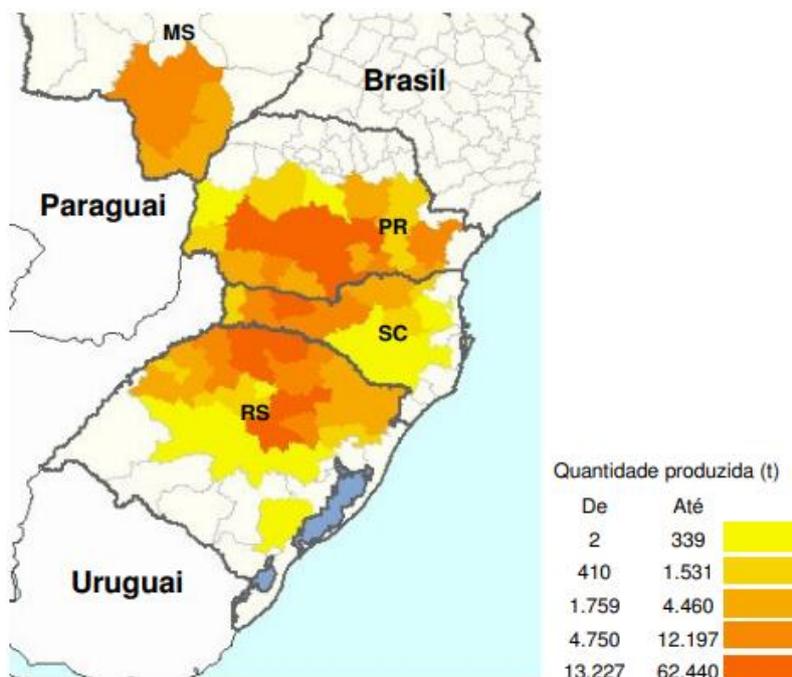


Figura 3.7. Distribuição de erva mate plantada no Brasil. Fonte: IBGE – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA 2002.

A exposição à luminosidade solar age diretamente no crescimento da erva mate, bem como na sua altura, estrutura do caule e das folhas, na razão entre raiz e caule e ainda, no peso de material seco, (KRAMER; KOZLOWSKI, 1979). A safra ocorre do mês de maio a setembro, preferencialmente entre junho e agosto, pois este período antecede a brotação e suas folhas já estão maturadas (MAZUCHOWSKI, 1989). Entre os meses de dezembro e fevereiro ocorre a chamada safrinha, a qual é praticada por parte das indústrias a fim de se reestabelecerem os estoques trabalhando, portanto, com sua capacidade total de produção durante o ano inteiro (ANDRADE, 1999).

Devido a conformação econômica e financeira e ainda ao cenário do mercado em que operam, algumas empresas e produtores optam pela colheita praticada o ano todo, já outros preferem somente durante a safra de safrinha (ANDRADE, 1998) e há aqueles ainda, que encaram a safrinha como um risco para suas plantações e por isso optam em não a praticar (MAZUCHOWSKI, 1989). Para ervais nativos, com a finalidade de manter o rendimento das erva-mates, respeita-se o intervalo mínimo de dois anos entre as colheitas (MAZUCHOWSKI & RUCKER, 1993).

Existe um grande incentivo às empresas, devido a produção excessiva de erva mate, para que as mesmas desenvolvam pesquisas utilizando-a como matéria prima no desenvolvimento de novos produtos e também para a otimização de processos (ESMELINDRO *et al.*, 2002).

Suas flores se comportam de maneira dioica (JOLY *et al.*, 2001), dispostas formando uma inflorescência de no máximo cinco flores em fascículos pequenos, localizadas nas axilas das folhas superiores, possuem coloração branca e tamanho pequeno (ANDRADE, 2004). Conforme a idade da planta, pode-se observar uma diferença na porcentagem de folhas e talos que estão presentes e que são de interesse comercial, sendo que ao atingir nove anos de idade, ela apresenta uma variação de 10 a 35 % das mesmas e aos 12 anos, vai de 36 a 42 % (CAMPOS, 1991). O fruto da erva mate é simples, carnoso e indeiscente (drupa globosa), liso, apresentando coloração verde quando jovem e passando para vermelho-arroxeadado quando maduro, fase na qual os pássaros são atraídos ajudam a disseminar a planta (ANDRADE, 2004). Suas sementes possuem formato variável, sendo pequenas e de tegumento rígido e áspero, fato pelo qual a germinação se torna difícil (ANDRADE, 2004).

3.5.1. Aspectos químicos

De acordo com Veronese (1994), a erva mate é composta por água, glicose, pentose, celulose, dextrina, legumina, albumina, gomas, mucilagem, clorofila, colessterina, teofilina, cafeína, cafearina, cafamarina, ácido carbônico, ácido clorídrico, ácido matetânico, ácido fólico, ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido cafêico, ácido fosfórico, ácido virídico, substâncias graxas, óleo essencial, resina aromática formada por oleína, palmitina e lauro-estearina, cinzas, alumínio, arsênio, ferro, lítio, magnésio, manganês e potássio. Outros estudos identificaram ainda, presentes na erva mate, frutose, sacarose, rafinose, metilxantina, teofilina, teobromina, taninos, cálcio, fósforo e vitaminas A, B1, B2, C e E (NEWELL *et al.*, 1996; VALGUDA, 1995). Campos (1991) identificou ainda, presente na erva mate, ácido isoclorogênico e ácido clorogênico.

As concentrações dos compostos químicos encontrados na *Ilex paraguariensis*, varia de acordo com a maturação da planta, sendo que em folhas e frutos jovens e imaturos são maiores do que as presentes nos mesmos quando velhos e maduros (MAZZAFERA, 1996). Campos (1991) aponta ainda, que a taxa nutricional de cultivares de verão é inferior as de cultivares de inverno, portanto, safras diferentes de erva mate apresentam balanço nutricional diferentes.

O teor de cafeína encontrado na erva mate varia para a sua apresentação *in natura* e em suas infusões, sendo que no primeiro, atinge uma média de 1,6 % e no segundo 1,10 % (VALDUGA, 1995). Esse teor pode ser reduzido de forma significativa durante os processos industriais pelos quais a erva passa até chegar a sua apresentação comercial (ESMELINDRO *et al.*, 2002).

Presente na erva mate, podemos encontrar ainda, saponinas, as quais são glicosídeos formados por uma aglicona e uma outra fração açucarada, possuindo ação emulsificante e detergente (possível graças a redução da tensão superficial) e que por esse motivo, conferem a bebida, o característico sabor amargo e possível formação de espuma (VALDUGA, 1995).

As propriedades químicas da erva mate, como por exemplo o teor de proteínas, gorduras, glicose, sacarose, cinzas, fibras e cafeína, são influenciadas diretamente durante as etapas industriais, sendo que o teor de cinzas e fibras,

nos processos de sapeco, secagem e tempo de cancheamento, não sofrem influência significativa (ESMELINDRO *et al.*, 2002). O mesmo autor salienta ainda que, as etapas do processamento industrial que mais alteram os teores de compostos presentes na erva mate são o sapeco e secagem, logo, conclui-se temperaturas elevadas possuem capacidade de alterar as características físico-químicas da planta. Fica claro, neste ponto, que tanto fatores naturais quanto os processos industriais interferem quantitativamente na composição química da erva mate, além de serem determinantes na qualidade do produto (DONADUZZI *et al.*, 2000; REISMANN, *et al.*, 1999).

Acredita-se que a demanda da erva mate cresça consideravelmente a partir da realização de melhorias nos processos de industrialização, trazendo por consequência maior qualidade do produto (BERTONI, *et al.*, 1992).

3.6. Métodos de extração de antioxidantes

Os compostos antioxidantes naturais, que são substâncias bioativas, podem ser extraídos dos vegetais por diversas formas, sendo as mais comuns as que utilizam solventes orgânicos, como etanol, metanol, éter e água, e também a extração supercrítica, a qual, por meio de alteração de temperatura e pressão, tem a capacidade de transformar o dióxido de carbono em fluido supercrítico (LEAL, 2003).

A luz, o oxigênio e o calor exercem influência sobre os compostos antioxidantes e por isso, devem ser realizadas, previamente, etapas que facilitam o processo de extração e auxiliam na conservação dos mesmos (AZIZAH *et al.*, 1999). Fatores como polaridade do solvente e tempo de extração, também têm capacidade de desnaturar os antioxidantes, por isso, é de suma importância manter um controle desses elementos (ANDREO & JORGE, 2006).

Para otimizar o processo de extração, realizam-se procedimentos capazes de aumentar a superfície de contato do substrato com o solvente, sendo que, para isso, as amostras geralmente submetidas a desidratação, liofilização ou congelamento e ainda, as mesmas são moídas ou peneiradas (GÁMEZ-MEZA, 1999). Em determinados casos, são necessários processos complementares que sejam capazes de remover substâncias indesejáveis e obter-se um extrato com maior grau de purificação (SHAIKI & NACZK, 1995).

O cuidado com o descarte dos resíduos gerados durante os processos de extração utilizando solventes orgânicos não deve ser negligenciado, uma vez que os mesmos podem ser tóxicos e denegrirem o meio ambiente (ANDREO & JORGE, 2006).

As características do solvente utilizado influenciam tanto no rendimento do processo de extração, quanto na atividade antioxidantes (MAZINOVA, 1997). É inexistente um processo de extração que utilize solvente orgânico capaz de isolar todo e qualquer composto antioxidante de forma igualitária e satisfatória, devido a peculiaridade de alguns fatores, como a polaridade do solvente, presença e variedade de compostos bioativos como taninos, ácido fenólico e antocianinas, reação entre os compostos antioxidantes e carboidratos, proteínas e demais substâncias presentes no substrato (SHAIIDI & NACKZ, 1995).

A atividade do solvente depende diretamente dos compostos polifenólicos presentes na amostra a ser estudada (MOURE, 2001). Estudos realizam extrações com solventes de polaridades diferentes a fim de se identificar e isolar os compostos antioxidantes, comparando os resultados obtidos e encontrando dessa forma o melhor solvente para determinado objetivo (ANDREO & JORGE, 2006). A comparação entre os solventes se faz necessária a fim de se encontrar o solvente ótimo para a extração e obtenção da atividade antioxidante máxima para cada substrato, a qual varia de acordo com os compostos polifenólicos (MOURE, 2001). O solvente escolhido determina quais compostos serão extraídos da amostra (SINGH, 2008).

Nas extrações, o etanol é o solvente mais utilizado enquanto a água é escolhida pela questão de abundância (ANDREO & JORGE, 2006).

O tempo de cada método de extração varia em média de um minuto a 24 horas, sendo que extrações por períodos prolongados elevam as chances de os compostos fenólicos sofrerem oxidação, e isso faz com que seja necessário o acréscimo, junto ao solvente, de agentes redutores (SHAIIDI & NACKZ, 1995).

A temperatura é capaz de alterar de diferentes formas os compostos antioxidantes (CONDE *et al.*, 1998), sendo ainda, apontada como a principal responsável pela degradação de polifenóis (MOURE, 2001). Temperaturas amenas são ideais quando os compostos têm grandes chances de ser degradados durante o processo, e neste caso, indica-se o uso de fluido supercrítico, o qual irá preservar a ação antioxidante (IBÁÑEZ, 1999). A

quantidade de fenólicos totais está ligada diretamente com a temperatura, a qual possui uma relação inversamente proporcional (CONDE *et al.*, 1998).

Existe ainda a possibilidade de ocorrerem reações entre os compostos fenólicos e outras substâncias durante a decomposição térmica dos fenóis, proporcionada pelos processos de desidratação e extração, que acabam gerando degradação de enzimas e volatilização de componentes (MOURE, 2001).

3.6.1. Maceração

O método de extração por maceração traduz-se em imergir em um recipiente fechado com o solvente a amostra, inteira ou em pó, deixando-a em repouso sob temperatura ambiente e frequentemente agitando até que haja solubilização do material e quebrando assim as paredes celulares, fazendo com que os compostos fitoquímicos sejam liberados e, portanto, que haja a extração dos compostos de interesse (AZWANIDA, 2015). Ao término da extração, é necessária a filtração do material, para que haja separação da amostra e do solvente (SINGH, 2008).

O processo de maceração pode sofrer influência da área superficial da amostra, da temperatura ambiente, do tempo a ser utilizado para extração, da quantidade de solvente e ainda da agitação realizada (SINGH, 2008). As desvantagens consistem na alta probabilidade de se obter um rendimento baixo; no período prolongado do processo de extração, mesmo havendo agitação; no consumo elevado de solvente, o qual necessita de eliminação ao término do processo; e na alta quantidade de amostra utilizada (JOVANOVIC *et al.*, 2017).

3.6.2. Soxhlet

Uma das formas de se obter um extrato vegetal sólido-líquido, é por meio do extrator Soxhlet, representado na Figura 3.8 (PALLEROS, 1999), o qual foi inicialmente desenvolvido com a finalidade de se extrair lipídios de materiais sólidos, em 1879 por Franz von Soxhlet (LUQUE DE CASTRO & PRIEGO-CAPOTE, 2010). Os estudos atuais utilizam o aparelho Soxhlet como referência para desenvolver e também comparar novas técnicas para extrair compostos

antioxidantes naturais das mais variadas fontes de matéria prima vegetais (AZMIR *et al.*, 2013).

Dentre as vantagens de se utilizar o método Soxhlet, podemos citar o fato de ser um método simples e relativamente barato que não exige treinamento especializado para ser realizado; o solvente é renovado a cada ciclo, se mantendo sempre em contato com a amostra e deslocando o equilíbrio de transferência de massa; pelo fato de o balão de destilação manter a temperatura elevada, a viscosidade e a tensão superficial são baixas comparadas aos métodos que utilizam temperaturas mais brandas; como a amostra fica durante o processo inteiro envolta pelo cartucho, não é necessária a realização da filtração da micela quando o processo se encerra; e alguns estudos comparativos apontam sua capacidade de extrair maior quantidade de óleos que outros métodos (PALSIKOWISKI, 2020).

Como desvantagens, temos o tempo, que pode variar entre uma hora e até 72 horas, tornando o processo demasiadamente longo; utiliza uma quantidade elevada de solvente, o que exige mais uma etapa para que o mesmo seja eliminado, fato que desprende maior energia e ainda, se não descartado de forma adequada, torna-se um problema ambiental; a elevada temperatura de ebulição do solvente pode levar os compostos extraídos a degradarem; e ele não possibilita que haja agitação da amostra/solvente, uma vez que esta seria capaz de acelerar o processo (PALSIKOWISKI, 2020).

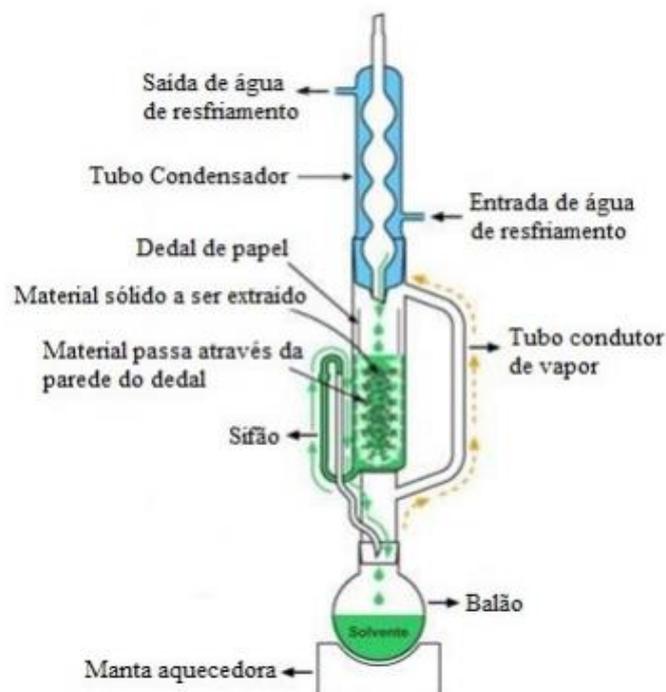


Figura 3.8. Esquema Equipamento Soxhlet convencional. Fonte: COSTA *et al.*, 2016.

3.6.3. Ultrassom

Do inglês, Ultrasound Assisted Extraction (UAE), a extração assistida por ultrassom é um método simples, barato, não convencional, amplamente utilizado para obtenção de compostos antioxidantes naturais provenientes de matéria prima vegetal (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Seu mecanismo funciona por meio de propagação de ondas mecânicas em um meio que pode ser sólido, líquido ou gasoso, resultando no fenômeno de cavitação (BENDICHO *et al.*, 2012).

O mecanismo de cavitação funciona da seguinte maneira: primeiro, ocorre a formação de depressões por onde as microbolhas, geradas a partir dos gases dissolvidos, migram e então iniciam o processo de aumento e diminuição de tamanho, gerando assim, ciclos contínuos até o momento em que estas microbolhas implodem, gerando pressão de até 2000 atm) e a liberação de calor (até 5000 °C); os materiais sólidos presentes na mistura, fazem com que as implosões das microbolhas ocorram de maneira irregular e assimétrica, o que acaba criando jatos que se chocam com outras partículas sólidas e geram maior circulação dos líquidos; são formados então reatores micrométricos que são

capazes de romper ligações e gerar radicais, o que gera agora, microjatos de velocidades altíssimas; por fim, a solubilidade dos analitos é aumentada devido a liberação de calor causado pelas implosões, o que eleva significativamente a capacidade da extração (BENDICHO *et al.*, 2012).

O processo de extração pelo fenômeno de cavitação, apresentado na Figura 3.9 (a), mostra que as microbolhas entram em colapso enquanto ocorre o ciclo de compressão (b), microjatos são criados em direção ao material sólido (b e c), e as paredes celulares são desintegradas devido a alta pressão e temperatura geradas no processo, ocasionando na liberação do conteúdo (d) (CHEMAT, ZILL-E-HUMA & KHAN 2011).

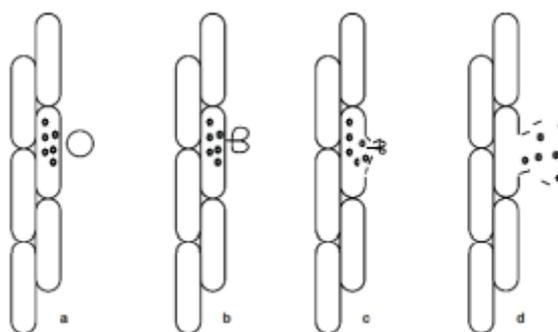


Figura 3.9. Representação do processo de extração pelo fenômeno de cavitação: colapso da bolha de cavitação e liberação do conteúdo vegetal. Fonte: Chemat, Zill-e-Huma & Khan (2011).

Algumas considerações acerca do solvente escolhido para ser utilizado na extração assistida por ultrassom devem ser feitas, sendo elas a solubilidade dos compostos, a viscosidade, a pressão de vapor e a tensão superficial, visto que essas características afetam diretamente no fenômeno de cavitação (CHEMAT *et al.*, 2017).

A principal vantagem desse método é a economia de energia que se dá, devido ao menor tempo de operação e possibilidade de utilização de temperaturas mais brandas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Já as desvantagens giram em torno de não ser possível a reutilização do solvente, ser necessária uma etapa para filtrar a amostra e não se obter extratos livres de solvente, além de que, sua utilização a nível industrial se tornar inviável por conta de as ondas

geradas serem limitadas às proximidades da sonda e as mesmas não serem uniformes (PALSIKOWSKI, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Para obtenção dos extratos secos, utilizou-se três solventes, os quais foram escolhidos levando em consideração sua polaridade, sendo eles o Álcool Etílico 95 % P.A. (Neon), que é considerado polar, o Acetato de Etila 99,5 % (Neon), com polaridade intermediária, e o N-Hexano 98,5% (Synth) que é apolar. Os três foram utilizados em todas os métodos de extração.

Os reagentes utilizados para determinar o teor de flavonoides totais foram: etanol 95 % P.A. (Neon), hidróxido de sódio (Neon), cloreto de alumínio hexahidratado (Neon), nitrito de sódio (F. Maia) e quercetina grau HPLC (Sigma). Para determinar o teor de fenólicos totais foram utilizados: reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica), carbonato de sódio (Anidrol) e ácido gálico (Vetec). A capacidade antioxidante foi determinada utilizando: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Sigma Aldrich), Trolox® (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) (Sigma Aldrich), TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina), (Sigma Aldrich), cloreto férrico anidro (Neon).

4.2. Obtenção e preparo da matéria prima

A presente pesquisa utilizou a erva mate comercializada para consumo em forma de chimarrão, tendo sido adquirida em um mercado da cidade de Toledo/PR. A erva mate já foi obtida em sua forma utilizável e por isso, não necessitou de procedimentos como secagem e trituração, apenas foi passada por uma peneira granulométrica Tyler 12, abertura 1,40 mm e ABNT 14, para retirada de talos e partículas maiores. O material obtido foi armazenado sob refrigeração (5°C).

4.3. Caracterização da matéria prima

4.3.1. Determinação do diâmetro médio das partículas

Um agitador eletromagnético vertical vibratório foi utilizado para determinar o diâmetro médio das partículas da amostra de erva mate, e assim estabelecer o perfil granulométrico da mesma. A série padrão de peneiras Tyler foi utilizada nas aberturas de 16, 28, 35, 48 e 65 Mesh (Bertel, Caieiras, São Paulo, Brasil) e a amostra passou pelo procedimento durante 15 minutos. Cada uma das peneiras reteve uma massa de amostra, a qual foi pesada e o valor encontrado utilizado para o cálculo da média aritmética das aberturas das malhas, como mostram as equações 4.1 e 4.2, segundo Gomide (1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i}{\sum_{i=1}^n \Delta l_i / \bar{d}_i^3}} \quad (4.1)$$

$$\Delta l_i = \frac{m_i}{m_t} \quad (4.2)$$

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

A umidade da erva mate foi determinada utilizando o método gravimétrico, no qual a água é retirada, bem como outras substâncias voláteis, por intermédio de evaporação em estufa de secagem, resultando assim em perda de massa. Em placas de petri, cinco gramas de amostra foram pesados, utilizando uma balança analítica (M214A – BEL ENGINEERING), a qual foi previamente tarada. Após pesagem, em triplicata, a amostra foi acondicionada na estufa a 105°C. Após 120 min, a mesma foi transferida para o dessecador contendo sílica gel, por mais 60 min, para que esta pudesse ser resfriada até atingir a temperatura ambiente e então, novamente pesada e colocada no dessecador. O processo de pesagem e acondicionamento em dessecador foi repetido até que se obteve o

resultado de massa constante na pesagem. Utilizando a diferença obtida na pesagem da amostra antes e após a dessecação, se calculou o teor de umidade do material vegetal, como mostra a equação 4.3.

$$Umidade(\%) = \frac{Mu - Ms}{Ms} \times 100 \quad (4.3)$$

Em que:

Mu: massa da amostra úmida;

Ms: massa da amostra seca.

4.4. Obtenção de extratos

Neste trabalho foram avaliados os métodos de extração convencional por maceração e por Soxhlet e o método de extração não convencional assistido por ultrassom. Todas as extrações foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos da UNIOESTE *campus* Toledo. A determinação de massa de todos os extratos foi obtida pela diferença entre o peso do béquer vazio (previamente pesado) e o peso dele ao final da extração, contendo a massa seca e após completa evaporação do solvente.

A massa seca de cada amostra presente nos béqueres foi retirada com espátula e armazenada em *ependorf* sob refrigeração (5°C). O rendimento das extrações foi calculado a partir da razão entre a massa inicial da matéria prima utilizada e a massa obtida de extrato, de acordo com a equação 4.4.

$$R(\%) = \frac{m \text{ Extrato}}{m \text{ Massa amostra}} \times 100 \quad (4.4)$$

Em que:

R(%) = rendimento global de extração;

mExtrato = massa de extrato obtida após o processo de extração;

mMassa amostra = massa de amostra utilizada no processo de extração.

4.4.1. Extração convencional – Maceração

Para realizar a extração por meio do método de maceração, usou-se como base o procedimento descrito por Palsikowski (2020). Em um erlenmeyer de 50 ml foram pesadas 3,33 g de amostra e adicionados 50 ml de solvente. O erlenmeyer foi vedado fazendo-se duas camadas: a primeira com papel filme e a segunda com papel alumínio. A extração durou cinco dias, sendo realizada em temperatura ambiente (25 ± 5 °C), com agitação manual diária de dois minutos.

Ao término do tempo de extração, foi realizada a filtração à vácuo do material. Com a bomba já ligada, o material do erlenmeyer foi despejado sobre o filtro. Um pequeno volume do solvente foi colocado no erlenmeyer e o mesmo agitado, com o intuito de lavar o material e aproveitar ao máximo a extração, sendo este solvente também despejado no filtro. Ao término da filtração do material, quando o mesmo já estava seco e não havia mais líquido a ser filtrado, o papel filtro foi descartado e novamente foi despejado solvente, desta vez no funil, com o mesmo intuito de aproveitamento.

O líquido coletado no kitassato foi então transferido para um béquer, e mais solvente foi utilizado para lavar o próprio kitassato, e este solvente desta lavagem também foi transferido para o béquer. Os mls de todas as passagens de solvente pelos utensílios não foram contabilizados, e sempre foi passado até não ter mais coloração verde (ser incolor).

O béquer foi levado a estufa de secagem a 50°C até a completa evaporação do solvente. Após, o béquer foi armazenado em dessecador com pesagens regulares até que não houvesse variação de massa. Todas as extrações foram realizadas em triplicada.

4.4.2. Extração convencional – Soxhlet

A extração convencional utilizando o conjunto Soxhlet (Laborglass) foi baseada na metodologia descrita por Santos *et al.* (2017). Foram envolvidas em papel filtro de café comercial (Melitta nº 102) aproximadamente 20 g de amostra e então inseridas no extrator Soxhlet. No balão volumétrico foram adicionados 250 ml de solvente. A ebulição do balão volumétrico foi mantida com o auxílio de uma manta de aquecimento a qual foi regulada de acordo com cada solvente levando-se em consideração o ponto de ebulição de cada um. O condensador

foi conectado a um banho de água que manteve sua temperatura em 1º C. As extrações duraram 6 horas.

Ao final da extração, o conteúdo do balão volumétrico foi transferido para um béquer e o mesmo levado para estufa de secagem a uma temperatura de 50º C até a completa evaporação do solvente. Para garantir que todo o conteúdo do balão fosse realmente transferido para o béquer, não ficando nenhuma quantidade impregnada no mesmo, utilizou-se o mesmo solvente da extração, para enxaguar tanto o balão quanto o Soxhlet, acrescentando ao béquer o conteúdo de cada enxague. O enxague foi feito até não apresentar coloração (supondo-se que estivera ali somente solvente).

4.4.3. *Extração não convencional – Extração assistida por ultrassom (EAU).*

A extração não convencional com solvente assistida por ultrassom foi baseada na metodologia descrita por Palsikowski (2020). Foi utilizado o ultrassom Sonics (VCX 750, Newtown – CT, EUA), conforme Figura 4.1, do Laboratório de Bioprocessos e Separação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* Toledo, o qual possui uma ponteira de titânio com diâmetro de 13 mm, um reator encamisado de vidro de 250 ml.

Para controlar a temperatura de extração, o ultrassom é conectado a um banho termostático (Marconi, MA-184/BB, Piracicaba – SP, Brasil). O equipamento possui potência de 750 W, com possibilidade de ajuste entre 20 a 99 % do total, e com frequência fixa de 20 kHz. A ponteira de titânio foi imersa nas amostras a uma altura de 5 mm do fundo do reator.



Figura 4.1. Extração assistida por ultrassom.

Planejamento Experimental

Foi elaborado um planejamento experimental Box-Behnken para a extração dos antioxidantes da erva mate comercial, com três variáveis, sendo elas temperatura (T), potência (P) e razão volume de solvente por massa de erva mate RSE, totalizando em 15 experimentos, incluindo a triplicata no ponto central a fim de se avaliar o erro experimental. O volume do solvente usado se manteve constante e o período de extração foi determinado em 15 min mediante determinação da cinética da extração EAU.

O planejamento experimental foi realizado a fim de se construir um modelo polinomial de segunda ordem e também, como forma de otimizar processos com números menores de experimentos. O modelo resultante é descrito pela equação 4.5.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.5)$$

Onde:

y = variável a ser otimizada. X_1, X_2, X_3 = fatores independentes codificados.

β_i = coeficiente linear. β_{ii} = coeficiente quadrático.

β_{ij} = coeficiente de interação de modelo.

Tabela 4.1. Valores experimentais das variáveis independentes utilizadas no planejamento Box-Behnken

Ensaio	T (°C)	P (%)	RSE (ml.g ⁻¹)	Massa amostra (g)
1	40	50	15	3,33
2	60	50	15	3,33
3	40	50	7,5	6,66
4	60	50	7,5	6,66
5	40	20	10	5
6	60	20	10	5
7	40	80	10	5
8	60	80	10	5
9	50	20	15	3,33
10	50	20	7,5	6,66
11	50	80	15	3,33
12	50	80	7,5	6,66
13	50	50	10	5
14	50	50	10	5
15	50	50	10	5

4.5. Caracterização dos extratos

Antes da realização de cada análise para caracterização dos extratos, foi preparada uma solução etanólica de 20 mL na concentração 1 mg/mL^{-1} de cada extrato obtido e armazenada sob refrigeração para utilização em cada uma das determinações a seguir.

4.5.1. Determinação do teor de flavonoides totais (TFLT)

Foi utilizado o método descrito por Chang *et al.*(2002) para determinação do teor de flavonoides totais dos extratos. Inicialmente, preparou-se uma solução de cloreto de alumínio 10% e uma solução de acetato de potássio 1M. Em um tubo de ensaio acrescentou-se 0,5 ml da solução etanólica, 1,5ml de etanol 95%, 2,8 ml de água destilada, 0,1 ml da solução de cloreto de alumínio e 0,1ml da solução de acetato de potássio. Durante 30 minutos, sob temperatura ambiente, as soluções ficaram em repouso. Após esse período, foi realizada a medição das absorvâncias no espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão), em comprimento de onda 415nm. Como branco utilizou-se uma solução contendo 1,5ml de etanol 95%, 2,8 ml de água destilada, 0,1 ml da solução de cloreto de alumínio e 0,1ml da solução de acetato de potássio. Para obtenção da curva padrão de calibração ($0\text{-}200 \text{ mg/ml}^{-1}$), foi utilizada quercetina. Os resultados obtidos foram expressos por meio da equação de regressão linear, em miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato ($\text{mg EQ.g extrato}^{-1}$).

4.5.2. Determinação do teor de fenólicos totais (TFET)

O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Aspé e Fernández (2011) foi utilizado para determinar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos. Primeiramente preparou-se solução do reagente Folin-Ciocalteu 10% e de carbonato de sódio 7,5% para posterior utilização. Em seguida, transferiu-se para um tubo de ensaio 0,3 ml da solução etanólica previamente preparada e 2,5ml da solução de Folin-Ciocalteu, a qual ficou em repouso por cinco minutos. Após o período de repouso, foram adicionados 2,0 ml da solução de carbonato de sódio, realizando agitação do tubo até que a

amostra ficasse homogênea e então, incubado em banho maria 50°C por mais cinco minutos. Por fim, foi realizada a medição das absorvâncias no espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão), em comprimento de onda 760nm. Para o branco, utilizou-se 0,3 ml de água deionizada, 2,5 ml de Folin-Ciocalteu e 2,0 ml de solução de carbonato de sódio. A curva padrão analítica de calibração foi construída utilizando-se ácido gálico nas concentrações de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo os resultados expressos em μg equivalentes de ácido gálico (EAG) mg^{-1} de amostra e a partir dela, calculado o coeficiente de correlação (R^2).

4.5.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

Baseada na metodologia descrita por Barzotto *et al.* (2020), foi realizada a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH. Foi preparada primeiramente uma solução etanólica do radical DPPH 0,1mM (Sigma Aldrich, GE). Em seguida, em um tubo de saio, foi acrescentado 0,2 ml da solução etanólica dos extratos obtidos e mais 3,8 ml da solução DPPH. Feita a homogeneização das amostras, as mesmas permaneceram por 40 minutos no escuro à temperatura ambiente, para que ocorresse a reação. Como branco, utilizou-se álcool etílico. O comprimento de onda de 517 nm foi utilizado para realização da leitura das absorvâncias, no espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão). A curva padrão foi montada com 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 e 0 μmol de Trolox (6-hidroxi2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e os resultados obtidos foram expressos em micromol equivalentes de Trolox por gramas de amostra. A equação 4.6 foi utilizada para determinar a porcentagem de atividade antioxidante pelo método DPPH.

4.5.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP foi baseada na metodologia descrita por Tiveron *et al.* (2012). Preparou-se uma solução do reagente FRAP contendo 25 ml de tampão acetato a 0,3 M e pH 3,6 com 2,5 ml de solução TPTZ 10mM em CHI 40 mM e 2,5 ml de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Então, adicionou-se a um tubo de ensaio 3ml da solução do

reagente FRAP e 100 µL da solução etanólica do extrato. Em banho maria a 37°C por 30 minutos, as amostras foram incubadas. Para o branco, foi utilizado o reagente FRAP. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu, Japão), no comprimento de onda de 593 nm. Para a curva padrão, utilizou-se sulfato ferroso (FeSO₄) nas concentrações de 2000, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250, 100, 0 µg.mL⁻¹, e então realizada a quantificação do teor de antioxidantes. O coeficiente de correlação (R²) foi calculado a partir da curva obtida. Os resultados foram expressos em micromoles de sulfato ferroso por g de extrato (µM EFe²⁺ por g de extrato).

4.5.5. Determinação de Clorofila

Para determinar a concentração das clorofilas “a” e “b”, realizou-se a leitura de absorbância das amostras no espectrofotômetro UV-VIS (UV-1800, Shimadzu) nos comprimentos de onda de 664 e 649 nm conforme a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001) para extratos obtidos do álcool 99,5% como solvente e utilizou-se as equações 4.6 e 4.7.

$$Cla = 13,36. A_{664} - 5,19. A_{649} \quad (4.6)$$

$$Clb = 27,43. A_{649} - 8,12. A_{664} \quad (4.7)$$

em que Cla é a concentração de clorofila “a”, em mg.L⁻¹, Clb a concentração de clorofila “b”, em mg.L⁻¹, A₆₄₉ a leitura de absorbância no comprimento de onda de 649 nm e A₆₆₄ a leitura de absorbância no comprimento de onda de 664 nm.

4.6. Cromatografia em Coluna

No preparo da coluna (Figura 4.2), utilizou-se uma bureta como forma adaptativa das colunas cromatográficas, em que nela inseriu-se algodão como suporte como forma de vedação da saída da bureta para posteriormente preencher-se até metade da coluna com a fase estacionária de sílica gel.



Figura 4.2. Coluna cromatográfica adaptada.

A torneira da bureta deve ser mantida aberta durante todo o processo. Em seguida, preparou-se a fase móvel, primeiramente composta por 80% de hexano pA e 20% de acetona pA, sendo adicionada a coluna. É imprescindível que a coluna se mantenha preenchida pelo eluente e não seque. Assim que o eluente percolou por toda a coluna, adicionou-se 1 mL da amostra e coletou-se as frações eluídas em diversos tubos de ensaio. Com o percorrer qualitativo da clorofila pela coluna e sua obtenção nos tubos de ensaio, o eluente foi alterado para o álcool puro.

O processo foi realizado para as amostras (extratos) de erva mate na condição pós ultrassom e também na condição de extratos secos (isentos de solvente). Após a cromatografia realizou-se a análise de clorofila e fenólicos totais nas frações de interesse.

4.7. Síntese do biodiesel

Para sintetizar o biodiesel, misturou-se, utilizando reação de transesterificação, óleo de soja refinado comercial, com o catalisador de reação hidróxido de potássio (KOH) e, como álcool de cadeia curta, o metanol (CH₃OH). Primeiramente, preparou-se uma mistura contendo 5,46 g de hidróxido de

potássio (2% da massa de óleo) e 126,316 ml de álcool metílico, a qual foi reservada para posterior utilização.

Em seguida, foi aquecido a 75°C, em um balão de três bocas, 300 ml de óleo de soja refinado (Figura 4.3). A mistura homogênea previamente preparada de álcool e catalisador, foi adicionada ao balão e então, duas bocas do balão foram fechadas com trouxinha de algodão, sendo que em uma delas foi inserido um termômetro para auxiliar no monitoramento da temperatura, enquanto a terceira boca foi ligada a um condensador.

O sistema ficou sob agitação magnética, utilizando-se uma placa de agitação magnética com aquecimento. A reação durou quatro horas e a temperatura se manteve a 80°C.



Figura 4.3. Produção de Biodiesel

Dessa mistura formam-se o biodiesel propriamente dito e glicerol, portanto, há necessidade de separação dos compostos formados a fim de se obter somente o biodiesel. Para isso, após as quatro horas de reação, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de decantação e aguardadas 24 horas para se obtivesse as duas fases nitidamente perceptíveis: uma fase inferior, densa, contendo o glicerol e uma fase superior, menos densa, sendo o biodiesel (Figura 4.4).



Figura 4.4. Formação de duas fases, a superior contendo biodiesel e a inferior contendo glicerol.

Após separação das duas fases, foi retirada a porção inferior e mantido somente o biodiesel no funil de decantação, dando sequência ao procedimento com inúmeras lavagens do biodiesel utilizando-se água a 65°C e realizando suave agitação. Por processo de decantação, separou-se a mistura de biodiesel e água (Figura 4.5) e então, levado a estufa a 60°C por 12 horas para secagem e evaporação total da água e umidade restantes. Findada secagem, armazenou-se o biodiesel produzido em frasco de vidro âmbar.

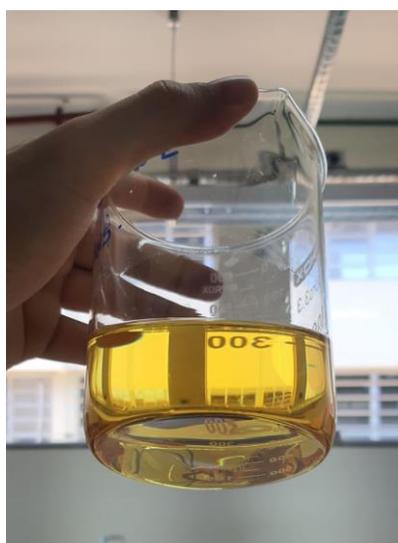


Figura 4.5. Biodiesel produzido

4.8. Caracterização do biodiesel

4.8.1. Aspecto

Para determinar o aspecto do biodiesel, colocou-se a amostra em um recipiente transparente e o mesmo posicionado contra a luminosidade, verificando assim a turbidez e a presença de impurezas.

4.8.2. Índice de acidez

Para determinar o índice de acidez, primeiramente preparou-se 100 ml com proporção de 1:1 de éter dietílico e etanol 95%. A essa mistura, foram adicionados 5 g de amostra e 5 gotas de fenolftaleína. Em seguida, utilizando uma solução de KOH 0,1 M, realizou-se a titulação por meio de titulador eletrônico (848 Titrino plus, Metrohm). A titulação ocorreu até que houvesse mudança na tonalidade do biodiesel, passando de transparente para cor rosada, até a mesma se mantivesse por 30 segundos. A acidez é determinada pela quantidade de hidróxido de potássio (KOH) necessária para que haja neutralização de ácidos livres em um grama de biodiesel. Por meio da equação 4.8, foi encontrado o índice de acidez.

$$\text{Índice de Acidez (\%)} = \frac{56,1.V.M}{\text{Massa amostra}} \quad (4.8)$$

Em que:

V: volume gasto da titulação de KOH;

M: molaridade da solução de KOH.

4.8.3. Teor de éster

Seguindo a Normativa Europeia EM 14103 (2003), as amostras foram preparadas. Pesou-se 0,3 g de amostra e à ela adicionados 10 ml de heptano (C₇H₁₆) 99 %. Dessa mistura, 100 µL foram transferidos para um balão

volumétrico de 1 ml e acrescidos 100 µL de padrão interno heptadecanoato de metila. O volume do balão foi completado com heptano 99 %. Utilizando um cromatógrafo a gás (PERKINELMER - CLARUS 680), os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados. O cromatógrafo conta com uma coluna capilar de sílica fundida de cianopropilpolisiloxano (Elite-WAX - 30m x 0,25 mm X 0,5 µm) e um detector de ionização em chama. A coluna foi inicialmente aquecida até 160 °C e elevada a 230 °C a uma taxa de 5 °C min⁻¹, permanecendo por dois minutos nesta temperatura. Tanto a temperatura do injetor quanto do detector permaneceu em 250 °C. Injetou-se 2,0 µL de amostra e a velocidade de fluxo dos gases foi de 2 ml min⁻¹ para o gás de arraste (H₂), 45 ml min⁻¹ para o gás nitrogênio, 45 e 450 ml min⁻¹ para os gases de hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão da amostra dividida foi de 1/50. Utilizou-se o software Workstation versão 5.0 (Varian) para determinar as áreas dos picos.

4.9. Teste de Rancimat de estabilidade oxidativa do biodiesel

A fim de se avaliar a influência dos extratos, bem como a qualidade de cada amostra e ainda, os processos de extração, realizou-se a análise de cada um deles como antioxidantes naturais a fim de se utilizar como estabilizante termo-oxidativo do biodiesel. As análises foram realizadas no Laboratório da Universidade Estadual de Maringá, campus de Umuarama/PR. Cada extrato obtido foi diluído em 3 g do biodiesel produzido, obtendo-se a concentração final de 1000 partes por milhão (PPM). Essas amostras foram submetidas ao teste de aquecimento acelerado a 110°C, sendo que para determinar o período de indução, a taxa de insuflação de ar foi de 10 L h⁻¹. Utilizou-se o Rancimat 73 (Metrohm) para realizar o teste, seguindo ainda a norma oficial EM 14112 de determinação da estabilidade em teste acelerado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Matéria Prima

5.1.1. Determinação da Umidade

A umidade média determinada para a erva-mate comercial foi de $5,24 \pm 0,24\%$. Além de reduzir o nível de água, que influencia diretamente na obtenção dos extratos, o processo de secagem é utilizado para retardar a deterioração do material e reduzir a ação de microrganismos (SOUZA et al., 2007). De acordo com Pereira et al. (2010), para que se atinja um maior rendimento e qualidade de extrato de uma matriz vegetal, é imprescindível a remoção de água, pois a mesma gera uma competição de solubilidade no meio.

5.1.2. Granulometria

Os resultados da análise granulométrica estão apresentados na Tabela 5.1. Nota-se que a maior parte do material foi retido no fundo com tamanho inferior a 0,2 mm. Entretanto, as partículas utilizadas na posterior obtenção dos extratos foram aquelas situadas entre as peneiras de 28 a 65 mesh, o que corresponde a um diâmetro médio de partículas de 0,320 mm. O diâmetro das partículas influencia no processo de extração de modo que, conforme o tamanho das partículas é reduzido, tem-se uma maior área de contato em relação a quantidade de partículas presentes, que facilita a transferência mássica entre soluto e solvente durante a extração (SHI et. al., 2011).

Tabela 5.1. Análise granulométrica das folhas secas de erva-mate.

Mesh	Abertura (mm)	Amostra Retida (g)	% Retida
16	1,000	0,026	0,13
28	0,600	0,888	4,50
35	0,425	1,644	8,40
48	0,300	2,682	13,70
65	0,212	3,167	16,20
Fundo	-	11,164	57,00

5.2 Rendimento de Extração

A influência do solvente orgânico utilizado nos métodos de extração convencionais, como Soxhlet e maceração foi testada. Os solventes orgânicos avaliados foram etanol, acetato de etila e *n*-hexano.

A Tabela 5.2 apresenta as condições de temperatura e tempo de extração usados nos métodos convencionais Soxhlet e maceração, e os rendimentos obtidos nas extrações. São apresentados os rendimentos médios com os seus desvios-padrão obtidos a partir de uma triplicata. Verifica-se um maior rendimento de extração utilizando o etanol como solvente para ambos os métodos. Esse fato está atrelado à maior polaridade do etanol, conforme sugerido por Ramic et al. (2015) e Palsikowski (2020). O etanol apresenta um índice de polaridade de 5,2, contra 4,4 para o acetato de etila e 0,0 para o hexano (Phenomenex, 2010). Este resultado sugere que a maior parte dos compostos presentes na matriz vegetal apresenta alta polaridade.

Tabela 5.2. Condições usadas e rendimentos obtidos nas extrações com solventes orgânicos. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de significância de 5%.

Método	Solvente	Temperatura (°C) / Tempo (h)	Rendimento (%)
Soxhlet	Etanol	78 / 6	36,5 ± 2,3 ^a
	Acetato Etila	77 / 6	9,5 ± 0,2 ^c
	Hexano	69 / 6	5,0 ± 0,1 ^e
Maceração	Etanol	25 / 120	12,8 ± 1,7 ^b
	Acetato Etila	25 / 120	7,3 ± 0,2 ^d
	Hexano	25 / 120	5,3 ± 0,2 ^e

Por outro lado, as extrações utilizando acetato de etila e *n*-hexano apresentaram menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos apolares presentes na erva-mate. Pelo resultado do teste de Tukey, foi identificado que as extrações apresentaram rendimentos estatisticamente diferentes, indicando a maior eficiência da extração com o solvente etanol, de maior polaridade.

Conforme a Tabela 5.2, tanto para o etanol como para o acetato de etila, o método de Soxhlet apresentou os maiores rendimentos, com exceção do solvente *n*-hexano, que apresentou rendimento estatisticamente igual nos dois métodos, de acordo com o teste de Tukey.

O maior rendimento obtido por Soxhlet é devido à recirculação do solvente em sua temperatura de ebulição. Maiores temperaturas contribuem para a extração de materiais, pois reduzem a tensão superficial e viscosidade. Dessa forma, o solvente atinge facilmente os locais ativos dentro da matriz e aumenta a solubilização dos compostos (ANDRADE *et al.*, 2012; CRUZ *et al.*, 2017; MAZZUTTI *et al.*, 2017; PALSIKOWSKI, 2020).

Assim como na maceração e no Soxhlet, as extrações assistidas por ultrassom também foram realizadas com os três solventes. A influência do solvente na extração por ultrassom foi avaliada após 15 min de extração, utilizando 50% da potência, com temperatura de 50°C, numa proporção de solvente/folha de 10 (mL.g⁻¹). Os resultados de rendimento de extração obtidos a partir de triplicata foram: 20,2 ± 1,2% para o solvente etanol, 5,5 ± 0,2% para o solvente acetato de etila, e 2,3 ± 0,1% para o solvente hexano. Por meio do teste estatístico de Tukey ficou evidenciado que os três resultados são diferentes (p < 0,05). Da mesma forma que os métodos de Soxhlet e maceração, verifica-se a influência da maior polaridade do etanol sobre o rendimento obtido.

Segundo Palsikowski (2020), embora o rendimento de uma extração seja um parâmetro importante para determinar a viabilidade técnica e econômica de um processo, ele não é o único, por isso é importante que sejam realizadas análises em relação à composição dos extratos. Ainda, segundo Dias *et al.* (2017) e Jovanovic *et al.* (2017), por questões de toxicidade, o uso do etanol é muito mais seguro e adequado que os demais solventes para uso nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Assim sendo, o etanol foi selecionado para realizar novos testes a fim de se otimizar as condições de extração da erva-mate assistida por ultrassom.

Com a finalidade de se determinar o tempo ideal a ser utilizado nas extrações por ultrassom utilizando o etanol como solvente, foram obtidas curvas cinéticas de extração onde foram usadas as mesmas condições de operação (50% da potência, 50°C, e razão solvente/folha de 10 mL.g⁻¹). As amostras de extratos foram coletadas após 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 min, sendo os resultados de rendimento apresentados na Figura 5.1.

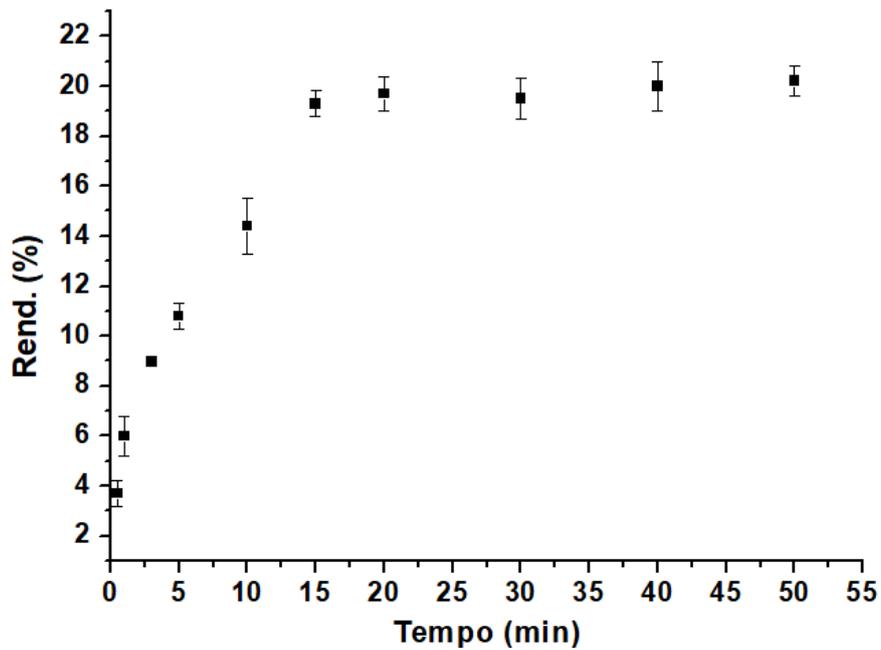


Figura 5.1. Cinética da extração assistida por ultrassom da erva-mate usando etanol como solvente.

É possível verificar um rendimento razoável (9%) logo aos 3 min de extração, possivelmente devido à ruptura das paredes celulares e à agitação promovida pelo ultrassom. O rendimento máximo da extração foi alcançado quando os compostos bioativos solúveis localizados dentro da matriz vegetal se difundiram para a superfície (PALSIKOWSKI, 2020). Ao atingir 15 min de extração alcançou-se um rendimento de 19,3%, o qual variou muito pouco a partir daí, indicando uma estabilização do processo. Assim sendo, determinou-se o tempo de 15 min de extração como tempo ideal para a extração dos compostos bioativos da erva mate a partir do solvente etanol.

5.2.1. Otimização das condições de operação da extração assistida por ultrassom

Foi realizado um planejamento experimental de 3 variáveis do tipo Box-Behnken de modo a avaliar/otimizar a condições do processo de extração assistida por ultrassom (EAU). Assim, foi determinado o efeito das variáveis temperatura, potência e razão folha/solvente sobre o rendimento após 15 min de extração. Para as variáveis foram utilizados três níveis (-1, 0 e +1), sendo que esse tipo de planejamento gera modelos matemáticos quadráticos (de segunda

ordem). A Tabela 5.3 apresenta os resultados de rendimento obtidos nos 15 experimentos, onde se verifica nos experimentos 13 a 15 uma triplicata no ponto central (nível 0).

Tabela 5.3. Matriz do planejamento experimental Box-Behnken para a resposta rendimento, da extração assistida por ultrassom da erva-mate, utilizando etanol como solvente.

Experimento	Temperatura - T (°C)	Potência - P (%)	Razão Solvente:Erva - RSE (mL.g ⁻¹)	Rendimento - Rend (%)
1	40	50	15	17,2
2	60	50	15	19,0
3	40	50	7,5	17,1
4	60	50	7,5	19,4
5	40	20	10	15,6
6	60	20	10	18,1
7	40	80	10	18,0
8	60	80	10	22,0
9	50	20	15	12,5
10	50	20	7,5	14,7
11	50	80	15	16,1
12	50	80	7,5	17,8
13	50	50	10	19,2
14	50	50	10	19,8
15	50	50	10	19,8

Observa-se na triplicata do ponto central (experimentos 13 à 15) um rendimento de $19,6 \pm 0,3\%$, conforme esperado, em função dos resultados preliminares, indicando uma boa reprodutibilidade do processo de extração. O rendimento obtido na extração assistida por ultrassom, em comparação com maceração, apresentou resultados superiores e o tempo de extração (15 minutos) foi muito menor, isto porque o efeito mecânico gerado pelas ondas de ultrassom, o aumento da temperatura e a redução da quantidade de folhas favoreceram a diminuição do tempo de extração. O maior resultado de rendimento (22%) na extração assistida por ultrassom foi inferior ao obtido no teste de extração por Soxhlet, usando o mesmo solvente, porém com volume de solvente 2,5 vezes menor e apenas 15 minutos de extração.

O rendimento de 22% foi observado no experimento 8, quando foi utilizada temperatura de 60°C, potência de 80% e relação solvente:erva (RSE) de 10 mL.g⁻¹ e o menor rendimento (12,5%) foi verificado no experimento 9, para uma temperatura de 50°C, potência de 20% e relação solvente:erva (RSE) de 15 mL.g⁻¹.

Analisando os dados da Tabela 5.3 e também as superfícies de resposta obtidas (Figura 5.2) é possível verificar que o rendimento tende a aumentar para valores mais altos de temperatura e de potência.

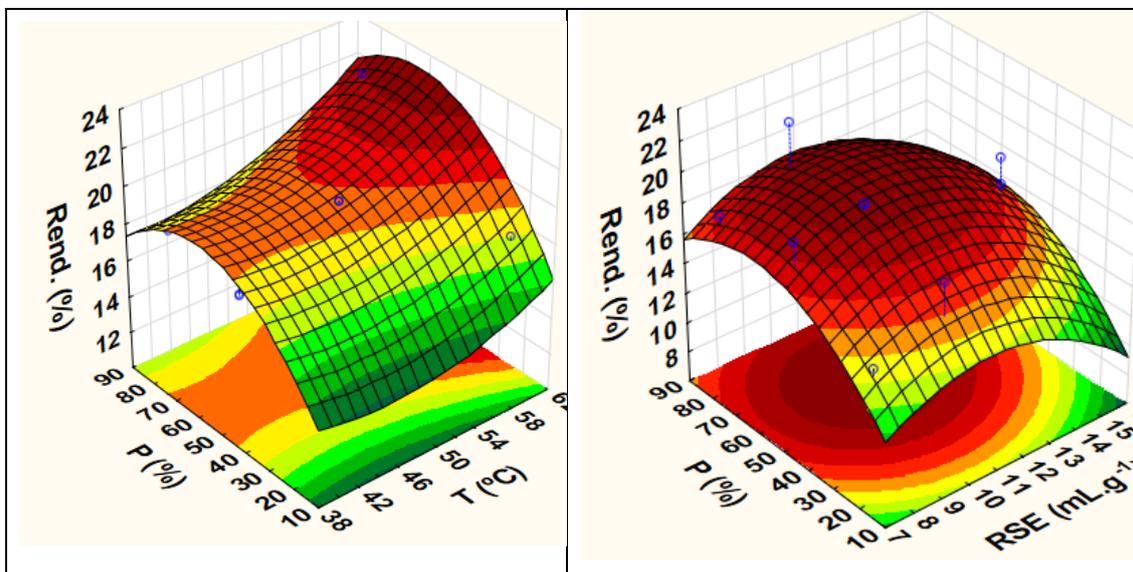


Figura 5.2. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o rendimento da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente.

O aumento do rendimento para as condições de maiores quantidades de solvente em relação à massa de erva-mate (RSE de 7,5 para 10) é consistente com os princípios de transferência de massa, uma vez que o gradiente de concentração é a força motriz para a difusão (SANTOS, 2018; SAHIN & SAMLI, 2013). Segundo Purohit e Gogate (2015), a otimização da razão massa/volume é muito importante para qualquer processo de extração. O uso de menores razões massa/solvente que um valor ótimo leva a um aumento no consumo de solvente, enquanto que razões massa/volume maiores do que o valor ótimo resultam numa extração incompleta.

Além de maiores temperaturas diminuírem a viscosidade e tensão superficial, a pressão de vapor do solvente aumenta, o que leva a um aumento no número de bolhas de cavitação (SANTOS, 2018; TEKIN *et al.*, 2015). Embora a intensidade do colapso das bolhas possa diminuir em altas pressões de vapor, devido à baixa diferença entre a pressão interna e externa (CHEMAT *et al.*, 2017), foi observado um aumento no rendimento com o aumento da temperatura, para as condições empregadas.

O efeito positivo do aumento da potência no rendimento pode ser explicado devido aos colapsos mais violentos das bolhas de cavitação, ocasionando maior destruição das paredes celulares da matéria-prima e, facilitando assim, o acesso do solvente aos analitos (SANTOS, 2018; CRAVOTTO *et al.*, 2008).

Utilizando-se o programa computacional *Statistica* v. 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc.), foram realizadas as análises estatísticas, visando determinar os efeitos das variáveis (potência -P, temperatura - T e razão - RSE) sobre o rendimento global da extração. Para isso, foram considerados modelos quadráticos com intervalo de confiança de 95%.

Com o gráfico de Pareto (Figura 5.3) é possível confirmar os efeitos estatisticamente significativos das variáveis isoladas (termos lineares – L e quadráticos – Q) e de suas interações lineares localizados à direita da linha tracejada, que indica ponto de significância dos resultados ($p \leq 0,05$).

Observa-se que todos os efeitos das variáveis foram significativos, com exceção do termo linear da RSE, sendo que o termo linear da potência foi mais importante para o rendimento das extrações com solvente assistidas por ultrassom. A influência desses parâmetros foi positiva (com exceção da T(Q)), significando que, o aumento quantitativo dessas variáveis implica no aumento do rendimento da extração. As interações lineares entre as variáveis não foram significativas.

O modelo matemático (regressão) gerado (equação 5.1), seguindo o planejamento experimental Box-Behnken, pode ser validado através da análise de variância dos dados, conforme a Tabela 5.4.

$$\text{Rend} = 7,18 - 0,73.T + 0,01.T^2 + 0,21.P - 0,002.P^2 + 3,89.RSE - 0,169.RSE^2 + 0,001.T.P - 0,0056.T.RSE + 0,0012.P.RSE \quad (5.1)$$

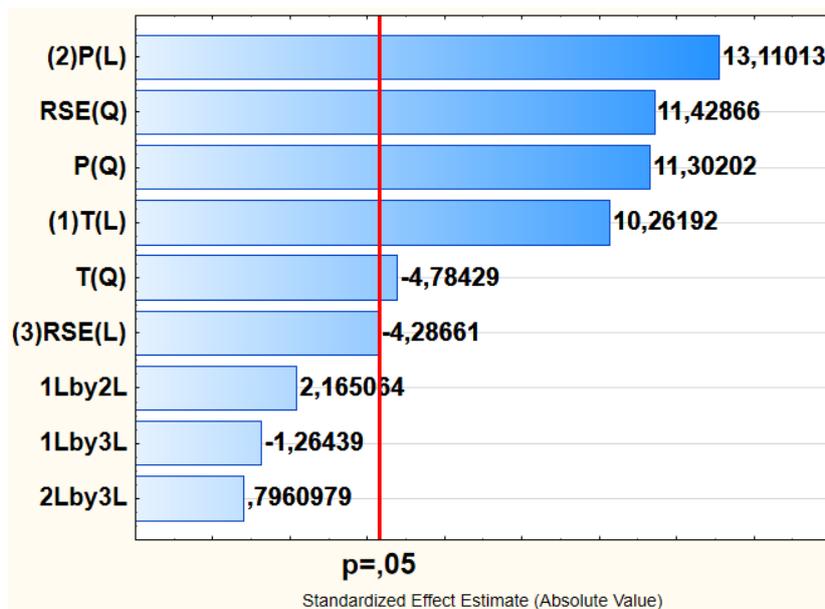


Figura 5.3. Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis potência, temperatura e razão no rendimento da EAU ($\alpha = 0,05$).

Tabela 5.4. Análise de variância para predição do rendimento da extração assistida por ultrassom ($\alpha = 0,05$). ($R^2 = 0,968$; $R^2_{ajustado} = 0,912$)

	SQ	GL	MQ	F calc.	p-valor
Regressão	75,520	9	8,391	17,075	0,0030
Falta de ajuste	2,217	3	0,739	6,158	0,1428
Erro puro	0,240	2	0,120		
Resíduo	2,457	5	0,491		
Total	77,977	14			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

O baixo p-valor da “regressão” ($< 0,05$) e o alto p-valor da “falta de ajuste” ($> 0,05$) indica que o modelo (regressão) estatístico gerado (equação 5.1) ajusta bem os resultados experimentais obtidos. Além disso, os elevados valores dos coeficientes de determinação do modelo R^2 e a sua proximidade com o R^2 ajustado indicam um bom ajuste da regressão. Isso é corroborado pela análise dos resíduos gerados pelo modelo conforme o “gráfico dos resíduos vs valores preditos” (Figura A-1 do Apêndice) onde se observa a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero indicando uma distribuição normal dos mesmos e também pela análise do “gráfico da probabilidade normal dos resíduos” (Figura A-2 do Apêndice) onde se observa que os resíduos brutos encontram-se dentro do espectro de resíduos padronizados (-1,96 à +1,96) de uma distribuição normal indicando a ausência de pontos influentes (valor extremo) ou valor atípico

(*outlier*) (que significa uma observação com "alto" resíduo). Se um valor extremo for influente, ele interferiria sobre a função de regressão ajustada (a inclusão ou não do ponto modificaria substancialmente os valores ajustados) (MONTGOMERY, 2013).

5.3. Quantificação dos teores de flavonoides e fenólicos totais nos extratos de erva mate

Os extratos obtidos da erva-mate (*Illex paraguariensis*) comercial foram analisados quanto aos teores de flavonoides totais (TFLT) e fenólicos totais (TFET). Os resultados dos métodos de extração por Soxhlet e maceração são apresentados na Tabela 5.5, em função dos diferentes tipos de solventes orgânicos testados.

O resultado mais expressivo de teor de flavonoides totais foi verificado no ensaio de extração de Soxhlet utilizando etanol como solvente. Para ambos os métodos, os maiores valores de TFLT foram obtidos usando etanol como solvente, seguido do acetato de etila, e *n*-hexano, considerados estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de nível de significância. Os valores de flavonoides totais obtidos para os solventes etanol e acetato de etila no método de maceração foram considerados estatisticamente iguais pelo teste de Tukey a um nível de 5% de significância.

Para o teor de fenólicos totais verificou-se a mesma tendência, ou seja, resultado mais elevado no ensaio de extração de Soxhlet com etanol. Da mesma forma, para ambos os métodos, os maiores valores de TFET foram obtidos usando etanol como solvente, seguido do acetato de etila, e *n*-hexano, considerados estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey a 5% de nível de significância.

De acordo com Jayaprakasha, Girenavar & Patil (2008), o acetato de etila é utilizado para extrair compostos polares intermediários, como as gliconas 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. Assim, os resultados obtidos sugerem que a maioria dos

flavonoides e fenólicos presentes nos extratos sejam de natureza polar e semi-polar.

Segundo Mezzomo *et al.* (2010), o teor de fenólicos totais (TFET), indica uma boa estimativa do potencial antioxidante, considerando que os compostos fenólicos são os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante de extratos naturais.

Tabela 5.5. Teor de flavonoides totais (TFLT) e de fenólicos totais (TFET) dos extratos da erva-mate obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de significância de 5%.

Método	Solvente	TFLT (mg EQ·g _{extrato} ⁻¹)	TFET (mg EAG·g _{extrato} ⁻¹)
Soxhlet	Etanol	75,7 ± 5,2 ^a	510,7 ± 31,2 ^a
	Acetato Etila	38,7 ± 1,8 ^c	233,5 ± 10,9 ^c
	Hexano	29,1 ± 1,5 ^d	120,1 ± 3,8 ^e
Maceração	Etanol	60,2 ± 4,2 ^b	313,5 ± 12,5 ^b
	Acetato Etila	58,2 ± 2,9 ^b	172,3 ± 6,0 ^d
	Hexano	15,2 ± 0,9 ^e	87,9 ± 5,2 ^f

Na Tabela 5.5 observa-se que as diferenças nos teores de fenólicos totais foram mais significativas considerando-se o solvente utilizado na extração. Conforme Boeing *et al.* (2014), a maior eficiência das extrações de compostos flavonoides e fenólicos depende do solvente utilizado e de sua polaridade. Os maiores valores foram obtidos quando o etanol foi utilizado como solvente de extração, fato que pode ser atribuído a melhor solvatação dos compostos fenólicos nesse solvente devido às interações (ligações de hidrogênio) entre as regiões polares das moléculas fenólicas e o solvente (HO *et al.*, 2018). Quando solventes apolares, tais como *n*-hexano e CO₂, são usados, extratos lipídicos com baixos valores de TFET são obtidos. De acordo com Jovanovic *et al.* (2017), o etanol interage com os flavonoides por interações não covalentes, o que promove uma rápida difusão no meio de extração (PALSIKOWSKI, 2020).

O acetato de etila, que possui polaridade intermediária, apresentou valores de TFET que estavam entre os obtidos com etanol e com *n*-hexano. Além disso, o acetato de etila possui menor eficiência de solvatação quando comparado ao etanol, pois as moléculas de acetato de etila são apenas aceptoras de prótons enquanto que o etanol é um doador de próton (BOEING *et al.*, 2014; NICÁCIO *et al.*, 2017; PALSIKOWSKI, 2020).

Dessa forma, o etanol foi o solvente escolhido para fazer a otimização do método de UAE, sendo o mesmo planejamento Box-Behnken com 15 experimentos utilizado para avaliar o efeito das variáveis temperatura, potência e razão solvente/folha no teor de flavonoides totais e fenólicos totais, conforme mostrado na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Matriz do planejamento experimental Box-Behnken para as respostas TFLT e TFET, da extração assistida por ultrassom da erva-mate, utilizando etanol como solvente.

Experimento	Temperatura T (°C)	Potência P (%)	RSE (mL.g ⁻¹)	TFLT (mg EQ.g _{extrato} ⁻¹)	TFET (mg EAG.g _{extrato} ⁻¹)
1	40	50	15	27,1	364,1
2	60	50	15	15,7	52,4
3	40	50	7,5	14,7	253,3
4	60	50	7,5	44,1	294,2
5	40	20	10	48,5	198,7
6	60	20	10	61,4	82,1
7	40	80	10	48,4	108,6
8	60	80	10	67,2	102,1
9	50	20	15	59,3	400,3
10	50	20	7,5	50,4	369,1
11	50	80	15	44,2	271,0
12	50	80	7,5	70,3	432,4
13	50	50	10	55,5	501,1
14	50	50	10	54,5	495,3
15	50	50	10	55,2	502,5

A triplicata do ponto central indica uma boa reprodutibilidade do processo de extração assistida por ultrassom, tanto para os resultados de flavonoides como para os resultados de fenólicos. Comparativamente, o melhor resultado (70,3 mg EQ.g_{extrato}⁻¹) de TFLT foi obtido no ensaio 12, sendo próximo aquele obtido por Soxhlet usando etanol (Tabela 5.5). Da mesma forma, o melhor resultado (502,5 mg EAG.g_{extrato}⁻¹) de TFET foi obtido no ensaio 15 e está próximo ao obtido por Soxhlet usando etanol (Tabela 5.5).

O pico de extração de flavonoides (ensaio 12) se deu com temperatura de 50°C, potência de 80% e relação solvente:erva (RSE) de 7,5 mL.g⁻¹ e o menor teor (ensaio 3) se deu para uma temperatura e relação solvente:erva (RSE) mais baixa. Por outro lado, a maior extração de fenólicos (ponto central) se deu com temperatura de 50°C, potência de 50% e relação solvente:erva (RSE) de 10 mL.g⁻¹ e o menor teor (ensaio 2) foi verificado para uma temperatura mais alta (60°C) e relação solvente:erva (RSE) mais alto (15 mL.g⁻¹).

Analisando os dados da Tabela 5.6 e também as superfícies de resposta obtidas é possível verificar que o teor de flavonoides (Figura 5.4) tende a aumentar para valores mais altos de temperatura e RSL, ao passo que para os fenólicos (Figura 5.5), valores intermediários de temperatura e potência geraram maiores extrações desses compostos. As superfícies de respostas podem ser descritas conforme a regressões quadráticas (equações 5.2 e 5.3) obtidas para o planejamento estudado.

$$\text{TFLT} = -597,57 + 17,94.T - 0,147.T^2 - 1,19.P + 0,018.P^2 + 40,73.RSE - 1,09.RSE^2 + 0,005.T.P - 0,27.T.RSE - 0,074.P.RSE \quad (5.2)$$

$$\text{TFET} = -6993,48 + 267,78.T - 2,52.T^2 + 13.P - 0,14.P^2 + 123,00.RSE + 0,34.RSE^2 + 0,09.T.P - 2,38.T.RSE - 0,40.P.RSE \quad (5.3)$$

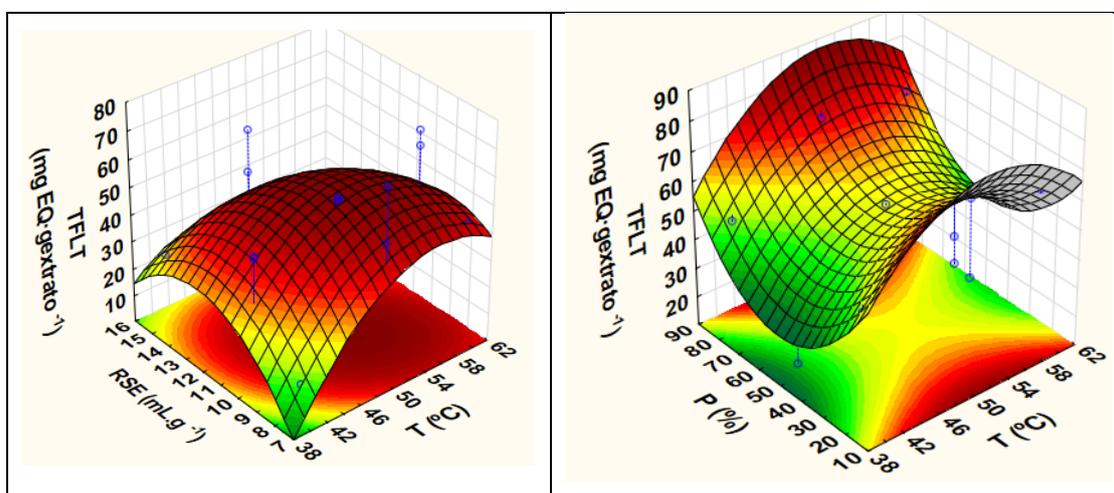


Figura 5.4. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de flavonoides totais (TFLT) da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente.

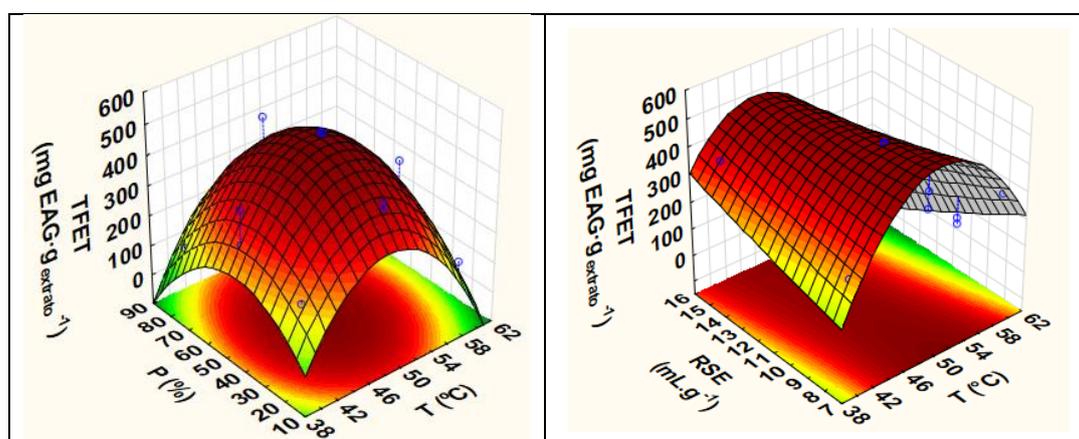


Figura 5.5. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de fenólicos totais (TFET) da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente.

Nos gráficos de Pareto (Figura 5.6 “a” e “b”) observa-se, tanto para os flavonoides (TFLT) como para os fenólicos (TFET) que quase todos os efeitos das variáveis foram significativos, com exceção do termo linear da potência para o TFLT e o termo quadráticos de RSE para o TFET. Além disso, o termo quadrático da temperatura foi significativo, indicando que o aumento da mesma nas extrações assistidas por ultrassom, causa um aumento nos valores de TFLT e de TFET. O mesmo não se verificou para o termo quadrático de P e RSE. As interações lineares entre as variáveis foram significativas.

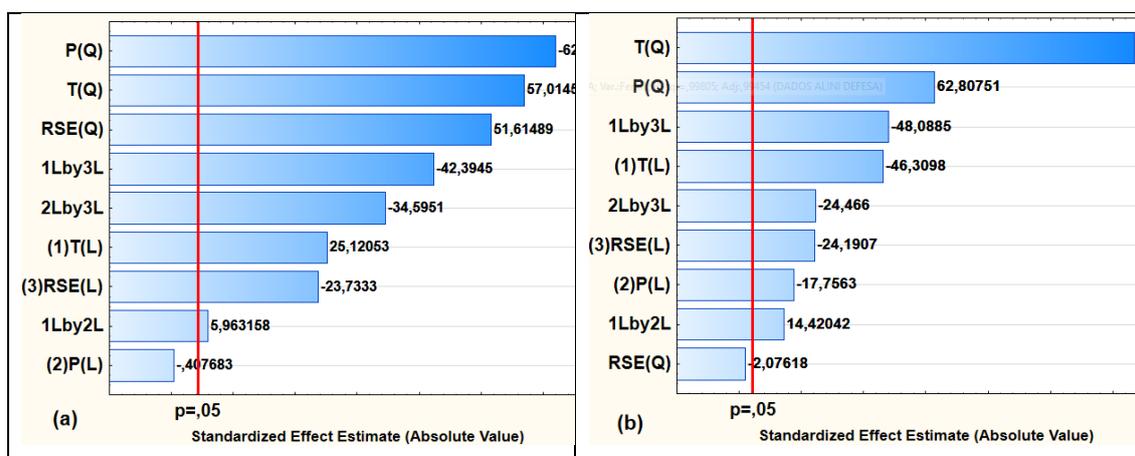


Figura 5.6. Gráfico de Pareto de efeito para a potência, temperatura e RSE no teor de (a) flavonoides totais (TFLT) e (b) fenólicos totais (TFET), da EAU ($\alpha = 0,05$).

A Tabela 5.6 e a Figura 5.5 mostram que o aumento da temperatura além de um valor intermediário leva a uma diminuição no teor de fenólicos, a uma razão solvente/folha constante. Por isso, a temperatura deve ser selecionada de acordo com o composto de interesse. A otimização da temperatura deve ser realizada para obter o maior rendimento do composto alvo sem que ocorra sua degradação térmica (CHEMAT *et al.*, 2017). Carrera *et al.* (2012) extraíram compostos fenólicos de uvas vermelhas, segundo eles, um aumento na temperatura geralmente leva a um aumento na recuperação de fenólicos ao se trabalhar com extrações sólido-líquido, porém altas temperaturas facilitam as reações de degradação por oxidação desses compostos.

Os valores de TFET, embora não fossem tão sensíveis à variação da razão solvente/erva, tiveram pequenos aumentos com a diminuição dessa razão solvente/erva, ou seja, com o aumento da massa de erva no mesmo volume de solvente, como pode ser observado na Figura 5.5. Embora quantidades

excessivas de material vegetal resultem no aumento da viscosidade, e assim dificulta a difusão dos polifenóis através do meio de extração, os polifenóis são altamente solúveis em soluções aquosas (JOVANOVIĆ *et al.*, 2017). O aumento na razão solvente/erva não foi o suficiente para saturar o meio de extração, e assim, foi possível aumentar o rendimento da extração de compostos fenólicos (PALSIKOWSKI, 2020).

Os modelos matemáticos (regressões) gerados (equações 5.2 e 5.3), seguindo o planejamento experimental Box-Behnken, podem ser validados através da análise de variância dos dados, conforme a Tabela 5.7.

O baixo p-valor da regressão ($< 0,05$) e o p-valor da falta de ajuste acima de 0,05 indica que ambos os modelos (regressões) estatísticos gerados (equações 5.2 e 5.3) ajustam bem os resultados experimentais obtidos para TFLT e TFET. Além disso, os elevados valores dos coeficientes de determinação do modelo R^2 e a sua proximidade com o R^2 ajustado indicam um bom ajuste da regressão. Por outro lado, os resíduos gerados pelo modelo conforme o “gráfico dos resíduos vs valores preditos” (Figura A-3 do Apêndice) mostram a aleatoriedade dos resíduos em torno do zero indicando uma distribuição normal dos mesmos. O gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura A-4 do Apêndice) indicam a ausência de *outliers*.

Tabela 5.7. Análise de variância para predição do teor de flavonoides totais (TFLT) e fenólicos totais (TFET) da extração assistida por ultrassom ($\alpha = 0,05$).

Flavonoides totais (TFLT) ($R^2 = 0,9963$; $R^2_{ajustado} = 0,9897$)					
	SQ	GL	MQ	F calc.	p-valor
Regressão	3934,155	9	437,128	151,234	0,000015
Falta de ajuste	13,963	3	4,654	19,018	0,050367
Erro puro	0,489	2	0,245		
Resíduo	14,452	5	2,890		
Total	3948,607	14			
Fenólicos totais (TFET) ($R^2 = 0,9980$; $R^2_{ajustado} = 0,9945$)					
	SQ	GL	MQ	F calc.	p-valor
Regressão	352922,1	9	39213,57	284,404	0,0000
Falta de ajuste	660,3	3	220,1	15,1	0,0627
Erro puro	29,1	2	14,6		
Resíduo	689,4	5	137,88		
Total	353611,5	14			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

5.4. Determinação da atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH

Os extratos de erva-mate obtidos por maceração e Soxhlet, foram analisados quanto a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP; o primeiro mede a capacidade de eliminação de radicais livres (MIGUEL, 2010) e o segundo mede a capacidade da amostra em reduzir o complexo Fe^{3+} -TPTZ em Fe^{2+} -TPTZ. Os resultados são apresentados na Tabela 5.8.

Por meio da análise de variância, verificou-se que, em cada método de extração aplicado, o tipo de solvente exerceu influência significativa, sendo obtidos resultados diferentes de atividade antioxidante na forma de FRAP. O mesmo se verifica para os resultados de DPPH. Assim, observam-se resultados superiores para o solvente etanol para as duas formas de antioxidante avaliadas, sendo que, neste caso, o método de extração por Soxhlet se mostrou mais efetivo do que o método de maceração. Os maiores resultados com etanol se devem, provavelmente, ao elevado poder de solvatação de compostos antioxidantes presentes na erva-mate, devido às interações (ligações de hidrogênio) entre os sítios polares das moléculas antioxidantes e o solvente (BOEING *et al.*, 2014). Esse efeito do solvente na atividade antioxidante dos extratos é devido aos potenciais antioxidantes diferentes de compostos com polaridades diferentes (BOEING *et al.*, 2014; PASIKOWSKI, 2019).

Tabela 5.8. Teor de FRAP e DPPH dos extratos da erva-mate obtidos pelos diferentes métodos e solventes avaliados. A mesma letra sobrescrita na mesma coluna indica que não há diferença significativa a um nível de significância de 5%.

Método	Solvente	FRAP ($\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)	DPPH ($\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)
Soxhlet	Etanol	2441,9 \pm 95,6 ^a	458,3 \pm 24,2 ^a
	Acetato Etila	631,7 \pm 21,4 ^c	129,1 \pm 7,4 ^c
	Hexano	112,0 \pm 8,4 ^e	59,2 \pm 3,2 ^e
Maceração	Etanol	1405,6 \pm 56,3 ^b	267,1 \pm 10,2 ^b
	Acetato Etila	298,1 \pm 10,2 ^d	93,2 \pm 6,4 ^d
	Hexano	59,4 \pm 5,2 ^f	71,0 \pm 4,7 ^f

Segundo Palsikowski (2020), considerando-se o mecanismo de redução da molécula de DPPH, que está relacionado com a presença de grupos hidroxila na molécula antioxidante, pode-se inferir que a atividade apresentada pelo extrato mais polar é provavelmente devido a presença de substâncias com

hidroxilas livres (fenólicas ou não). Essa exigência estrutural pode estar vinculada também à presença de flavonoides (ARIGONY, 2005).

Conforme Ho *et al.* (2018), os polifenóis são os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes das plantas. Esses compostos agem como antioxidantes pela doação de um átomo de hidrogênio, e pela quelação de metais e extinção do oxigênio singlete. Os compostos que exibem capacidade antioxidante pelo método de FRAP são geralmente doadores de prótons (HO *et al.*, 2018). Assim, para obtenção de compostos fenólicos, o acetato de etila proporciona uma recuperação mais baixa de compostos antioxidantes que o etanol devido a sua baixa eficiência de solvatação, uma vez que as moléculas de acetato de etila são apenas aceitadoras de prótons enquanto que as de etanol são moléculas doadoras de prótons.

Assim como para os teores de flavonoides e fenólicos totais, foi estudada a otimização do método de UAE para as atividades antioxidantes de FRAP e DPPH, sendo o mesmo planejamento Box-Behnken com 15 experimentos utilizado para avaliar o efeito das variáveis temperatura, potência e razão solvente/folha, conforme mostrado na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Matriz do planejamento experimental Box-Behnken para as respostas FRAP e DPPH, da extração assistida por ultrassom da erva-mate, utilizando etanol como solvente.

Experimento	Temperatura T (°C)	Potência P (%)	RSE (mL.g ⁻¹)	FRAP	DPPH
1	40	50	15	1642,0	394,0
2	60	50	15	1658,1	409,1
3	40	50	7,5	1412,2	318,3
4	60	50	7,5	1690,0	406,0
5	40	20	10	1867,3	461,2
6	60	20	10	1756,5	468,5
7	40	80	10	1704,3	413,2
8	60	80	10	1992,1	469,3
9	50	20	15	1847,0	458,0
10	50	20	7,5	1750,2	413,1
11	50	80	15	1765,8	427,0
12	50	80	7,5	1889,7	421,1
13	50	50	10	1756,0	485,6
14	50	50	10	1760,1	479,0
15	50	50	10	1750,3	470,0

FRAP em $\mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$, e DPPH em $(\mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1})$

Fazendo-se a análise estatística do planejamento de forma semelhante aos resultados de rendimento, flavonoides e fenólicos totais, verifica-se para os resultados de FRAP e DPPH que a triplicata do ponto central sugere uma boa reprodutibilidade do processo de extração assistida por ultrassom.

O melhor resultado ($1992,1 \mu\text{mol EFe}^{2+} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$) de FRAP foi obtido no ensaio 8, sendo inferior aquele obtido por Soxhlet usando etanol (Tabela 5.8). Por sua vez, o melhor resultado ($485,6 \mu\text{mol ETrolox} \cdot \text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$) de DPPH foi obtido no ensaio 13 e é superior àquele obtido por Soxhlet usando etanol (Tabela 5.8).

Verificando as superfícies de resposta obtidas é possível concluir que o teor de FRAP (Figura 5.7) tende a aumentar para valores mais altos de temperatura e RSL, sendo que o mesmo ocorre para o teor de DPPH (Figura 5.8). As superfícies de respostas podem ser descritas conforme a regressões quadráticas (equações 5.4 e 5.5) obtidas para o planejamento estudado.

$$\text{FRAP} = -1110,9 + 74,4.T - 0,69.T^2 - 27,0.P + 0,16.P^2 + 273,3.RSE - 7,44.RSE^2 + 0,33.T.P - 1,53.T.RSE - 0,47.P.RSE \quad (5.4)$$

$$\text{DPPH} = -1348,6 + 41,1.T - 0,37.T^2 - 2,8.P + 0,01.P^2 + 146,0.RSE - 5,2.RSE^2 + 0,04.T.P - 0,42.T.RSE - 0,07.P.RSE \quad (5.5)$$

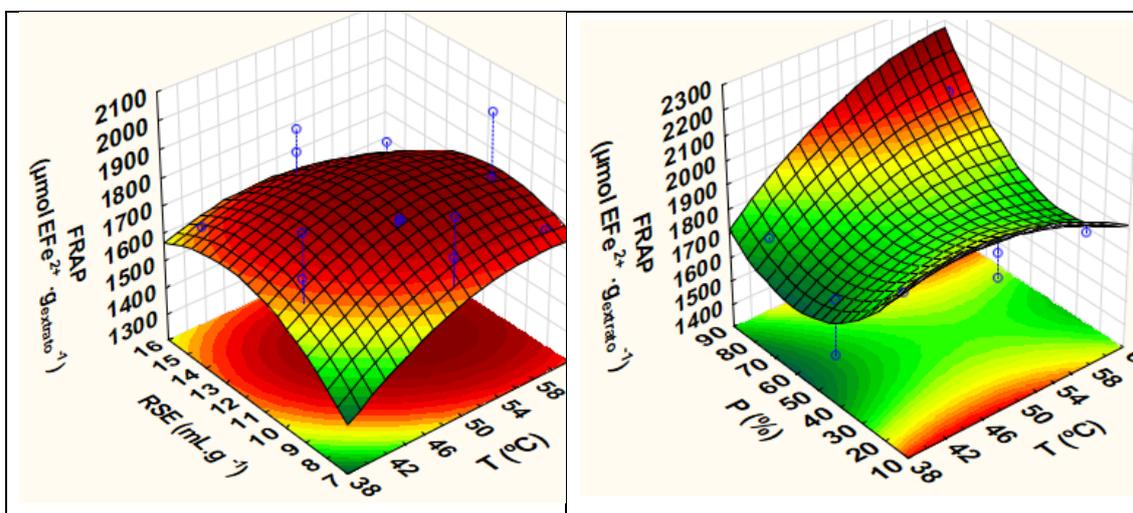


Figura 5.7. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de FRAP da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente.

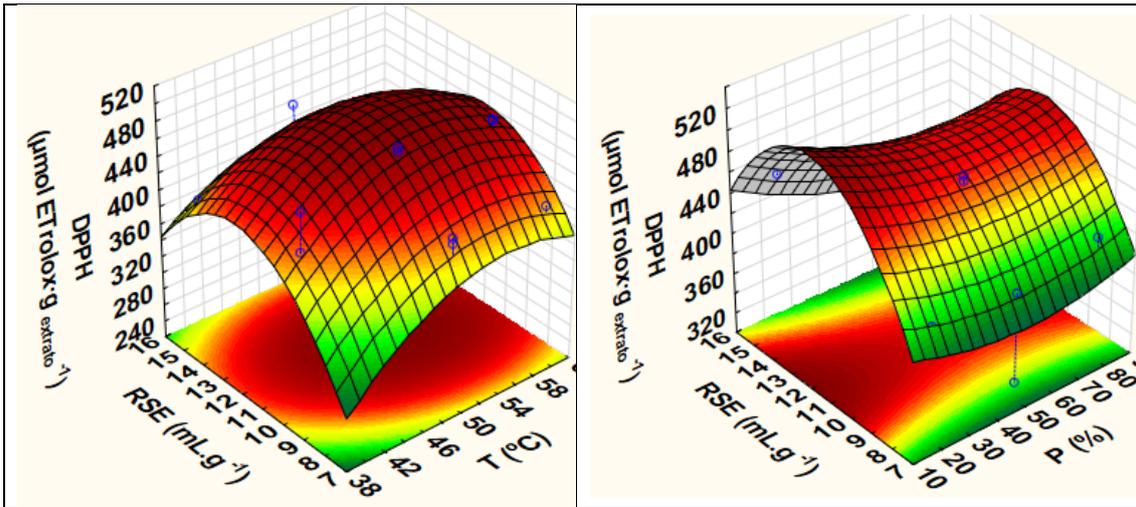


Figura 5.8. Superfícies de resposta do planejamento experimental Box-Behnken para o teor de DPPH da EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente.

Nos gráficos de Pareto (Figura 5.9 “a” e “b”) observa-se, para o FRAP, que quase todos os efeitos das variáveis foram significativos, com exceção do termo linear da potência. Para o DPPH somente os termos lineares e quadráticos de T e RSE foram significativos no nível de significância de 5%.

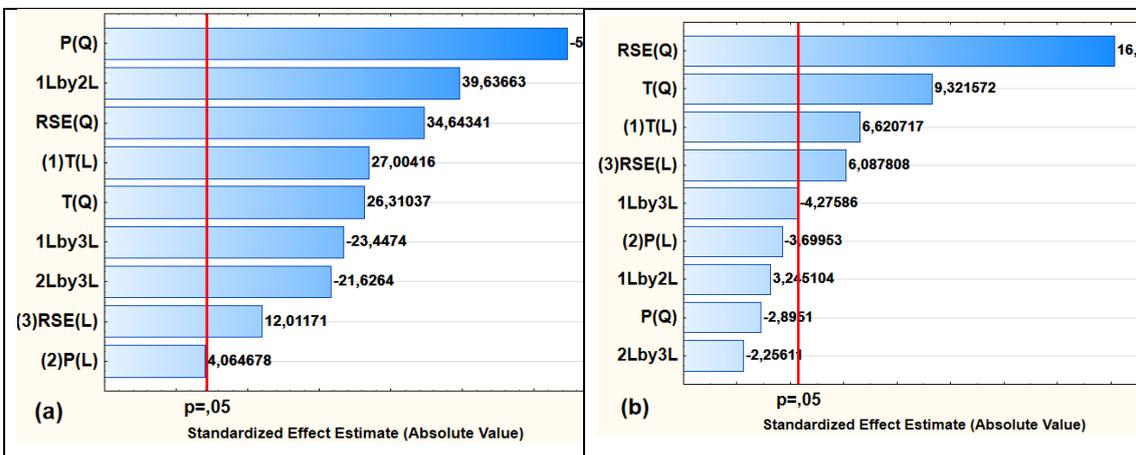


Figura 5.9. Gráfico de Pareto de efeito para as variáveis potência, temperatura e razão no teor de (a) FRAP e (b) DPPH, da EAU ($\alpha = 0,05$).

A análise de variância do planejamento experimental Box-Behnken para ambas as respostas é apresentada na Tabela 5.10, onde se verifica através do p-valor para a falta de ajuste ($> 0,05$) e o p-valor para a regressão ($< 0,05$) que somente o DPPH ajusta satisfatoriamente os dados experimentais e pode, portanto, ter sua equação (regressão) validada (eq. 5.5). Por sua vez, o modelo

gerado para o FRAP não foi satisfatório, apresentando inclusive baixo valor de $R^2_{ajustado}$.

Tabela 5.10. Análise de variância para predição do teor de FRAP e DPPH da extração assistida por ultrassom ($\alpha = 0,05$).

FRAP ($R^2 = 0,9515$; $R^2_{ajustado} = 0,8641$)					
	SQ	GL	MQ	F calc.	p-valor
Regressão	229741,4	9	25526,8	10,89	0,0085
Falta de ajuste	11666,3	3	3888,7	153,50	0,0065
Erro puro	50,7	2	25,3		
Resíduo	11717,0	5	2343,4		
Total	241458,4	14			
DPPH ($R^2 = 0,9682$; $R^2_{ajustado} = 0,9109$)					
	SQ	GL	MQ	F calc.	p-valor
Regressão	26284,7	9	2920,5	16,89	0,0031
Falta de ajuste	750,2	3	250,1	4,39	0,1912
Erro puro	114,0	2	57		
Resíduo	864,2	5	172,8		
Total	27148,9	14			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

5.5. Otimização da extração assistida por ultrassom

Observando-se as superfícies de resposta para os teores de FRAP e DPPH por meio das Figuras 5.7 e 5.8, verifica-se uma semelhança de comportamento entre as mesmas, considerando as variáveis mais significativas RSE e T. A mesma tendência é verificada para o teor de flavonoides (Figura 5.4). Isso sugere que tanto os teores de flavonoides totais como as atividades antioxidantes de FRAP e DPPH são maximizadas em níveis intermediários de temperatura e razão solvente:erva.

Assim sendo, seria interessante definir os valores dos parâmetros do processo de EAU (T, P e RSE) que possam satisfazer (otimizar) simultaneamente as quatro respostas estudadas (flavonoides totais, fenólicos totais, FRAP e DPPH) por meio do planejamento experimental Box-Behnken, e incluindo também o rendimento.

Esse estudo de otimização é possível ser feito no software *Statistica* por meio da aplicação da função desejabilidade (*Desirability*) a qual irá determinar

os valores das variáveis T, P e SER (dentro das faixas ou níveis estabelecidos no planejamento) que buscam maximizar os cinco resultados simultaneamente. Por fim, é calculado o valor da desejabilidade (de 0 a 1), a qual indica o quanto foi possível, ou satisfatório, alcançar o objetivo a que se propõe a tal função.

Derringer e Suich (1980) propuseram a determinação das condições ótimas através da otimização multiobjetivo com restrições usando funções de desejabilidade global onde cada função resposta é transformada em uma função individual de desejabilidade, $d(y_i)$, compreendida no intervalo 0 e 1. Foi estipulado que se a resposta for totalmente desejável, $d(y_i) = 1$, e se a resposta estiver fora da região aceitável, $d(y_i) = 0$.

Assim, as variáveis independentes são escolhidas combinando a desejabilidade de cada variável-resposta através da média geométrica, o que dá a função desejabilidade global D. O software *Statistica* v. 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc.) apresenta a função “*Response desirability profiling*” em que é possível obter os perfis de desejabilidade globais em função de cada variável independente, além de indicar o valor ótimo de cada variável independente que maximiza a desejabilidade global do processo (BARROS NETO *et al.*, 2007).

Os gráficos da resposta prevista pelo modelo e os perfis de desejabilidade global permitem observar como as mudanças nos níveis de cada variável independente influenciam em cada variável-resposta e na desejabilidade global, respectivamente.

Assim, a Figura 5.10 apresenta os valores dos pontos ótimos das 5 variáveis resposta: Rend=19,93%, TFLT=70,12 mg EQ·g_{extrato}⁻¹, TFET=92,69 mg EAG·g_{extrato}⁻¹, FRAP=1915,8 μmol EFe²⁺·g_{extrato}⁻¹ e DPPH=495,82 μmol ETrolox·g_{extrato}⁻¹, bem como as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas: T= 52,75 °C, P= 77% e RSE= 11,25 mL·g⁻¹. A função desejabilidade global alcançada foi de 0,8928.

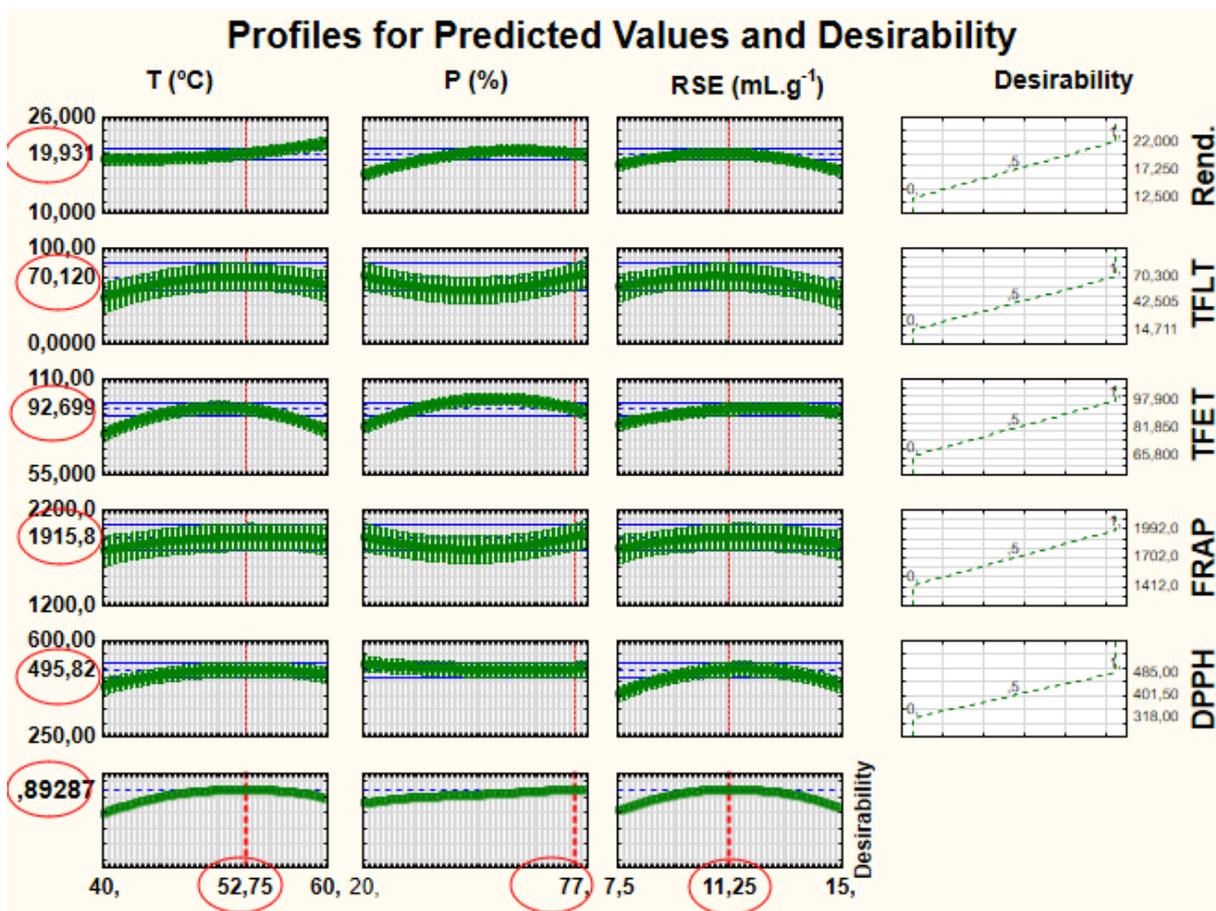


Figura 5.10. Função *desirability* do planejamento experimental Box-Behnken para a EAU da erva-mate utilizando etanol como solvente.

5.6. Comparação dos teores de antioxidantes da erva mate com outros trabalhos

Uma análise comparativa dos teores de antioxidantes do presente trabalho com algumas obtidas da literatura é apresentada na Tabela 5.11.

Verifica-se que a erva-mate se destaca quanto ao teor de compostos fenólicos, e atividade antioxidante de FRAP e DPPH, comparativamente a outras plantas. Isso faz com que a mesma, além do uso alimentar, pode ser utilizada em outros segmentos, como farmacêutica, cosméticos, e também como aditivo no biodiesel.

Tabela 5.11. Comparação de teores de Flavonoides, fenólicos, FRAP e DPPH da erva-mate com outros trabalhos

Referência	Planta utilizada	Método de extração	Flavonoides	Fenólicos	FRAP	DPPH
Este trabalho	Erva-mate	Maceração	60,2	313,5	1405,6	267,1
“	Erva-mate	Soxhlet	75,7	510,7	2441,9	458,3
“	Erva-mate	EAU	70,3	502,5	1992,0	485,6
Palsikowski (2020)	Pata de vaca	Maceração	48,5	45,1	539,8	77,5
“	Pata de vaca	Soxhlet	57,2	58,6	625,6	98,4
“	Pata de vaca	EAU	68,5	57,7	745,6	145,7
Viana (2020)	Folha cerejeira	Goldfish	111,6	276,7	3,3	536,3
“	Folha jambolão	“	123,6	161,5	3,3	526,9
“	Folha pitanga	“	353,8	305,9	5,5	550,1
“	F. pessego	“	291,4	299,9	5,2	534,9
Santos (2018)	Óleo candeia	Soxhlet	-	120,0	1848,0	-
Meregalli (2017)	Casca araçá	EAU	374,0	589,5	-	-

Flavonoides (mg EQ.g_{extrato}⁻¹), Fenólicos (mg EAG.g_{extrato}⁻¹), FRAP (µmol EFe²⁺ · g_{extrato}⁻¹), DPPH (µmol ETrolox · g_{extrato}⁻¹)

5.7. Teste de clarificação do extrato por cromatografia em coluna

Com o intuito de separar os compostos antioxidantes dos compostos que conferem cor ao extrato, como a clorofila, foi feito um teste de clarificação do extrato etanólico da erva mate, obtido por ultrassom. No processo de separação por cromatografia em coluna do extrato etanólico da erva-mate foi observado qualitativamente o arraste da clorofila conforme o eluente hexano/acetona (fase móvel) percorria a coluna contendo sílica-gel (fase estacionária), conforme é possível visualizar na Figura 5.11.



Figura 5.11. Arraste da clorofila na coluna cromatográfica com extrato de erva mate.

De acordo com Oliveira (2005), há quatro mecanismos de separação por meio da coluna cromatográfica. O primeiro, caracterizado pela separação líquido-sólido, relaciona a interação do soluto com a fase estacionária diretamente no sítio do adsorvente sólido. Partindo-se para a segunda modalidade, há uma interação líquido-líquido denominada partição, em que a fase estacionária é um líquido, e esse pode estar adsorvido a superfície de um suporte sólido. O terceiro corresponde a troca iônica, em que a fase estacionária contém grupos iônicos, catiônicos e aniônicos ligados ao suporte. Por fim, o último mecanismo correspondente ao processo utilizado no trabalho que é a cromatografia em gel, sendo a fase estacionária composta de partículas com poros que impedem determinados solutos permearem, fazendo com que percolem mais rapidamente pela coluna.

De acordo com José *et. al.* (2009), a sílica gel é uma alternativa para o processo de secagem, pois a mesma retira a umidade por meio da adsorção física da água. Dito isso, avaliando a polaridade da água, temos que a mesma é

polar, pois a distribuição da densidade de elétrons é desigual pela molécula (VOET, 2014). Ou seja, a sílica gel por sua estrutura molecular também se caracteriza como polar, assim, a coluna cromatográfica é composta pela fase estacionária polar e, inicialmente, expressa como fase móvel o eluente (hexano e acetona) misto, porém tendendo ao apolar (OLIVEIRA, 2005).

Partindo-se para o conceito aplicado, a clorofila por ser polar (Figura 5.12), ao ser inserida a amostra de extrato na coluna e o eluente percolar a mesma, essa clorofila tende a ser arrastada, visto que a acetona na mistura com o hexano faz com que a fase móvel tenha certa polaridade, porém, menor que a sílica gel. Avaliando o antioxidante, como o p-fenilenodiamina, esse é composto por fenólicos e radicais livres (Figura 5.13), a polaridade tende a ser maior que a da clorofila em si.

Assim, ao alterar o eluente para o etanol, observou-se uma tendência de os antioxidantes serem arrastados pelo mesmo. Vale ressaltar que os tubos de ensaios coletados com os antioxidantes apresentavam duas fases (etanol e hexano com acetona).

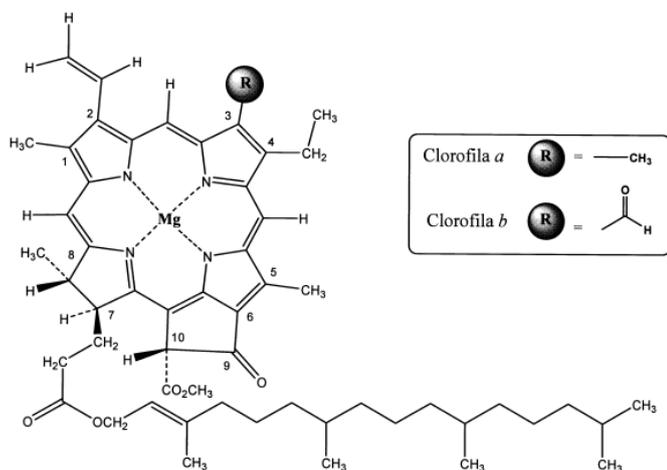


Figura 5.12. Estrutura molecular clorofila.

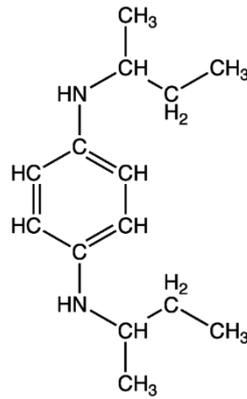


Figura 5.13. Ilustração exemplar da estrutura molecular do antioxidante p-fenilenodiamina.

5.7.1. Clorofila

Conforme a metodologia de Lichtenthaler & Buschmann (2001), estimou-se a concentração de clorofila das amostras controle (pós-ultrassom, sem passar na coluna), além de avaliar as amostras pós-cromatografia. Na Tabela 5.12 são apresentadas as concentrações de clorofila da amostra controle e a maior concentração obtida nas frações após a cromatografia.

Tabela 5.12. Concentração de clorofila das amostras controle e após a cromatografia.

Amostra	Clorofila "a" (mg.L⁻¹)	Clorofila "b" (mg.L⁻¹)
Pós-ultrassom	113,28	63,70
Pós-ultrassom Tubo 6	11,84	8,58

Deve-se ressaltar que, visualmente, a clorofila aparece mais concentrada no tubo de ensaio nº 6, como demonstrado na Figura 5.14.

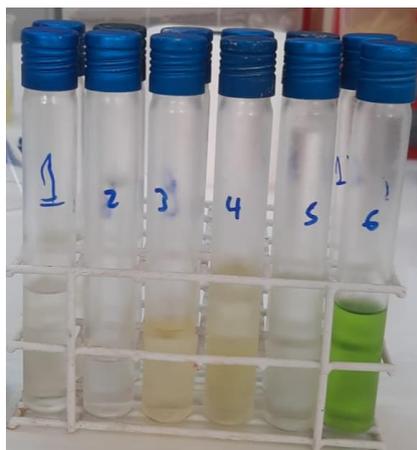


Figura 5.14. Ilustração dos tubos de ensaios coletados pós cromatografia em coluna.

Com o objetivo de clarificar os extratos, é de interesse que os antioxidantes estejam dispostos em tubos de ensaios distintos aos com maior concentração de clorofila. Assim sendo, partiu-se para a análise de fenólicos totais.

5.7.2. Fenólicos Totais, DPPH e FRAP

Os compostos fenólicos têm capacidade antimicrobiana e também propriedades antioxidantes, sendo capaz de atrasar a reação de rancificação de óleos e aumentar a estabilidade oxidativa lipídica (MAISETTA *et. al.*, 2019).

Os valores encontrados do teor de fenólicos totais (TFET) estão apresentados na Figura 5.15. Nota-se que a concentração de fenólicos foi expressiva em tubos de ensaios em que a clorofila se demonstrou ausente. O tubo de ensaio ótimo, de acordo com a Figura 5.15, para o extrato de erva-mate pós-ultrassom é o de número 11, com concentração de $179,1 \text{ mg EAG.g}_{\text{extrato}}^{-1}$.

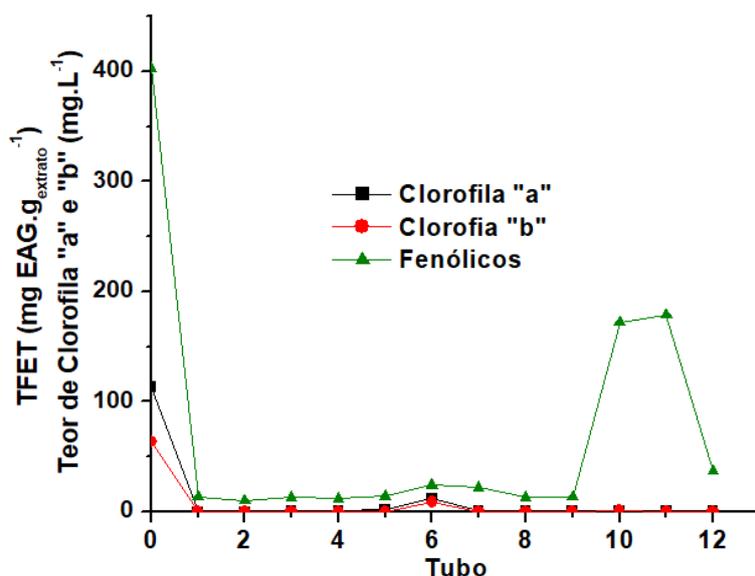


Figura 5.15. Concentração de clorofila "a", "b" e fenólicos totais (TFET) por ensaio pós cromatografia do extrato de erva-mate pós ultrassom.

A maior atividade antioxidante (DPPH e FRAP) é observada nas amostras que apresentaram maior concentração de fenólicos totais, pois a atividade antioxidante está ligada diretamente a esses compostos. Assim, na tabela 5.13 são apresentadas as concentrações referentes a atividade antioxidante.

Tabela 5.13. Atividade antioxidante dos extratos com maior concentração de fenólicos totais para os métodos de DPPH e FRAP

Amostra	DPPH ($\mu\text{mol ETrolox.g}_{\text{extrato}}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol EFe}^{2+}.\text{g}_{\text{extrato}}^{-1}$)
Controle	410	1627
Tubo 11	215	578

Nota-se que a concentração tanto de DPPH quanto de FRAP sofre uma redução considerável após passar pela coluna (tubo 11). Isso é justificado pelo fato de que no controle, tem-se todo o extrato na sua concentração máxima de obtenção, enquanto que nos tubos ocorre a diluição inerente a cromatografia. É válido ressaltar também a presença dos fenólicos totais nas amostras, visto que os três métodos tem o mesmo parâmetro, que é o fator antioxidante presente como observado também no trabalho de Sant'Ana *et. al.* (2011).

5.8. Caracterização do biodiesel

5.8.1 Aspecto

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) determina que o biodiesel deve apresentar um aspecto límpido e isento de impurezas. Ao analisar o biodiesel obtido, sendo apresentado pela Figura 4.5, pode-se constatar que sua aparência atende as exigências estabelecidas pela ANP, sendo um produto isento de impurezas e límpido, além, de não apresentar resquícios de água.

5.8.2 Determinação do Índice de Acidez

Ao se realizar a análise do índice de acidez do biodiesel sintetizado podemos observar que o mesmo se encontra dentro dos limites máximos que é proposto pela ANP uma vez que o mesmo apresentou um valor de $0,12 \pm 0,006$ mg de KOH.g⁻¹, e na análise realizada com o titulador automático obteve-se um valor de $0,11 \pm 0,01$ mg de KOH.g⁻¹, ambos apresentando resultados abaixo do limite estabelecido de 0,50 mg de KOH.g⁻¹.

Essa análise corresponde aos miligramas necessários de hidróxido de potássio (KOH) para se realizar a neutralização completa dos ácidos graxos que estão presentes por grama de biodiesel analisado. O elevado índice de acidez no biodiesel pode indicar que ele apresente um certo grau de degradação, pois os ácidos são produtos gerados a partir das reações de oxidação. Além disso, a presença de ácidos nos biodieseis pode desencadear problema em motores, e o biodiesel pode apresentar características corrosivas (VIANA, 2020).

5.8.3. Teor de éster

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. O resultado obtido para teor de ésteres foi de $97,1\% \pm 0,8$, 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 (VIANA, 2020). 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. Teste Rancimat

Quando se trata de análises de biodiesel, um dos parâmetros físico-químicos mais essenciais é o teste de estabilidade oxidativa. Esta análise determina a resistência à oxidação lipolítica, que é expressa como um período de indução (PI). O PI representa o tempo necessário para aumentar a formação de produtos oriundos de processos de oxidação. De acordo com a Resolução ANP nº 798 de 2019, os métodos para determinação da estabilidade oxidativa devem ser realizados a 110°C utilizando equipamento Rancimat, conforme EN14112 e EN15751.

Os valores dos tempos de indução para o biodiesel puro, para o biodiesel com os antioxidantes naturais do extrato (tubo 11 após a cromatografia e amostra pós ultrassom) e para o biodiesel com antioxidante sintético BHT para fins de comparação são apresentados na tabela 5.14.

Tabela 5.14. Teste de estabilidade oxidativa.

Amostra	Tempo de indução (h)
Biodiesel com amostra purificada (tubo 11)	3,23 ± 0,26
Biodiesel com amostra pós-ultrassom	3,48 ± 0,09
Biodiesel com antioxidante Sintético (BHT)	10,45 ± 0,28
Biodiesel Puro	2,80 ± 0,02

De acordo com a ANP, o tempo de indução mínimo para o biodiesel nesses parâmetros é de 12 h, tempo abaixo desse pode desencadear problemas de formação de produtos insolúveis. Em relação ao biodiesel puro, tem-se que seu tempo médio de indução ficou em uma faixa de 2,80 h, valor abaixo do mínimo proposto pela ANP. Isso pode ser explicado pela presença de compostos de ácidos graxos insaturados, que são abundantes em óleos vegetais e

presentes no biodiesel, e que promovem a degradação lipolítica (CORSINI et. al., 2006).

Considerando-se os testes de biodiesel com antioxidantes, seja natural ou sintético, todos expressaram valores abaixo do mínimo estipulado. De acordo com Oliveira (2014) em sua pesquisa, obteve-se resultados de biodiesel aditivado com saburá (antioxidante natural) com tempo de indução de 13,64 h, porém, a concentração trabalhada pelo mesmo foi de 5000 ppm. É válido ressaltar que a qualidade do biodiesel produzido e do método para o teste de Rancimat influenciaram no resultado final dos antioxidantes naturais, visto que as concentrações finais de fenólicos totais eram relativamente baixas comparadas as utilizadas no trabalho de Oliveira (2014) por exemplo, e a concentração adicionada ao biodiesel em si foi menor que a mencionada pelo autor.

6. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que a erva-mate (*Illex paraguariensis*) pode ser considerada uma boa fonte de compostos fenólicos e flavonoides com atividade antioxidante. Entre os métodos avaliados, o método de Soxhlet resultou em maiores rendimentos, seguido dos métodos de extração assistida por ultrassom e maceração. Considerando o tempo de extração e o volume de solvente utilizado, o método de ultrassom é mais vantajoso. O solvente etanol foi o que teve maiores rendimentos devido à sua polaridade, e também devido à sua capacidade de doar prótons, resultou em extratos com maiores teores de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em todos os métodos de extração avaliados. Além disso, o etanol é mais adequado para indústrias alimentícias e farmacêuticas do que o *n*-hexano e o acetato de etila.

As condições experimentais que foram otimizadas para a extração assistida por ultrassom foram de 523,7°C, 77% da potência e razão solvente/erva de 11,2 mL.g⁻¹. Considerando os resultados de rendimento, a variável potência apresentou o efeito positivo mais significativo devido ao aumento na cavitação e seus efeitos mecânicos. Para os teores de flavonoides e fenólicos totais a temperatura teve efeito positivo mais significativo. Quanto a atividade antioxidante, os teores de FRAP e DPPH apresentaram a relação solvente:erva como efeito positivo mais significativo.

Os modelos polinomiais quadráticos de segunda-ordem se ajustaram adequadamente aos dados experimentais e foram úteis para prever e otimizar o processo de extração em termos de rendimento, TFLT, TFET e DPPH, dentro dos limites experimentais.

Além disso, o presente trabalho buscou promover a clarificação/purificação dos extratos de erva-mate para posterior aplicação dos antioxidantes obtidos no biodiesel. De fato, o processo de cromatografia em coluna promoveu a separação da clorofila do extrato, sendo que foi possível avaliar tal resultado tanto de forma qualitativa quanto quantitativa. Além disso, o melhor resultado de fenólicos totais obtido após a purificação foi de 179,1 mg de EAG.g_{extrato}⁻¹ para o extrato de erva-mate.

Porém, para o teste de estabilidade oxidativa do biodiesel, tem-se que nenhum dos antioxidantes, naturais ou sintéticos, atingiu o valor mínimo de tempo de indução estipulado pela Agência Nacional do Petróleo (ANP).

Por fim, é de interesse científico aprofundar os estudos referente a síntese do biodiesel e aplicação desses antioxidantes naturais com a finalidade de substituir os sintéticos para garantir formas de energias mais limpa e sem riscos a saúde humana. Como sugestão é interessante trabalhar o exposto do trabalho com métodos de teste de Rancimat para concentrações maiores, a fim de validar a ineficiência ou não dos antioxidantes no biodiesel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE. Sobre o biodiesel brasileiro. **BiodieselBR**, 2015. Disponível em: <https://www.biodieselbr.com/revista/047/abiove-sobre-o-biodiesel-brasileiro>.
- ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M. A.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A.; CURRAN, T. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. **Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques.** *Industrial Crops and Products*, v. 95, p. 404–415, 2017.
- ANDRADE, F. M. **Avaliação de biomassa, clorofila, cafeína e tanino em *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire, crescendo sob sombreamento e pleno sol.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- ANDRADE, F. M. **A exploração e utilização do recurso *Ilex paraguariensis* St. Hill - erva-mate, seus impactos sócio econômicos atuais e potencialidades de manejo sustentável.** In: Seminário Nacional Sobre Recursos Florestais Da Mata Atlântica, I., 1999. São Paulo. Anais ... Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2000. Novofotolito Editora Gráfica. p. 24-33.
- ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition.** *Talanta*, v. 88, p. 544–552, jan. 2012.
- ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração.** B. CEPPA, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, jul/dez, 2006.
- ANTONIASSI, R. **Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras.** B. CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 2, jul./dez. 2001.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. **High quality biodiesel and its diesel engine application: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1999-2008, 2010.
- AZWANIDA, N. **A Review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation.** *Medicinal & Aromatic Plants*, v. 04, n. 03, p. 3–8, 2015.
- AZIZAH, A. H.; RUSILAWATTI, N. M.; TEE, T. S. **Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products.** *Food Chemistry*, v. 64, n. 2, p. 199-202, 1999.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFUOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from**

- plant materials: A review.** *Journal of Food Engineering*, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos.** Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª. Ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007.
- BENDICHO, C.; LA CALLE, I. de; PENA, F. COSTAS, M.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I. **Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry.** *Trac Trends In Analytical Chemistry*, v. 31, p.50- 60, jan. 2012. Elsevier BV.
- BERTONI, M.H.; PRATKRICUN, S.D.; KANZIG, R.G.; CATTANEO, P. **Effect of different stages of the tradicional process for yerba mate production on the composition of fresh leaves.** *Anales de la Association Quimica Argentina*, v.80, n.6, p.493-501, 1992.
- BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; COSTA E SILVA, B.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. DE 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 Jorunal*, v. 8, n. 48, p. 1–9, 2014.
- BONDI-OLI, P.; BELLA, L. D.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2005, 107, 153.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Plano Nacional de Agroenergia.** Brasília, 2005. Página 120.
- BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex. 2009. Disponível em: <<https://www.phenomenex.com/Info/Page/technicalguides>> Acesso em: outubro de 2021.
- CALIXTO, C. D. **Óleo de quiabo como fonte alternativa para produção de biodiesel e avaliação de antioxidantes naturais em biodiesel etílico de soja.** 121 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB, 2011.
- CAMPOS, M.A.A. **Balço de Biomassa e nutrientes em Povoamentos de *Ilex paraguariensis*. Avaliação de Safra e Safrinha.** Dissertação de mestrado em Ciências Florestais do curso de Pós-Graduação em engenharia florestal da UFPR. Curitiba, 1991.
- CANTERLE, L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante.** 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria – RS, 2005.
- CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. **Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes.** *Analytica Chimica Acta*, v. 732, p. 100–104, 2012.

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas em Florestas. Colombo: EMBRAPA - CNPF, Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. p. 280-287.
- CENI, G. C. **Oxidases da erva mate (*Ilex paraguariensis* ST. HILL): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas.** 194 f. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim – RS, 2005.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANOTIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. **Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 540–560, 2017.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 813–835, 2011.
- COELHO, G. C.; RACHWAL, M.; SCHNORRENBERGER, E.; SCHENKEL, E. P. **Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate.** In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3. Anais. Porto Alegre: Comissão dos Organizadores: Universidade do Rio Grande do Sul: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 396-399.
- CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCIA-VALLEJO, M. C.; SIMÓN, B. F. **Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different spanish provenances.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 46, n. 8, p. 3166-3171, 1998.
- CORRÊA, S. M.; ARBILLA, G.; *Atmos. Environ.* 2006, 40, 6821.
- 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, K. A., GUIMARÃES, A. C. R., REIS, M. M., SANTANA, C. S. A. **Estudo do processo de lixiviação controlada da escória de aciaria em extrator soxhlet visando emprego em pavimentos.** *Revista Matéria*, v.22, n.2, 2017.
- CRAVOTTO, G., BOFFA, L., MANTEGNA, S., PEREGO, P., AVOGADRO, M., CONTAS, P. **Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 898–902, 2008.
- CRUZ, P. N.; PEREIRA, T. C. S.; GUINDANI, C.; OLIVEIRA, D. A.; ROSSI, M. J.; FERREIRA, S. R. S. **Antioxidant and antibacterial potential of butia**

- (Butia catarinensis) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 119, p. 229–237, 2017.
- 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.
- DERRINGER, G.; SUICH, R. **Simultaneous Optimization of Several Response Variables.** *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.
- DIAS, A. L. B.; SERGIO, C. S. A.; SANTOS, P.; BARBERO, G. F.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. **Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling.** *Journal of Food Engineering*, v. 198, p. 36–44, abr. 2017. **Agroindustrias de Frutas Tropicais.** Alimentos e Nutrição. v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.
- DONADUZZI, C.M.; COELHO, S.R.M.; CARDOSO, E.L.; GALLO, A.G.; HUPPES, G.K.; KUHN, I.M.V.; SCHICHEL, C. **Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva-mate comercializadas na região de Toledo, Paraná.** II Congresso Sul Americano de Erva-Mate, v.1, n.1, p. 158-161, 2000.
- EMBRAPA. **Plano nacional de agroenergia.** Brasília/DF. 2ª ed. 2006.
- ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. **Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 22(2): 193-204, maio-ago, 2002.
- FAGUNDES, G. C. P. **Cevando mate.** Editora Habitasul. Porto Alegre, 1980. 135p.
- FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. *Quím. Nova*, **2005**, 28, 19.
- FRANKEL, E.N. **In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids.** *Trends in Food Science & Technology*, v.4, n.7, p.220-225, 1993.
- GÁMEZ-MEZA, N. et al. **Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse.** *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.
- GARCÍA M., LALAGUNA B. N. G., ARAUZO J., GONZALO A., SÁNCHEZ J. L. **Antiodants for Biodiesel: Additives Prepared from Extracted Feactions of Bio-Oil.** *Fuel Processing Technology*, v. 156, p. 407-414, 2017.

- GHESTI, G. F. **Preparação e caracterização de catalisadores para produção de biocombustíveis.** Brasília, 2009.
- GOMIDE, R. **Operações unitárias: operações com sistemas sólidos granulares.** São Paulo: Gomide, 1983.
- GORDON, M. H. **The mechanism of antioxidant action in vitro.** In: HUDSON, B. J. F. Food antioxidants. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.
- GUINDANI, C.; PODESTÁ, R.; BLOCK, J. M.; ROSSI, M. J.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. **Valorization of chia (*Salvia hispanica*) seed cake by means of supercritical fluid extraction.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 112, p. 67–75, jun. 2016.
- HALLIWELL, B. **Antioxidants in human health and diseases.** *Annual Review of Nutrition*, v. 16, p.33-50, 1996.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, 2007.
- HAMILTON, R. J. **The chemistry of rancidity in foods.** In: HAMILTON, R. J.; ALLEN, J. C. Rancidity in foods. 3th ed. London: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 1-21.
- HILL, S.E. **A comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods.** *Inform*, v.5, n.1, p.104-109, 1994.
- HO, L.-H.; RAMLI, N. F.; TAN, T.-C.; MUHAMAD, N.; HARON, M. N. **Effect of extraction solvents and drying conditions on total phenolic content and antioxidant properties of watermelon rind powder.** *Sains Malaysiana*, v. 47, n. 1, p. 99–107, 2018.
- HUI, Y. H. **Bailey's industrial oil & fat products.** 5th ed. New York: John Willey & Sons, 1996. v. 3.
- IBÁÑEZ, E. et al. **Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 47, n. 4, p. 1400-1404, 1999.
- JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. **Lipid oxidation in biological and food systems.** In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 5-63.
- JABEEN, K.; JAVAID, A. **Antifungal activity of *Syzygium cumini* against *Ascochyta rabiei* — The cause of chick peab light.** *Natural Product Research*, v.24, p. 1158–1167, 2010.

- JAIN, S.; SHARMA, M. P. **Stability of biodiesel and its blends: a review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 14, p. 667-678, 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 grapefruit and Sour orange fruit extracts in different invitro 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.
- JOLY, S.; BROUILLET, L.; BRUNEAU, A. **Phylogenetic Implications of the Multiple Losses of the Mitochondrial *coxII* Intron in the Angiosperms.** *International Journal of Plant Sciences*. v. 162, p. 359–373, 2001.
- JORGENSEN, J. H.; FERRERO, M. **Antimicrobial susceptibility testing: general principle and contemporary practices.** *Clinical Infectious Diseases*, v.26, p.973-80, 1998.
- JOSÉ, S.C.B.R.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C.; PÁDUA, J.G. **Umidificação de sementes de girassol após ultrassecação em sílica gel e câmara de secagem.** *Revista Brasileira de Sementes*, v.31, p.16-26, 2009.
- JOVANOVIC, A. A.; DORDEVIC, V. B.; ZDUNIC, G. M.; PLJEVLJAKUSIC, D. S.; SAVIKIN, K. P.; GODEVAC, D. M.; BUGARSKI, B. M. **Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques.** *Separation and Purification Technology*, v. 179, p. 369–380, 2017.
- 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 view point.** *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.
- KIEFER, W. F. S.; et al. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato de *Euphorbia tirucalli* Linneau na produção do biodiesel de soja.** *Engenharia Sanitária e Ambiental: Tecnologias para a Sustentabilidade 2*. Ponta Grossa/PR, v. 2, Cap 10, p. 75-90, 2019.
- Knothe, G.; *Fuel Process. Technol.* 2005, 86, 1059.
- Knothe, G., Gerpen, J. V., Krahl, J., Eds.; **American Oil Chemists' Society Press: Champaign, The Biodiesel Handbook**; IL, 2005.
- KOH, M. Y.; GHAZI, T. I. M. **A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 2240-2251, 2011.
- KRAMER, P.J.; KOZLOWSKI, T.T. **Fisiologia da árvore.** Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 1979. 745 p.
- LEAL, P. F. et al. **Functional properties of spices extracts obtained via supercritical fluid extraction.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.
- LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO Y.; *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 250.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. **Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy.** *Current protocols in food analytical chemistry (CPFA)*. New York: John Wiley & Sons. p. F4.3.1-F4.3.8. 2001.
- LÔBO, I. P., FERREIRA, S. L. C., CRUZ, R. S. **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos.** *Quim. Nova*, v 32, n 6, 1596 – 1608, 2009.
- LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005, 44, 5353.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction: Past and present panacea.** *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

- MACCARI, A.J.; SANTOS, A.P.R. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate.** MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.
- MAISETTA, G., BATONI, G., CABONI, P., ESIN, S.; RINALDI, A. C.; ZUCCA, P. **Tannin profile, antioxidante properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 19, n. 1, p1-12, 2019.
- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. **Antioxidant activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil.** *Food Chemistry*, v. 58, n. 3, p. 245-248, 1997.
- MARTINEZ-TOME, M. et al. **Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives.** *Journal of Food Protection*, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.
- MAZUCHOWSKI J. Z. **Manual da Erva-mate.** Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural - EMATER-PR. Curitiba, 1989. 104 p.
- MAZZAFERA, P. **Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake.** *Food chemistry*, v. 60, (1), p. 67-71, 1996.
- MAZZUTTI, S.; RIEHL, C. A. S.; IBAÑEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. **Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 119, p. 211–220, jan. 2017.
- MEREGALLI, M. M. **Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do araçá-vermelho (*psidium cattleianum sabine*).** Dissertação. Mestrado Engenharia de Alimentos. Erechim. 2017.
- MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. **Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 14, p. 5622–5632, jul. 2010.
- MIGUEL, M.G. **Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review.** *Molecules*, v. 15, p. 9252-9287, 2010.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments.** 8th. Ed. – New York, USA: John Wiley & Sons, 2013.
- MOTA, J. C.; ALMEIDA, M. M. de; ALENCAR, V. C. de; CURI, W. F. **Impactos e benefícios ambientais, econômicos e sociais dos biocombustíveis: uma visão global.** *Espírito Santo do Pinha/SP*, v. 6, n. 3, p. 220-242, set/dez 2009.
- MOURE, A. et al. **Natural antioxidants from residual sources.** *Food Chemistry*, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

- NAKAMURA, K.L. (2008). **Variabilidade genética e métodos de extração de metilxantinas e compostos fenólicos em erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense.
- NEWELL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal Medicines. A Guide for Health-Care Professionals**. The Pharmaceutical Press. London, 1996.
- NICÁCIO, A. E.; ROTTA, E. M.; BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; KIMURA, E.; VISENTAINER, J. V.; MALDANER, L. **Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS**. *Food Analytical Methods*, v. 10, n. 8, p. 2718–2728, 11 ago. 2017.
- NIELSEN, S. S. **Food Analysis**. 5. Ed. Springer: Indiana, 649 p. 2017.
- OHEM, N.; HÖLZL, J. **Some investigations on *Ilex paraguariensis* flavonoids and triterpenes**. *Planta Medica*, v. 54, n. 6, p. 576, 1998.
- OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*bixa orellana* L.)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- OLIVEIRA, R. S. de. **Avaliação da ação antioxidante de produtos naturais no biodiesel B100 (*Glycine max*)**. Toledo/PR, 2012.
- OLIVEIRA, R.S; SILVA, E.A; RODRIGUES, P.R.P; SOUZA, S.N.M. **Avaliação da ação antioxidante de produtos naturais no biodiesel B100 (*Glycine Max*)**. *ENGEVISTA*, Toledo, v. 16, n. 3, p. 410-419, set. 2014.
- PALLEROS, D. R. **Experimental Organic Chemistry**. Santa Cruz: John Wiley, 1999. 836 p.
- PALSIKOWISKI, P. **Avaliação de método de extração de compostos bioativos das folhas de pata de vaca (*Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*)**. Tese de Doutorado. Unioeste. 2020.
- 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.
- PHENOMENEX. **HPLC Column Protection Guide Version 0610**. Disponível em: <<http://phx.phenomenex.com/lib/gu54810610.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2019.
- PUROHIT, A. J.; GOGATE, P. R. **Ultrasound-assisted extraction of β - carotene from waste carrot residue: effect of operating parameters and**

- type of ultrasonic irradiation.** *Separation Science and Technology*, v. 50, n. 10, p. 1507–1517, 2015.
- RAMIĆ, M.; VIDOVIĆ, S.; ZEKOVIĆ, Z.; VLADIĆ, J.; CVEJIN, A.; PAVLIĆ, B. **Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 23, p. 360–368, 2015.
- RAMOS, L. P.; KUCEK, K.T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. **Biodiesel: Um Projeto de Sustentabilidade Econômica e Sócio, Ambiental para o Brasil.** *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.31, p.28-37, 2003.
- REISSMANN, C.B.; RADOMSKI, M.I.; QUADROS, R.M.B. **Chemical composition of *Ilex paraguariensis* St. Hill under different management conditions in seven localities of Parana State.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.42, n.2, p.187-194, 1999.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. **Structureantioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI A. V.; SCHUCHARDT, U.; *Quim. Nova* 2007, 30, 1374; Demirbas, A.; *Energy Convers. Manage.* 2003, 44, 2093.
- SAHIN, S., SAMLI, R. **Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology.** *Ultrasonic Sonochemistry*, v.20, p. 595–602, 2013.
- SANT'ANA L. D.; SALGUEIRO, F. B.; SOUSA, J. P. L. M.; CASTRO, R. N.; LIANDA, R. L. P. **Comparação dos Ensaios de DPPH, ABTS e FRAP para Estimar a Capacidade Antioxidante de Extratos de Méis Silvestres e de Laranjeira.** 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Florianópolis, 2011.
- SANTOS, K. A. **Estudo dos processos de extração do óleo de candeia (*Eremanthus erythropappus*) com fluidos pressurizados e solvente assistido por ultrassom.** Doutorado Eng. Química. Unioeste. 120 p. 2018.
- SANTOS, K. A.; FROHLICH, P. C.; HOSCHEID, J.; TIUMAN, T. S.; GONÇALVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, E. A. **Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 128, p. 323–330, 2017.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. *J Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 199.

- SHAIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** *Technomic Publishing*, 1995. p. 281-319.
- SHI, L. E.; ZHANG, Z.-L.; XING, L.-Y.; YANG, D.-D.; GUO, Y.-P.; GUO, X.-F.; ZHAO, L.-M.; TANG, Z.-X. **Antioxidants extraction by supercritical CO₂.** *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, n. 3, p. 300-308, 2011.
- SINGH, J. **Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal aromatic plants.** In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. ICS UNIDO, p. 67–82, 2008.
- SILVA, P. R. F. da; FREITAS, T. F. S. **Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível.** *Ciência Rural*, v. 38, n.3, p.843-851, mai-jun, 2008.
- SOUZA, C. R. F.; BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. **Optimization of the Extraction of Flavonoids Compounds from Herbal Material using Experimental Design and Multi-response Analysis.** *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 5, p. 682–690, 2007.
- SUVEGES, N. S. **Estudo da adição de produtos vegetais no biodiesel de canola e de girassol visando à estabilidade térmica e oxidativa.** 2014. Dissertação (Mestrado em Novos Materiais e Química Fina) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- SUVEGES, N. S.; SILVA, M. L. C. P. **Avaliação da estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de canola aditivado com extratos naturais.** Florianópolis/SC, 2014.
- SUVEGES, N. S.; SILVA, M. L. C. P. **Termogravimetria aplicada ao biodiesel de girassol aditivado com extratos naturais e antioxidante sintético.** Florianópolis/SC, 2014.
- TEKIN, K., AKALIN, M.K., ŞEKER, M.G. **Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design.** *Industrial Crops and Products*, v. 77, p. 954-960, 2015.
- VALDUGA, E. **Caracterização Química e anatômica da folha de Erva-Mate *Ilex paraguariensis* Saint Hillaire e de Algumas Espécies Utilizadas na Adulteração do Mate.** Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- VERONESE, A. **Contribuição ao estudo do mate.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1944, 213p.
- VIANA, A.P.B. **Avaliação antimicrobiana e efeito antioxidante de extratos naturais como aditivos no biodiesel B100.** Dissertação. Mestrado Bioenergia. Unioeste. 2020.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica – A vida em nível molecular.* Artmed Editora Ltda., 4º ed., Porto Alegre, 2014.

APÊNDICES

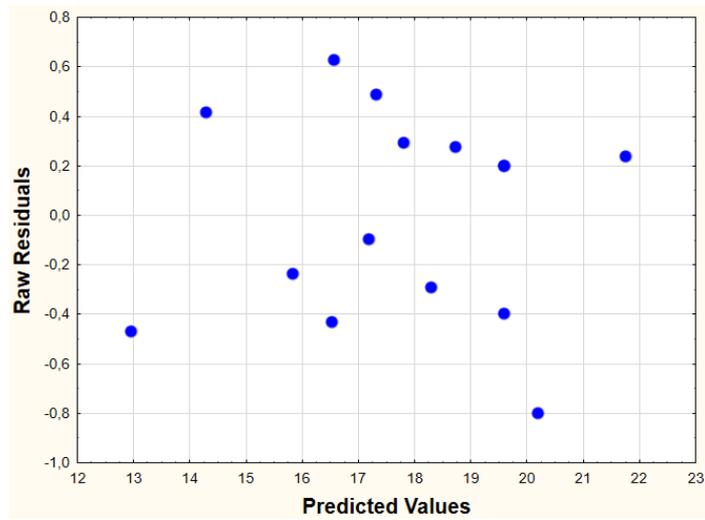


Figura A-1. Gráfico dos resíduos vs valores preditos do rendimento no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$).

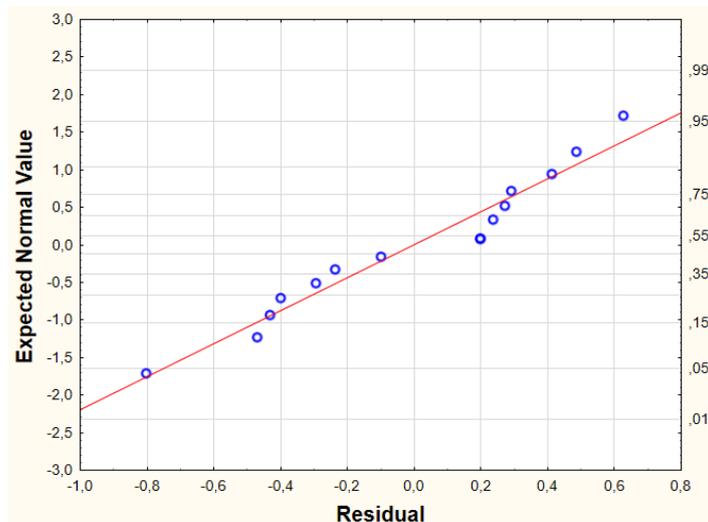


Figura A-2. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do rendimento no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$).

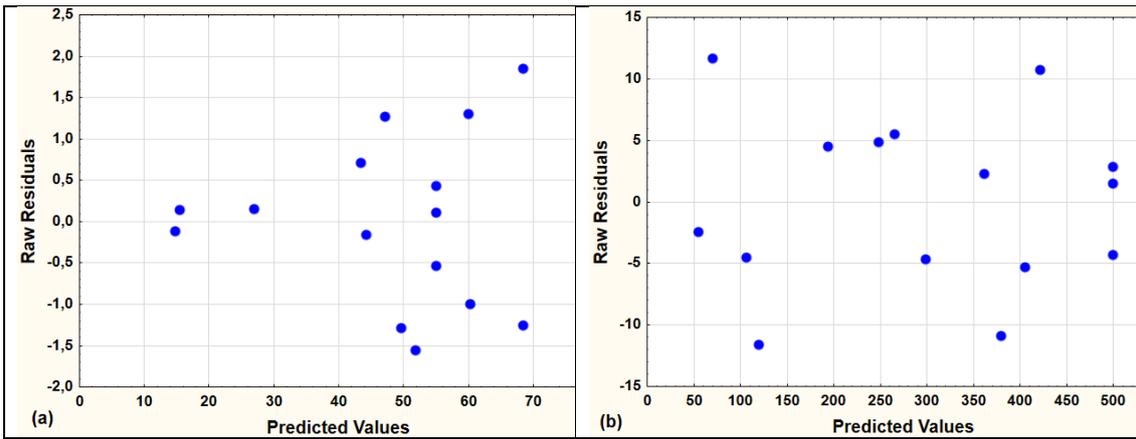


Figura A-3. Gráfico dos resíduos vs valores preditos do teor de (a) flavonoides totais (TFLT) e (b) fenólicos totais (TFET), no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$).

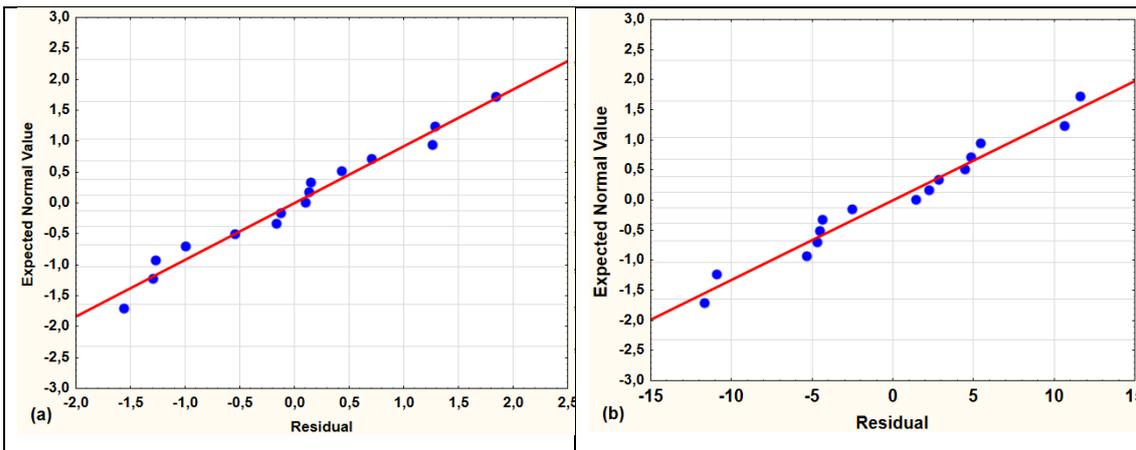


Figura A-4. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de (a) flavonoides totais (TFLT) e (b) fenólicos totais (TFET), no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$).

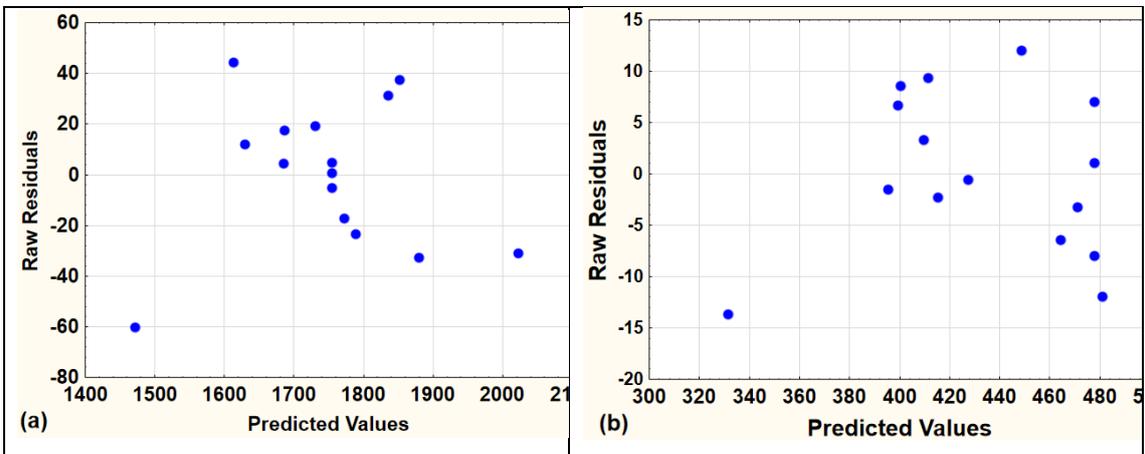


Figura A-5. Gráfico dos resíduos vs valores preditos do teor de (a) FRAP e (b) DPPH, no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$).

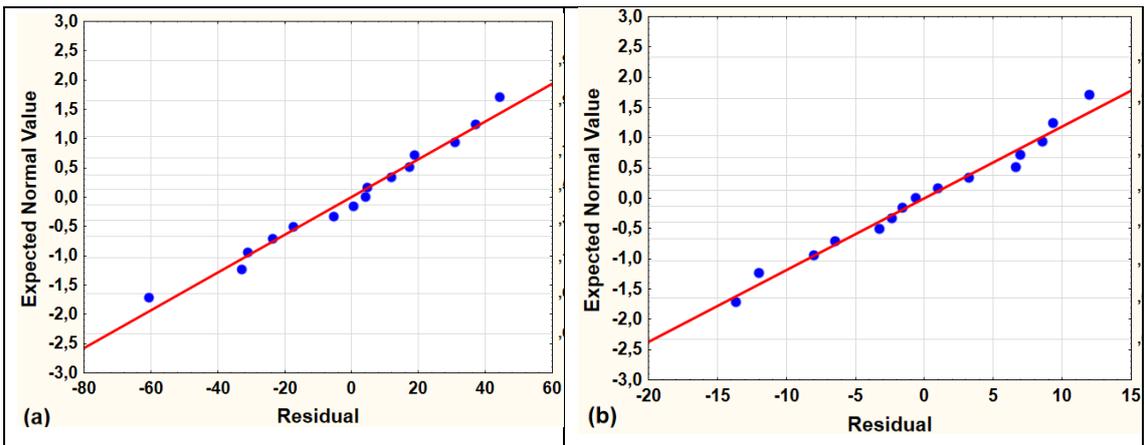


Figura A-6. Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de (a) FRAP e (b) DPPH, no planejamento Box-Behnken para a EAU ($\alpha = 0,05$).