



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DARLISSON SLAG NERI SILVA

**ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE β -CAROTENO E DA ESTABILIDADE
OXIDATIVA DO BODIESEL DE BURITI (*Mauritia flexuosa*)**

TERESINA-PI

2019

DARLISSON SLAG NERI SILVA

**ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE β -CAROTENO E DA ESTABILIDADE
OXIDATIVA DO BIODIESEL DE BURITI (*Mauritia flexuosa*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Analítica).

Orientadora: Profa. Dra. Naise Mary Caldas

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes de Castro

TERESINA-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S586e

Silva, Darlisson Slag Neri.

Estudo da concentração de β -caroteno e da estabilidade oxidativa do biodiesel de buriti (*Mauritia flexuosa*). / Darlisson Slag Neri Silva. – 2019.
71 f.: Il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Química, Teresina, 2019.

“Orientação: Profa. Dra. Naise Mary Caldas.”

“Coorientação: Prof. Dr. Adriano Gomes de Castro.”

1. Buriti-Biodiesel. 2. β -caroteno. 3. Centroide simplex. I. Título.

CDD: 634.774

DARLISSON SLAG NERI SILVA

**ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE β -CAROTENO E DA ESTABILIDADE
OXIDATIVA DO BIODIESEL DE BURITI (*Mauritia flexuosa*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Analítica).

Aprovada em: _____

Profa. Dra. Naise Mary Caldas (Orientadora e Presidente)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Samuel Anderson Alves De Sousa (Titular)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Francisco Cardoso Figueiredo (Titular)
Universidade Federal do Piauí

TERESINA-PI

2019

Dedico essa dissertação à minha família e a todos que
contribuíram com sua consolidação, direta e indiretamente

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço muito aos meus pais, Valdênia do Rêgo Neri e Silca e Domingos Arcanjo da Paz e Silva, por todo o amor, esforço e dedicação na minha criação, pelas vastas lições e conselhos durante momentos tortuosos da minha jornada.
- ✓ A minha irmã, Rhavane Silva, pelo carinho, brigas, amor e brigas novamente.
- ✓ A minha namorada, Andreza Rocha, por todo o amor, companheirismo e sobretudo pela compreensão. .
- ✓ A minha orientadora, profa. Dra. Naise Mary Caldas, por todos os ensinamentos, confiança, apoio, respeito e amizade.
- ✓ Ao meu co-orientador, prof. Dr. Adriano Gomes de Castro, pela ajuda em momentos difíceis, pela luz no fim do túnel, e pela amizade.
- ✓ Ao prof. Dr. Francisco Cardoso Figueiredo, por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda em momentos de sufoco e pela imensa contribuição.
- ✓ Ao prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira, por todos os ensinamentos, exemplos de humildade e educação ao longo do curso de graduação e pós-graduação.
- ✓ Ao prof. Dr. Samuel Anderson Alves De Sousa, por toda atenção e disponibilidade.
- ✓ Aos companheiros de trabalho Matheus Silva e Hudson Silva, por toda a ajuda durante esse processo.
- ✓ Aos meus amigos Tiago Linus, Ronaldo Coelho, Francislene Braga, Patrícia Oliveira, Mikael Kelvin, Juracir Brito, Tomas Magno e Luiz Brito por todos os momentos de descontração proporcionados ao longo desses anos.

- ✓ A todos os colegas de laboratório membros dos grupos GRIAPA e GEBio.
- ✓ Ao grupo de Bioeletroquímica da UFPI por todo o suporte e em especial a Natália e ao amigo de graduação e pós-graduação Marlo Caetano, pela amizade e apoio.
- ✓ Ao amigo, Fernando Reis, pela troca de conhecimento e pelos valiosos mLs de óleo de buriti.
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPI pela infraestrutura e as instituições de fomento, CAPES, CNPq e FAPEPI.
- ✓ E a todos que não foram citados, mas que contribuíram com a realização deste trabalho.

“Nós somos feitos de poeira de estrelas”

Carl Sagan

RESUMO

O biodiesel é um biocombustível obtido por meio da reação transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool em meio a um catalisador. Entre as desvantagens relativas a utilização do biodiesel, tem-se a baixa estabilidade oxidativa, que, contudo, pode ser contornada com a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais. O β -caroteno, um antioxidante natural, apresenta-se em altas concentrações no buriti (*Mauritia flexuosa*) e pode contribuir para o aumento da estabilidade do biodiesel obtido desse fruto. Diante o exposto, objetivou-se neste trabalho, avaliar a concentração de β -caroteno presente durante o processo de produção do biodiesel de buriti, bem como o estudo da estabilidade oxidativa pelo método de Rancimat. Visando obter a melhor condição para a extração do β -caroteno, dois métodos de extração foram propostos, a extração convencional (EC) foi realizada com o auxílio de agitação mecânica e a extração assistido por ultrassom (EAU). A avaliação do melhor tipo de solvente extrator (acetona, etanol, metanol e acetonitrila) foi realizada com cerca de 0,1 g de polpa submetida ao planejamento de misturas centroide simplex com 10 mL de solução extratora, com agitação de 250 rpm por 15 min e, posterior centrifugação a 3500 rpm por 10 min a extração assistida por ultrassom foi desenvolvida de maneira similar, com 15 min sob influência da radiação e posterior centrifugação, o sobrenadante foi coletado e teor de β -caroteno lido por UV-Vis. A medida da estabilidade oxidativa do biodiesel foi conduzida de acordo com a norma EN 14112 empregando o equipamento Rancimat, nas temperaturas de 110, 120 e 130 °C. Os resultados dos experimentos propostos pelo planejamento foram estudados pelo modelo linear, quadrático e cúbico especial. O modelo cúbico especial não apresentou falta de ajuste e foi o que melhor descreveu os experimentos, explicando cerca de 98,40 % da variância dos dados para a EC e de 98,2% para a EAU, a energia ultrassom teve influência positiva na extração do antioxidante em que, a melhor condição de extração foi obtida pelo método EAU, com o modelo cúbico especial propondo a condição ótima para extração a mistura de 75% acetona e 25% etanol. O processo de transesterificação metílica não influenciou significativamente no teor de β -caroteno presente no óleo e no biodiesel de buriti, com valores de $3,95 \pm 0,24 \text{ mg g}^{-1}$ e $3,49 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente. Com realização do teste da estabilidade acelerada pelo método de Rancimat, conclui-se que biodiesel de buriti apresenta

elevado ponto de indução a 110 °C (49,39 h), além de uma vida de prateleira a 25 °C estimada em 2,81 anos. O óleo de buriti, quando submetido ao teste em Rancimat, em condições iguais ao biodiesel, nas temperaturas de 130 e 120 °C apresentou TI de 11,72 e 21,13 h; próximo aos valores encontrados para o biodiesel (11,50 e 24,22 h).

Palavras-chave: buriti; carotenoides; β -caroteno; centroide simplex; antioxidantes; biodiesel.

ABSTRACT

Biodiesel is a biofuel obtained through the transesterification reaction of vegetable oils or animal fat with alcohol in the medium of a catalyst. Among the disadvantages related to the use of biodiesel is the low oxidative stability, which, can be overcome by the addition of synthetic or natural antioxidants. β -carotene is a natural antioxidant, present in high concentrations in buriti (*Mauritia flexuosa*) and may contribute to increase the stability of the biodiesel obtained from this fruit. Therefore, the objective of this work was to evaluate the β -carotene concentration present in the buriti biodiesel production process, as well as the study of oxidative stability by the Rancimat method. In order to obtain the best condition for the extraction of β -carotene, two extraction methods were proposed, conventional extraction (CE) was performed with the aid of mechanical agitation and ultrasonic assisted extraction (UAE). The evaluation of the best type of extractive solvent (acetone, ethanol, methanol and acetonitrile) was carried out with about 0.1 g of pulp submitted to the simplex centroid design, with 10 mL of extractive solution, with agitation of 250 rpm for 15 min and subsequent centrifugation at 3500 rpm for 10 min. The ultrasonic assisted extraction was developed, with 15 min under influence of the radiation and subsequent centrifugation, the supernatant was collected and β -carotene content read by UV-Vis. The measurement of oxidative stability of biodiesel was conducted according to EN 14112 using Rancimat equipment at temperatures of 110, 120 and 130 ° C. The linear, quadratic and special cubic model studied the results of the experiments proposed by the planning. The special cubic model presented no lack of fit and was the one that best described the experiments, explaining about 98.40% of the data variance for the CE and 98.2% for the UAE. Ultrasonic energy had a positive influence on the extraction of the antioxidant in which the best extraction condition was obtained by the UAE method, with the special cubic model proposing the optimum condition for the extraction of the mixture of 75% acetone and 25% ethanol. The methyl transesterification process did not significantly influence the content of β -carotene present in the oil and buriti biodiesel, with values of 3.95 ± 0.24 mg g⁻¹ and 3.49 ± 0.08 mg g⁻¹, respectively. With the realization of the stability test accelerated by the Rancimat method, it is concluded that buriti biodiesel presents high induction point at 110 ° C (49.39 h), in addition to a shelf life at 25 ° C estimated at 2.81 years. Buriti oil, when subjected to the Rancimat test, under

conditions equal to biodiesel, at temperatures of 130 and 120 ° C, presented TI of 11.72 and 21.13 h; close to the values found for biodiesel (11.50 and 24.22 h).

Keywords: buriti; carotenoids; β -carotene; simplex centroid design; antioxidants; biodiesel.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 1: Otimização da extração de β -caroteno da polpa de Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>).....	4
1 OBJETIVO	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	5
2.1.1 Palmeira do Buriti.....	5
2.1.2 Fruto da Palmeira de Buriti.....	6
2.2 Pigmentos Naturais.....	7
2.2.1 Carotenoides.....	7
2.2.2 β -caroteno.....	11
2.3 Métodos para a extração de carotenoides.....	14
2.4 Quantificação de carotenoides.....	16
3 Procedimento Experimental	17
3.1 Amostras.....	17
3.2 Reagentes e Soluções.....	17
3.3 Otimização da extração de β -caroteno da polpa de buriti.....	18
3.4 Quantificação do β -caroteno.....	19
3.5 Análise estatística dos dados.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Otimização do método de extração de β -caroteno empregando planejamento centroide simplex.....	20
5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	32
Capítulo 2 - Estabilidade oxidativa do biodiesel de Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>) pelo método de Rancimat.....	33
1 OBJETIVO	34
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1 Combustíveis fósseis.....	34
2.2 Biodiesel.....	35
2.2.1 Processos de síntese do biodiesel.....	36
2.2.2 Histórico do Biodiesel no Brasil.....	38
2.3 Matérias-primas para a produção de biodiesel.....	39
2.4 Antioxidantes.....	41
2.4.1 Antioxidantes sintéticos.....	42
2.4.2 Antioxidantes Naturais.....	43
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
3.1 Amostras.....	45
3.2 Reagentes e Soluções.....	45
3.3 Síntese do biodiesel.....	45
3.3 Quantificação do teor de β -caroteno no óleo e no biodiesel de buriti.....	46
3.4 Avaliação da estabilidade do biodiesel.....	46
3.5 Análise cromatográfica.....	46

3.6 Caracterização do Biodiesel.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Propriedades físico-químicas do óleo e do biodiesel de buriti.....	48
4.2 Teor de β -caroteno presente no óleo e no biodiesel de buriti.....	50
4.3 Tempo de indução (TI).....	52
5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planejamento de misturas para a extração de β -caroteno.....	18
Figura 2. Gráfico dos valores experimentais vs valores previstos para a extração convencional (A) e assistida por ultrassom (B).....	25
Figura 3. Histograma de resíduos vs frequência para a extração convencional (A) e assistida por ultrassom (B).....	26
Figura 4. Comparação entre os teores de β -caroteno extraído para a extração convencional (EC) e assistida por ultrassom (EAU).....	27
Figura 5. Superfície de contorno para o modelo cúbico especial, onde a concentração de β -caroteno é predita em função da razão entre os solventes acetona:etanol:acetonitrila.....	29
Figura 6. Mecanismo de reação para a catálise básica (A) e ácida (B). Adaptado de Aransiola <i>et al.</i>	38
Figura 7. Produção de óleos vegetais e tendências regionais brasileiras.....	40
Figura 8. Teor de β -caroteno presente no óleo e no biodiesel de buriti.....	51
Figura 9. (A) TI para o biodiesel de buriti utilizado neste trabalho a 110 °C. (B) Gráfico para o ln do TI vs temperatura.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento centroide simplex com as porcentagens de solventes utilizados para a extração de β -caroteno da polpa de buriti para a extração convencional (EC) e a extração assistida por ultrassom (EAU).....	20
Tabela 2. Resumo das figuras de mérito obtidas a partir de modelos polinomiais otimizados para o estudo da extração de β -caroteno da polpa de buriti.....	22
Tabela 3. Anova para o modelo cúbico especial.....	23
Tabela 4. Equações polinomiais para os modelos matemáticos em que y é a concentração de β -caroteno extraído da polpa de buriti.....	24
Tabela 5. Valores de E_t (30) para os solventes avaliados neste trabalho.....	30
Tabela 6. Concentrações de β -caroteno em amostras frescas reportadas na literatura para matrizes vegetais.....	31
Tabela 7. Propriedades físico-químicas do biodiesel utilizado neste trabalho...	48
Tabela 8. Tempo de indução e vida de prateleira para o óleo e o biodiesel de buriti.....	53
Tabela 9. Estabilidade oxidativa para e percentual de ácidos graxos insaturados para diferentes biodieseis.....	55

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância, do inglês *Analysis of Variance*

ANP: Agência Nacional de Petróleo

AOCS: Sociedade Americana de Químicos de Petróleo, do inglês American Oil Chemists 'Society

ASTM: Sociedade Americana de Testes e Materiais do inglês *American Society for Testing and Materials*

BHA: Butil-hidroxi-anisol

BHT: Butil-hidroxitolueno

EAU: Extração assistida por ultrassom

EC: Extração convencional

EN: Comitê Europeu de Normalização

GP: Gaiato de propilo

IA: Índice de acidez

II: Índice de iodo

IP: Índice de peróxido

IS: Índice de saponificação

OMS: World Health Organization

PA: Pirogalhol

R: Regressão

r: Resíduo

R²: Coeficiente de determinação

TBHQ: Terc-butil-hidroquinona

1 INTRODUÇÃO

Os impactos no meio ambiente provocados pelo uso de combustíveis fósseis motivaram a busca de novas fontes de energia obtidas a partir de matérias-primas renováveis [2,3]. O biodiesel é um combustível renovável e biodegradável obtido a partir da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool em meio a um catalisador adequado. Diferentemente dos combustíveis convencionais que são relativamente inertes, o biodiesel passa por um processo de degradação mais acelerado, que com o tempo pode mudar suas características [1]. Assim, garantir que o produto final esteja em conformidade com os padrões de comercialização tem sido uma grande preocupação para os produtores de biodiesel.

O óleo de soja é atualmente a principal matéria-prima para a produção de biodiesel [4], todavia, devido a sua composição majoritária de ácidos graxos insaturados (linoleico, oleico e linolênico) apresenta baixa estabilidade oxidativa, ocasionando a formação de peróxidos [5] o que dificulta o armazenamento e diminui a eficiência [6]. Em geral, o processo de oxidação do biodiesel ocorre em três etapas, primeiro, tem-se a etapa de indução, onde os radicais livres reagem primeiramente com os compostos antioxidantes, em vez dos ésteres metílicos de ácidos graxos, na segunda etapa, cerca de 80-90% dos antioxidantes foram consumidos e o oxigênio ataca os ésteres metílicos, na última etapa, a degradação do peróxido excede a taxa de formação e qualidade do biodiesel diminui significativamente [3,7].

As posições alílicas à duplas ligações são mais vulneráveis a ocorrência da oxidação. Os ácidos graxos com ligações duplas interrompidas por metileno, como por exemplo, ácido linoleico (C18:2), são mais favoráveis à oxidação, pois contêm grupos metileno que são alílicos à duas ligações duplas [6]. O ácido linolênico (C18:3) é ainda mais suscetível à oxidação, pois apresenta dois grupos metileno entre duplas ligações. Tudo isso torna o biodiesel relativamente instável durante o armazenamento e os produtos residuais formados a partir da degradação, podem causar problemas no motor, como entupimento e corrosão das partes metálicas [5,8]. É por isso que a estabilidade oxidativa é um critério importante para um biodiesel de qualidade.

Por meio da eliminação das condições que promovem a oxidação ou pela adição de antioxidantes é possível retardar a degradação do biodiesel evitando a ocorrência de reações químicas indesejáveis [9]. Os antioxidantes sintéticos são os

mais utilizados na indústria alimentícia, cosmética e de combustíveis, entre os mais empregados estão o Butil-hidroxitolueno (BHT), Butil-hidroxi-anisol (BHA), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), galato de propilo (GP) e pirogalhol (PA), porém entre as desvantagens da utilização desses compostos está de reações alérgicas no organismo humano e a elevada toxicidade advinda da utilização dos naftóis [10,11].

Os antioxidantes ocorrem naturalmente em óleos vegetais; os mais comuns são tocoferóis, alguns ácidos orgânicos, como ácido cítrico, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides e os carotenoides [5,12]. Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas colorações amarelo, laranja e vermelho, sintetizados por algas, plantas e bactérias fotossintéticas, apresentam atividade antioxidante e contribuem para a redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares e degenerativas, dentre suas funções nutricionais, destaca-se a de ser precursor da vitamina A. Os compostos que abrangem tais substâncias são os isoprenóides que possuem dupla ligação carbono-carbono e formam uma estrutura conhecida como cromóforo [13].

O β -caroteno ($C_{40}H_{56}$), um carotenoide cíclico, é largamente utilizado na indústria alimentícia para retardar o processo de oxidação dos alimentos. É um hidrocarboneto lipofílico altamente conjugado em que as onze ligações duplas, duas das quais estão localizadas nos anéis β , atuam como grupo cromóforo na molécula, sendo responsável pela absorção de luz, observa-se que a máxima proteção é dada por aqueles que têm nove ou mais ligações duplas. O β -caroteno está presente nos legumes, como a cenoura, na manga, acerola e em frutos da família Palmae/Arecaceae [14].

Dentre os frutos da família Arecaceae, o buriti (*Mauritia flexuosa*), planta nativa do Brasil, tem a região nordeste como principal produtora, sendo responsável por cerca de 70% da produção brasileira, o buriti é utilizado na alimentação na forma de doces, sucos e licor [15]. O óleo extraído do fruto do buriti apresenta elevada concentração de carotenoides, principalmente o β -caroteno o que propicia uma matéria prima rica em antioxidantes naturais e com potencialidade para aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e para a produção de biodiesel com elevada estabilidade oxidativa [16–18].

De acordo com a literatura, os ésteres altamente saturados perdem sua estabilidade rapidamente quando contém baixo nível de antioxidantes [19]. Os carotenoides, naturalmente presentes nos óleos vegetais, ajudam a proteger os óleos

contra a oxidação induzida pelo contato com o ar, com a luz ou o ocasionado por altas temperaturas, porém, a maioria desses antioxidantes naturais pode ser perdida na reação de transesterificação ou durante o processo de lavagem do Biodiesel [12,20].

Em face a problemática relativa a estabilidade dos biocombustíveis, objetivou-se nesse trabalho avaliar a concentração de β -caroteno presente na etapa de produção do biodiesel de buriti, bem como o estudo da estabilidade oxidativa pelo método de Rancimat de acordo com a normativa EN 14112.

Capítulo 1

Otimização da extração de β -caroteno da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*)

1 OBJETIVO

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo consiste no estudo da otimização da extração por solventes de β -caroteno na polpa fresca de buriti empregando planejamento de misturas, e avaliação dos métodos de extração convencional (EC) e a extração assistida por ultrassom (EAU).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Buriti (*Mauritia flexuosa*)

2.1.1 Palmeira do Buriti

A floresta tropical amazônica inclui as áreas mais ricas em biodiversidade do mundo, incluindo um grande número de recursos alimentares com interessantes moléculas biologicamente ativas. A palmeira do buriti é nativa da América do Sul sendo abundante na região da Amazônia, é conhecida pelos nomes de buriti, buriti-do-brejo, carandaí-guaçu, coqueiro-buriti, palmeira-dos-brejos, buritizeiro, meriti e miriti. Tal palmeira se desenvolve em terrenos baixos com grande oferta de água, como nas margens de rios, áreas brejosas ou permanentemente inundadas, formando aglomerados de árvores chamados de buritizais que são predominantes na região Norte do Brasil e encontrados no estado do Maranhão, Piauí, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Minas Gerais e Mato Grosso [21].

A palmeira do buriti apresenta características botânicas notáveis, podendo atingir 34 a 40 m de altura, apresentam crescimento lento e uma grande longevidade em que árvores com mais de 10 m podem ter entre 100 a 400 anos. Espécimes adultos apresentam uma coroa esférica com grandes folhas compósitas em formato de leque que podem atingir 6 m de comprimento [22]. Tal espécie é chamada de “árvore da vida” pelos povos indígenas e é totalmente aproveitada por comunidades em áreas de extração. Sua safra vai de dezembro a julho e tem um rendimento máximo no mês de abril. Cada palmeira de buriti produz uma média de oito flores, e cada flor produz aproximadamente 500 frutas com uma produção média de 290 kg por palmeira por

ano, resultando com cada hectare de aglomerados de buritizais fornecendo cerca de 23 toneladas de frutos por ano podendo ter um rendimento de 380 kg de óleo [23].

2.1.2 Fruto da Palmeira de Buriti

O fruto da palmeira de buriti é conhecido como buriti (*Mauritia flexuosa*) ou coco buriti e pertence à família Aracaceae, é composto por cerca de 20% de epicarpo (pele ou casca), 10% a 20% de mesocarpo (polpa), 15% a 20% de endocarpo (revestimento que protege a semente) e 40% a 45% de sementes, contendo até três sementes por fruto [24]. Tem também a característica de ser uma fruta pequena com cerca de 4 cm a 7 cm de comprimento e entre 3 cm a 5 cm de diâmetro, com um peso que varia de 25 g a 40 g [21,22]

O epicarpo dessa fruta é formado por pequenas escamas de coloração castanho-avermelhada apresentando rica concentração de β -caroteno, o seu mesocarpo é uma fina camada comestível que possui uma coloração amarelo-alaranjada que também tem um alto teor de β -caroteno, um sabor agridoce e uma consistência gordurosa. Essa camada de polpa é amplamente consumida na forma in natura, em formas processadas de sucos, doces, sorvetes, geleias, vinhos e óleos [16,21].

Dentre todas as camadas do fruto do buriti, a polpa apresenta elevados teores de nutrientes importantes, compostos fenólicos totais, vitaminas, minerais, fibras dietéticas solúveis e insolúveis e carotenoides, são exemplos de compostos com aplicações relevantes para a indústria de alimentos, fármacos e cosméticos que estão presentes em abundância na polpa do buriti [25]. Na indústria cosmética, o buriti é utilizado na formulação de protetores solares, cremes e óleos para o tratamento da pele. O óleo extraído do fruto do buriti é popularmente usado contra queimaduras, como um potente vermífugo [22]. Essas atividades são atribuídas principalmente aos carotenoides e tocoferóis, principais compostos do óleo [25].

Em relação ao teor de carotenoides no buriti, em um estudo comparativo entre diferentes frutos do cerrado brasileiro como o araçá (*Psidium guineense*), buriti (*Mauritia flexuosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), cajá (*Spondias mombin*), mangaba (*Hancornia speciosa*) e marolo (*Annoa crassiflora*), o buriti apresentou o maior teor de carotenoides, com cerca de 2,85 mg de licopeno e 4,65 mg de β -caroteno em 100 g

de sua polpa respectivamente. No entanto, a concentração de todos esses compostos pode variar consideravelmente devido aos diferentes tipos de cultivo, clima e solo em que são produzidos e também pela forma de processamento e conserva [25].

Diante disso, o buriti é uma importante fonte natural de tais compostos bioativos e principalmente do β -caroteno, isso porque, tal matriz alimentar apresenta grandes concentrações desse carotenoide. Assim, como o β -caroteno possui inúmeras aplicações para alimentos, fármacos e cosméticos, a polpa do buriti tornou-se alvo de estudos para sua utilização em métodos de extração do β -caroteno e os demais compostos nutrientes e antioxidantes [16,23].

2.2 Pigmentos Naturais

Os pigmentos estão entre as classes de compostos químicos mais importantes, apresentando diversas cores e funções nos mais variados organismos, as principais classes de pigmentos são as clorofilas, carotenoides, flavonoides e as betalaínas. Cada classe possui uma estrutura química básica e a partir de variações estruturais nessas unidades, tem-se a formação de subprodutos, que diferem em coloração e funções biológicas. Devido à intensa coloração nos vegetais, esses compostos estão relacionados atração de animais para a polinização das flores e a dispersão de sementes, são também responsáveis pela coleta de luz durante a fotossíntese, a proteção contra danos fotooxidativos e a regulação do desenvolvimento [26]. Os pigmentos também são conhecidos por terem benefícios nutracêuticos (suplementos alimentares) funcionando em sua maioria como nutrientes essenciais e provitamínicos [27,28].

2.2.1 Carotenoides

Entre as classes de pigmentos naturais, os carotenoides destacam-se pela intensa coloração que varia entre amarelo e vermelho, esses compostos são sintetizados por algas, plantas e bactérias fotossintéticas [29,30]. Essa classe de pigmentos foi reconhecida como um grupo de compostos químicos em 1831 por Wackenroder, que isolou um pigmento amarelo-alaranjado em cenouras, sendo

denominado por ele de *carotin* e posteriormente chamado de caroteno, derivado do nome científico *Daucus carote*, referente a cenoura [31].

Tais pigmentos auxiliam a clorofila na fotossíntese, pois absorvem em diferentes comprimentos de onda, ampliando a capacidade do aproveitamento da luz no processo, além de proteger o aparato fotossintético pelo fato de absorver o excesso de radiação [30]. Dessa forma, os carotenoides participam da coleta de luz, cumprem uma função fotoprotetora, fornecem proteção antioxidante em estruturas lipídicas e desempenham papéis na sinalização e regulação via hormônios apocarotenoides [32,33].

Em relação a sua distribuição na natureza, existe uma grande variedade desses compostos, em que, mais de 800 compostos bioativos pertencentes a esse grupo já foram encontrados [34,35]. Tal diversidade é explicada pelos vários processos que são realizados para a formação dos carotenoides, dentre eles está a ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, o encurtamento da cadeia, rearranjo, isomerização, a introdução com funções de hidrogênio ou a combinação de todos esses [36].

Essa classe de pigmentos é definida quimicamente como isoprenóides lipofílicos, apresentando uma cadeia de hidrocarbonetos de polieno com 40 átomos de carbonos, com alternância entre ligações duplas e simples entre os carbonos. Devido as duplas ligações conjugadas, tal estrutura é responsável por suas formas moleculares, sua reatividade química e as propriedades influenciadas pela luz [28,29]. De acordo com a composição de cada estrutura, os carotenoides podem ser classificados em acíclico, monocíclico e bicíclico considerando o número de anéis presentes na estrutura molecular. Quando são analisados os átomos que compõem a molécula, os carotenoides podem ser divididos em dois grupos, os carotenos que não apresentam átomos de oxigênio e as xantofilas, quando o princípio de análise é o número de átomos, são denominados de triterpenos (trinta átomos de carbono correspondente a três unidades de isoprenoides) e tetraterpenos (quarenta átomos de carbono correspondente a quatro unidades de isoprenoides), sendo que mais de 95% dos carotenoides conhecidos são tetraterpenos [37–39].

A classificação dos carotenoides feita com base nos átomos presentes na estrutura da molécula, carotenos e xantofilas, é a mais difundida. Os carotenos não apresentam grupo funcional e possuem um composto de hidrocarboneto simples com

uma fórmula molecular de $C_{40}H_{56}$, como por exemplo, o α -caroteno, o β -caroteno e o licopeno. As xantofilas, apresentam fórmula molecular $C_{40}H_{56}O_2$ ou $C_{40}H_{56}O$ de modo que, são derivados oxigenados dos carotenos e contêm um ou dois átomos de oxigênio dentro dos grupos hidroxil, epóxi, ou ceto, como a luteína, a zeaxantina e a violaxantina [28,36].

As conjugações promovem a deslocalização dos elétrons π , que atuam como cromóforo absorvedor de luz. Dessa forma, o tamanho do cromóforo é determinante para o espectro absorção e coloração do carotenoide, como os característicos tons de amarelo, laranja e vermelho [36,40]. Devido à presença de conjugações, esses compostos podem sofrer reações de isomerização *cis-trans*, o que influencia diretamente em suas funções, de modo que, as formas isoméricas desses compostos apresentam atividades químicas diferentes. Além disso, tal sistema de duplas ligações presentes na estrutura dos carotenoides manifesta a capacidade de desativar radicais livres, conseqüentemente, apresentam atividade antioxidante [41,42].

Os carotenoides, principalmente o β -caroteno, podem ser convertidos em vitamina A, que é essencial para a visão, o desenvolvimento e a imunidade dos animais e seres humanos. Esses tipos de carotenoides são chamados de provitamina A e também são conhecidos pelo alto poder antioxidante, sendo este fator responsável por preservar alimentos por mais tempo, neutralizar radicais livres nos organismos e serem usados como antioxidantes em produtos diversos, isso porque, a sua estrutura de ligações duplas conjugadas torna possível que ele deslocalize elétrons desemparelhados [37,41,43].

Além disso, inúmeros mecanismos como, supressão do oxigênio singlete, captura de radicais peróxido, modulação da expressão gênica e tradução de proteínas, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinoides, estimulação da comunicação entre células, aumento da resposta imune, filtragem de luz azul e modulação do metabolismo de carcinogênicos e a da biologia dos adipócitos são propostas para os efeitos promotores de saúde que os carotenoides possuem [26,44].

Devido à cadeia apolar de hidrocarbonetos, os carotenoides, possuem pouca ou quase nenhuma solubilidade em água, porém, apresentam uma solubilidade significativa em solventes orgânicos. Desse modo, atuam como protetores das membranas celulares de seres autotróficos por serem áreas hidrofóbicas e como o

núcleo interno das membranas. Grupos funcionais polares, como os presentes nas xantofilas, alteram a polaridade dos carotenoides e afetam suas interações com outras moléculas, considerando também que, o tamanho total e a forma da molécula possuem uma relação importante com as propriedades e funções desses compostos [26,34,45].

Existem carotenoides que contêm menos de 40 átomos de carbono em sua estrutura e são denominados apocarotenoides (átomos de carbono perdidos das extremidades C40) ou norcarotenoides (átomos de carbono perdidos dentro da cadeia C40). Tais alterações na sua cadeia é resultante da degradação oxidativa ao nível dos anéis terminais, oriunda de mecanismos indefinidos como lipoxigenase e foto-oxidação, ou, por mecanismos específicos como dioxigenases [29,36].

Esses carotenoides oxigenados realizam contribuições importantes para o sabor e a qualidade nutricional de vários tipos de alimentos, como frutas, chá e vinho. Possuem também importância econômica como pigmentos e aromatizantes em alimentos e atuam como sinalizadores visuais ou voláteis para atrair agentes polinizadores, além de servirem como mecanismos de defesa das plantas. Existem também apocarotenoides que são encontrados no espinafre e em frutas cítricas que são usados em produtos farmacêuticos, cosméticos e em aditivos como o E160e que é legalizado pela União Europeia [33].

A maioria dos carotenoides absorve no máximo três comprimentos de onda entre o intervalo de 400 e 480 nm, resultando em três picos de absorção máxima. Tais pigmentos requerem no mínimo sete ligações duplas conjugadas para que tenham uma cor perceptível e, por isso, quanto maior for o número de ligações desse tipo, maiores serão os valores de λ_{max} [26,36].

Com relação à obtenção de carotenoides, é constatado que cerca de 90% desses compostos são adquiridos a partir de frutas e vegetais, devido as diferentes concentrações desses compostos nas suas matrizes, há uma variedade de cores características amarelas, laranjas e vermelhas em cenouras (*Daucus carota*), buritis (*Mauritia flexuosa*), tomates (*Solanum lycopersicum*), maçãs (*Malus domestica*) entre outras [26,44,46]. O processo de maturação é o fator que mais influência na concentração desses compostos nas frutas, em que, ocorre o aumento significativo do teor após o amadurecimento, ou, ocorre a diminuição dessa taxa de carotenoides após tal período. A temperatura e o a intensidade de luz recebida também interfere

diretamente na quantidade dos carotenoides em suas matrizes, sendo o clima, o solo e a forma de cultivo os agentes determinantes para isso [34,36].

Os carotenoides estão sujeitos à isomerização, uma vez que por meio da ação da temperatura, da luz, de ácidos e da adsorção em uma superfície ativa, como a alumina, ocorre a mudança de configuração *trans*, configuração usual, para a configuração *cis*. Devido isso, ocorrem perdas significativas das cores provenientes desses pigmentos e queda nas suas funções como provitamina A e em suas propriedades antioxidantes [47,48].

Considerando a instabilidade térmica dos carotenoides, em um estudo realizado em diferentes matrizes alimentares como espinafre, repolho, couve primavera, manga, pimentão, feijão vermelho, abóbora, batata doce, cenoura e tomate, mostrou que o teor de carotenoides, principalmente o β -caroteno, é reduzido entre 20% - 75% da concentração inicial em situações de desidratação (secagem com ar quente a 65 °C), por cozimento em altas temperaturas (120 °C), em condições de congelamento (a -30 °C) e liofilização (a 30 °C no período de 1, 2 e 3 meses). No entanto, armazenamentos a temperaturas inferiores a 3 °C, em um período de 3 meses, causa uma redução de 10% da quantidade de β -caroteno [26,47,49].

2.2.2 β -caroteno

O β -caroteno é um pigmento natural membro da família dos carotenoides e pertencente ao subgrupo dos carotenos [44,50]. Além de sua atividade como corante, ele é o carotenoide mais importante em relação a atividade provitamina A, em que, a enzima monooxigenase divide a molécula de β -caroteno em duas moléculas de vitamina A, sendo isso possível devido a sua estrutura molecular conter anéis β -ionona (trimetil-ciclohexano conjugado) não substituídos que são ligados à cadeia lateral poliênica que é rica em ligações duplas conjugadas [51,52].

A vitamina A (retinol) é um micronutriente crucial para a visão, além de promover o desenvolvimento, sendo fundamental para a proteção da integridade do epitélio e do muco. Nos seres humanos, a maior parte de β -caroteno que é absorvida pela mucosa duodenal é convertida em retinol e em sequência o retinol é transformado, pelo metabolismo, em ésteres de retilina no enterócito e atinge o fígado através da linfa. Tal conversão também pode ocorrer em tecidos de diferentes órgãos,

tais como o fígado, pulmão e rins. O β -caroteno é transportado no plasma por lipoproteínas e é estocado principalmente no tecido adiposo e no fígado [53].

Esse pigmento natural é classificado como um composto hidrocarboneto lipofílico conjugado altamente apolar, explicando assim sua natureza hidrofóbica e sua difícil incorporação em alimentos à base de água, sendo por isso, alvo de estudos de encapsulação como nanopartículas poliméricas para proporcionar uma boa solubilização e otimizar sua utilização na indústria [28,50]. Esse tipo de composto apresenta baixa biodisponibilidade na forma cristalina, contém uma alta reatividade e é sensível ao calor, luz e oxigênio [50,51]. Em sua estrutura ele possui um grupo cromóforo que se deve às onze ligações duplas conjugadas, que são responsáveis pela absorção de luz e pela coloração desse composto. Por causa disso, o β -caroteno apresenta espectro UV-Vis característico, tendo maior absorbância no comprimento de onda entre 450 a 455 nm, sendo que a máxima absorção depende da configuração da molécula, bem como das mudanças nas energias de transição entre o estado fundamental e excitado [26].

Os carotenoides reagem com os radicais livres por meio de três mecanismos: transferência de elétrons (reação 1), abstração de hidrogênio (reação 2) ou adição de espécies radicalares (reação 3) de acordo com a reação 1. Devido a sensibilidade ao oxigênio singlete e por ser bastante reativo, o β -caroteno apresenta poderosa atividade antioxidante, isso porque, a sua estrutura de ligações duplas conjugadas torna possível que ele deslocalize elétrons desemparelhados [42,43].

Reação 1. Possíveis reações entre carotenoides e radicais livres



Como exemplo disso, o β -caroteno é capaz de extinguir o oxigênio singlete, uma molécula reativa que pode ser gerada na pele por exposição à luz ultravioleta e que possui a capacidade de induzir alterações pré-cancerígenas nas células. Tal molécula reativa de oxigênio também é capaz de iniciar a geração de reações em de radicais livres (peroxila, hidroxila e superóxido) que são neutralizados pelo β -caroteno

contribuindo para a manutenção da integridade e fluidez das membranas celulares, de modo que, o β -caroteno inibe a peroxidação lipídica no interior dessas membranas [54].

Tal propriedade antioxidante apresenta grande importância para a manutenção da saúde humana porque espécies reativas do oxigênio (EROs) são produzidas endogenamente pelo metabolismo normal do ser humano, por atividade física e pela alimentação, e podem causar danos oxidativos por meio de uma reação em cadeia que culmina em efeitos deletérios. A exemplo disso, a reação de EROs com biomoléculas essenciais, como lipídios, proteínas e DNA, resulta em doenças crônicas não transmissíveis como as oculares, cardiovasculares e o câncer. Assim, antioxidantes provenientes de matrizes alimentares como o β -caroteno inativam tais efeitos, sendo tal pigmento considerado um importante agente preventivo de tais mazelas [52].

A exposição da pele a raios solares ultravioleta (UV) do tipo A (UVA) e B (UVB), bem como os emitidos no comprimento de onda na faixa da luz azul, referente ao intervalo de 430 a 500 nm, resulta em reações químicas e biológicas denominadas de estresse oxidativo. Dessa forma, por causa da propriedade de filtrar a luz visível (capacidade oriunda de sua longa cadeia de ligações simples e duplas conjugadas), por inúmeras vezes tal esse pigmento apresenta propriedades fotoprotetoras foi considerado um protetor solar, sendo capaz de evitar as graves consequências do estresse oxidativo como a peroxidação de ácidos nucleicos, a perda funcional de membranas celulares, a inativação de proteínas e a ativação pró-carcinogênicos [26,55].

Diante disso, o β -caroteno é normalmente prescrito na forma de suplemento a portadores de protoporfiria eritropoiética, uma doença que tem como característica a fotossensibilidade excessiva da pele. É também utilizado no tratamento de outras doenças induzidas ou agravadas pela exposição de raios UV, como urticária solar, erupções polimórficas, reações alérgicas a fármacos e lúpus eritematoso. O β -caroteno também realiza a redução da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína responsável pelo transporte do colesterol no plasma sanguíneo [56].

Tal carotenoide também é usado como corante para melhorar a aparência de alimentos industriais e também para aumentar seu tempo de prateleira, é usado

também para melhorar o valor nutricional de, por exemplo, produtos lácteos, bolos, margarinas, óleos comestíveis e entre outros. É adicionado à fármacos para conferir características mais atraentes aos produtos como, cor, aroma e sabores. Por causa de sua capacidade fotoprotetora e por sua menor capacidade de induzir reações alérgicas, o β -caroteno é adicionado em cremes para a proteção da pele contra os danos oxidativos e o envelhecimento. Portanto, devido as suas diversas aplicações, o β -caroteno apresenta contribuições significativas para o desenvolvimento da indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos [44,56].

2.3 Métodos para a extração de carotenoides

Dentre as técnicas utilizadas para extração de compostos bioativos como o β -caroteno estão a extração líquida com Soxhlet, extração assistida por micro-ondas e ultrassom, extração por fluido supercrítico e a extração convencional por solventes orgânicos. O Soxhlet tem sido usado há bastante tempo, é uma técnica que consiste na extração de compostos diversos a partir de uma matriz sólida com a utilização de solventes acoplado ao uso de calor [57].

O solvente mais utilizado para esse tipo de extração é o hexano, porém, o hexano está na lista dos 189 mais perigosos poluentes atmosféricos, sendo por isso feita a utilização de solventes alternativos. No entanto, os solventes alternativos resultam numa baixa extração devida a sua menor afinidade com o soluto. A desvantagem dessa técnica na extração de carotenoides está no fato de usar uma temperatura relativamente alta que implicará na degradação dos pigmentos devido à instabilidade térmica desses compostos. Além disso, o tempo de extração é longo, há um uso exagerado de solventes e a agitação da solução não pode ser fornecida no sistema Soxhlet, resultando em um processo demorado, com custo alto dependendo do solvente utilizado e uma extração ineficaz para carotenoides devido a degradação deles em exposição à altas temperaturas [58,59].

O método de extração com fluido supercrítico é caracterizado pela utilização de variações da pressão e da temperatura na região supercrítica. Tais variações resultam em grandes alterações da densidade do solvente supercrítico, influenciando diretamente no seu poder de solubilização, isso porque, a solubilização de um solvente aumenta à medida que a sua densidade aumenta. Assim, tal processo

apresenta a vantagem de poder realizar extrações em baixas temperaturas, preservando a concentração de compostos termolábeis como os carotenoides. No entanto, sua realização é onerosa, inviabilizando uma ampla reprodução do método [60,61].

A extração facilitada por micro-ondas (MAE) emprega uma rápida entrega de energia para um volume total de solvente e matriz vegetal sólida, resultando no aquecimento do solvente e da matriz, de forma eficiente e homogênea. Dessa maneira, como a água dentro da matriz vegetal absorve energia de micro-ondas, a ruptura celular é promovida pelo superaquecimento interno, o que facilita a retirada de substâncias químicas da matriz, melhorando a recuperação de nutracêuticos. Porém, é de baixa utilidade quando os compostos a serem extraídos necessitam de solventes extratores voláteis [58,62].

A extração assistida por ultrassom (EAU) é uma tecnologia emergente que contem como força motriz a cavitação acústica, um processo que ocorre quando uma onda ultrassônica se propaga em um meio líquido. As ondas sonoras que têm frequências superiores a 20 kHz se propagam em forma de vibrações mecânicas em sólidos, líquidos e gases, assim, durante a propagação, ocorrem várias expansões e compressões nas moléculas do meio, em que, as expansões separam as moléculas e as compressões as empurram mutuamente, ocorrendo aumentos e diminuições da pressão de forma simultânea [63].

Tal variação de pressão resulta na produção e no colapso de microbolhas, que se formam, crescem e depois se desmoronam gerando jatos de líquidos com alta velocidade que têm um forte impacto na superfície sólida causando ruptura das membranas celulares. Isso resulta em uma melhor penetração do solvente nas células e um aumento na transferência de massa dos solutos para o solvente. Dessa forma, através da aplicação de ultrassom, extrações completas podem ser realizadas em minutos, com alta reprodutibilidade e baixa quantidade de solvente usados [42]. A extração assistida por ultrassom é uma alternativa barata, simples e eficiente para técnicas convencionais de extração. Os principais benefícios do uso do ultrassom na extração sólido-líquido incluem o aumento do rendimento da extração e uma cinética mais rápida. O ultrassom também pode reduzir a temperatura operacional, permitindo a extração de compostos termolábeis. Em comparação com outras técnicas inovadoras de extração, como a extração assistida por micro-ondas, o aparelho de

ultrassom é mais barato e seu funcionamento é mais fácil. Além disso, a extração assistida por ultrassom, como extração Soxhlet, pode ser usada com qualquer solvente para extrair uma ampla variedade de compostos naturais [58,64].

A extração convencional por solvente, ou também sólido-líquido, é relativamente simples e econômica que é usada convencionalmente para extrair carotenoides. Tal técnica necessita de um processo de preparação da amostra, chamado de pré-tratamento, empregando o rompimento da membrana celular, melhorando a mobilidade dos carotenoides no solvente de extração, aumentando, assim, a eficiência da extração. O pré-tratamento pode utilizar métodos mecânicos, incluindo moagem, ultrassom e homogeneização de alta pressão; e métodos não mecânicos, incluindo hidrólise enzimática. Durante a extração, equipamento simples como a mesa agitadora podem ser utilizados para melhorar a superfície de contato entre o solvente e soluto [65].

Em estudos comparativos entre a extração por solvente e Soxhlet, os autores obtiveram um maior rendimento com o primeiro método, defendendo a hipótese de que ele era superior a outros métodos, devido ao fato de não precisar de um sistema de aquecimento durante a extração, o que evita a degradação térmica dos carotenoides e minimiza o tempo de contato entre solvente e matéria-prima [28]. Outro estudo comparando a extração de carotenoides por sólido-líquido com a extração por solvente supercrítico apresentou um maior rendimento também para primeira técnica, evidenciando ser um método mais simples que não requer equipamentos sofisticados, de baixo custo e também eficaz para extração de pigmentos naturais [66].

2.4 Quantificação de carotenoides

Conhecer a identidade e a concentração dos principais carotenoides, especialmente em frutas e vegetais, é fundamental para definir matrizes eficientes desses compostos. Métodos para quantificação de carotenoides têm se baseado extensivamente nas propriedades do espectro de absorção desses pigmentos [67].

A absorvidade molar é a capacidade máxima de um mol de substância absorver radiação de uma determinada frequência. Assim, a concentração de pigmentos é calculada usando a absorvidade molar e a densidade óptica da amostra de carotenoides, de acordo com a Lei de Beer-Lambert. A densidade óptica é

geralmente medida no máximo de absorção mais pronunciado para o pigmento que está sendo analisado, desse modo, quanto maior for o número de moléculas maior será a densidade óptica [39].

O método comumente utilizado para a identificação e quantificação de carotenoides utiliza cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) combinada com detecção de absorção UV-Vis. A quantificação dos carotenoides foi estudada por diversos autores utilizando técnicas efetivas como, RP-HPLC (RP – reverse phase), HPLC-DAD (DAD – diode array detector) [68–70] ou por detector de espectrometria de lente térmica (HPLC-TLS) [71]. Tais técnicas, considerando a manutenção do equipamento e os materiais necessários para a realização de análises, são de alto custo. Há também o método de quantificação por UV-vis [72] que é uma técnica ecologicamente correta, de baixo custo e de fácil execução [73].

3 Procedimento Experimental

3.1 Amostras

As amostras de buriti foram adquiridas no comércio da cidade de Caxias-MA. Para a utilização do mesocarpo (polpa) do buriti, foi realizada a remoção do envoltório (epicarpo ou casca) do fruto com a utilização de espátulas metálicas. Em seguida, realizou-se a raspagem do fruto e a polpa foi armazenada em um recipiente plástico. Foi feita a homogeneização da amostra unindo todas raspagens e não houve processamento térmico. Após isso, o recipiente contendo a amostra foi acondicionado a temperatura de -4 °C.

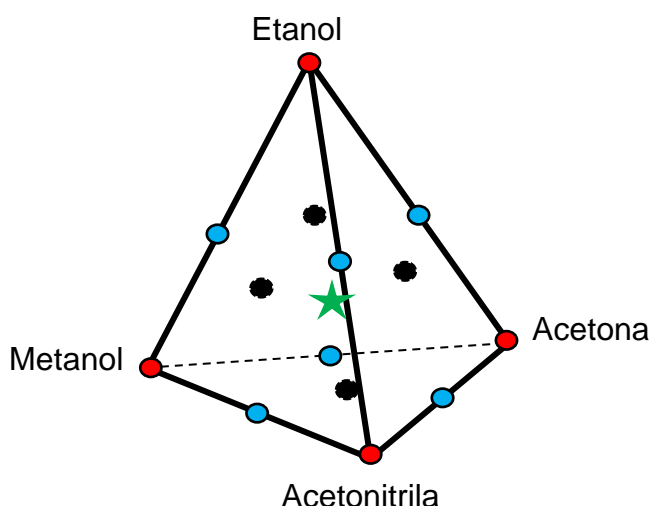
3.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico, os materiais foram descontaminados em banho ácido 10% HNO₃ (v/v) por no mínimo 24 h, posteriormente, foram lavados com água deionizada e secos a temperatura ambiente. Para os ensaios de otimização da extração de β-caroteno da polpa de buriti foram utilizados os solventes: acetona (Sigma – Aldrich, USA), etanol (J. T. Baker, Brasil), metanol e acetonitrila (Sigma – Aldrich, USA).

3.3 Otimização da extração de β -caroteno da polpa de buriti

Visando obter a melhor condição para a extração do β -caroteno, dois métodos de extração foram propostos, um realizado com o auxílio de agitação mecânica e o segundo assistido por ultrassom. Para tanto, a extração foi desenvolvida empregando misturas de solventes contendo acetona, metanol, etanol e acetonitrila. Para o procedimento, 0,1 g de amostra foi pesada diretamente dentro dos tubos de polipropileno de 15 mL tipo Falcon com a adição de 10 mL de solução extratora, o tubo contendo a solução foi envolto em papel alumínio e em seguida a mistura foi submetida a agitação por 15 min a 250 rpm e centrifugada a 3500 rpm por 10 min. A extração assistida por ultrassom (UAE) foi realizada em um banho de limpeza de ultrassom (Ultrasonic Branson 1510; Branson Ultrasonics Corp. Danbury, EUA) operado a uma frequência de 40 kHz e uma potência de 80 W com um volume utilizável de 1,9 L (dimensões internas 15 x 13 x 10 cm). A UAE ocorreu seguindo as mesmas condições da extração por solventes convencional descrita à cima. Após o procedimento de extração, o sobrenadante foi coletado e armazenado a temperatura de 5 °C. O planejamento experimental utilizado pode ser observado na figura 1, em que cada ensaio foi realizado em duplicata.

Figura 1: Planejamento de misturas para a extração de β -caroteno.



De acordo com a figura 1, os pontos localizados nos vértices da pirâmide correspondem aos ensaios realizados com apenas um tipo de solvente, os pontos das arestas representam as misturas binárias de solução extratora, nas faces está

representado a mistura de solvente ternária e ao centro, representado pela estrela a mistura dos quatro solventes.

3.4 Quantificação do β -caroteno

A quantificação do teor de β -caroteno extraído da polpa, do óleo e do biodiesel de buriti foi realizada em espectrofotômetro (Drawell, DU-8200), para tanto, procedeu-se com a varredura do espectro visível para o padrão de β -caroteno em que a maior absorbância foi observada em 455 nm, sendo este o comprimento de onda escolhido para as análises futuras. A curva analítica foi obtida utilizando padrão de β -caroteno. Uma solução estoque de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ foi preparada em acetona e a partir da diluição da mesma obteve-se as soluções de 0,25, 0,5, 1, 2, 2,5, 3 e $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizadas para a curva analítica. As análises foram realizadas em triplicata e sob luz fraca.

3.5 Análise estatística dos dados

A interpretação dos dados provenientes do planejamento centroide simplex e as superfícies de resposta das misturas foram realizadas em software Statistica 12 e Origin85. As comparações foram todas realizadas com um nível de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método de extração de β -caroteno empregando planejamento centroide simplex

Para a realização do estudo da melhor condição para a extração do β -caroteno da polpa de buriti, dois métodos de extração (EC e EAU) foram desenvolvidos. O mesmo planejamento experimental foi realizado para os dois procedimentos, com o desenvolvimento de 15 experimentos em duplicata utilizando modelagem de misturas empregando os solventes orgânicos mais utilizados na literatura para a extração de β -caroteno das mais diferentes matrizes [28,74,75]. A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados para o planejamento centroide simplex.

Tabela 1. Planejamento centroide simplex com as porcentagens de solventes utilizados para a extração de β -caroteno da polpa de buriti para a extração convencional (EC) e a extração assistida por ultrassom (EAU).

Ensaio	Acetona (A)	Etanol (B)	Metanol (C)	Acetonitrila (D)	β -caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
					EC	EAU
E1	100				706,8 \pm 9,7	872,8 \pm 18,9
E2		100			557,9 \pm 9,9	357,7 \pm 25,3
E3			100		286,1 \pm 13,6	227,6 \pm 9,4
E4				100	446,6 \pm 2,0	351,1 \pm 2,8
E5	50	50			649,5 \pm 16,0	919,8 \pm 40,2
E6	50		50		561,0 \pm 33,9	523,1 \pm 1,9
E7	50			50	553,6 \pm 24,0	702,5 \pm 21,7
E8		50	50		395,8 \pm 14,1	794,8 \pm 19,3
E9		50		50	400,1 \pm 2,0	735,3 \pm 5,5
E10			50	50	344,8 \pm 12,2	543,6 \pm 23,4
E11	33,3	33,3	33,3		580,0 \pm 18,2	750,9 \pm 26,8
E12	33,3	33,3		33,3	555,7 \pm 15,1	811,4 \pm 28,8
E13	33,3		33,3	33,3	582,9 \pm 1,9	822,2 \pm 31,7
E14		33,3	33,3	33,3	432,6 \pm 6,0	857,5 \pm 14,1
E15	25	25	25	25	590,0 \pm 2,0	948,3 \pm 16,0

Comparando os dois métodos de extração apresentados na tabela 1, a EAU apresentou média global de aproximadamente $681,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno extraído, a EC demonstrou um rendimento médio de $509,6 \mu\text{g g}^{-1}$, em que a EAU obteve média superior a EC. Observa-se que tanto para a EC quanto a EAU, dentre os solventes puros, o maior teor de β -caroteno foi obtido utilizando acetona (ensaio 1), em que o ensaio 3 realizado com 100% de metanol foi o menos efetivo nos dois métodos de extração, possivelmente justificado porque dentre os quatro solventes estudados, o β -caroteno apresenta maior solubilidade em acetona com 200 mg L^{-1} , seguido pelo etanol (30 mg L^{-1}), acetonitrila e metanol (10 mg L^{-1}) [76].

Entre as misturas binárias realizada para a EC, o ensaio 5 composto pela solução extratora de acetona:etanol representou a melhor extração com um valor cerca de 1,9 vezes superior ao obtido pelo ensaio 10, a mistura entre metanol:acetonitrila. O método EAU, teve como melhor mistura binária o ensaio 5, e como menos efetiva o experimento 6, composto pela mistura de acetona:metanol. Além da capacidade de solubilização da acetona pura, a penetração ou difusão dos solventes na matriz da amostra desempenha um papel importante na eficiência da extração. O ensaio realizado com acetona pura foi mais eficiente na extração do antioxidante quando comparado à misturas de acetona e outros solventes, possivelmente justificado pela acetona pura ser um solvente e um material umectante melhor, que penetra mais facilmente na matriz sólida e contribui para ou aumento do teor de β -caroteno extraído [77,78]. Analisando as misturas ternárias, o ensaio 14 composto pela mistura de metanol:etanol:acetonitrila foi responsável pelo menor teor de β -caroteno extraído para a EC e a EAU teve como mistura ternária mais efetiva o ensaio 14, realizado com etanol:metanol:acetonitrila.

Para a análise dos dados obtidos foram estudados três modelos matemáticos, o modelo linear, quadrático e o cúbico especial. As figuras de mérito para cada modelo estão listadas na tabela 2.

Tabela 2. Resumo das figuras de mérito obtidas a partir de modelos polinomiais otimizados para o estudo da extração de β -caroteno da polpa de buriti.

Extração Convencional (EC)						
Modelo	R²	R_{ajus}	F_{cal} modelo	F_{tab}	F_{cal} falta de ajuste	F_{tab}
Linear	0,8396	0,8211	45,38	2,98	24,80	2,51
Quadrático	0,9294	0,8976	29,26	2,39	22,34	2,90
Cúbico especial	0,9910	0,9838	136,26	2,40	1,06	4,54
Extração Assistida por Ultrassom (EAU)						
Linear	0,2814	0,20	3,39	2,98	196,46	2,51
Quadrático	0,9332	0,9031	31,04	2,39	37,46	2,90
Cúbico especial	0,9902	0,9822	124,03	2,40	14,75	4,54

De acordo com a tabela 2, é possível inferir que com o aumento da complexidade do modelo matemático, a adição de novos termos para estudar as interações quadráticas e cúbicas propicia um aumento dos parâmetros R^2 e R_{ajust} para os dois métodos de extração (EC e EAU). Observa-se que em ambos os métodos, o modelo o cubico especial foi o que melhor descreveu o conjunto de dados, em que para a EC o coeficiente de determinação múltipla R^2 , responsável por avaliar a capacidade de predição do modelo, descreve cerca de 99,1% da variância dos dados, o modelo possui uma máxima variância explicada de 98,4%. Para a EAU, obteve-se R^2 de 99,0% e R_{ajust} de 98,2%.

A análise do F_{cal} para os modelos estudados revela que todos, exceto o modelo linear obtido para a EAU, foram significativos, pois o F_{cal} para o modelo foi superior ao F_{tab} . Com a adição de novos termos ao polinômio matemático, observa-se que ocorre a diminuição da razão F_{cal}/F_{tab} para a falta de ajuste, em que a significância da falta de ajuste pode ser observada para modelos que apresentem razão $F_{cal}/F_{tab} > 1$ [79]. Dentre os modelos estudados para a EC, o cúbico especial não apresentou falta de ajuste com a razão $F_{cal}/F_{tab} = 0,23$ e foi o que obteve maior razão F_{cal}/F_{tab} para o modelo $F_{cal}/F_{tab} = 56,78$. Os modelos utilizados para o estudo do método EAU, apresentaram razão F_{cal}/F_{tab} superior a 1, com o cúbico especial apresentando-se com a falta de ajuste menos significativa. A tabela 3 apresenta os valores da ANOVA para

avaliar a qualidade do modelo cúbico especial proposto para a descrição dos dados experimentais para o método EC e EAU, em que os valores para a regressão de ambos são muito superiores a soma quadrática para o resíduo e para a falta de ajuste.

Tabela 3. Anova para o modelo cúbico especial.

Extração Convencional (EC)					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal} (95%)	F_{tab} (95%)
Regressão	392622,2	13	30201,71	136,26	2,40
Resíduo	3546,4	16	221,65		
Falta de ajuste (faj)	234,8	1	234,80	1,06	4,54
Erro puro	3311,6	15	220,78		
Ajuste total	396168,7	29	13660,99		
R²	0,9910				
Rajustado	0,9838				
Extração Assistida por Ultrassom (EAU)					
Regressão	1427669	13	109820,7	124,03	2,40
Resíduo	14167	16	885,5		
Falta de ajuste (faj)	7025	1	7024,9	14,75	4,54
Erro puro	7142	15	476,2		
Ajuste total	1441836	29	49718,5		
R²	0,9902				
Rajustado	0,9822				

As equações contendo apenas os termos significativos para cada tipo de extração estão listadas na tabela 4, em que as três equações para os modelos dos tipos de extração realizadas (EC e EAU) possuem a acetona como o termo linear mais significativo corroborando com a maior concentração de β -caroteno extraído por esse solvente de $706,84 \pm 9,65 \mu\text{g g}^{-1}$ para a EC e de $872,8 \pm 18,9 \mu\text{g g}^{-1}$ para a EAU, o termo linear menos significativo foi observado para o metanol em ambas com $286,12 \pm 13,63 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno extraído para EC e de $227,6 \pm 9,4 \mu\text{g g}^{-1}$ para a EAU.

Para o modelo quadrático da extração convencional, tem-se que a interação entre o etanol:acetoneitrila apresenta valor negativo, portanto, essa interação

apresenta um efeito antagônico no sistema, ou seja, a resposta obtida para os dois componentes combinados será sempre menor do que a soma de suas respostas individuais, também é observado o efeito antagônico para a mistura entre acetona:etanol:metanol no modelo cúbico especial para a EAU. O efeito binário representado pela acetona:metanol no modelo quadrático para a EC, possui sinal positivo, isso significa que se trata de um efeito sinérgico, em que, a resposta proveniente da combinação desses dois efeitos será sempre maior que a soma individual de suas respostas [79].

O modelo cúbico especial para a EC, apresenta como efeitos antagônicos as combinações entre etanol:metanol e etanol:acetonitrila nos efeitos binários, que possivelmente se deve ao fato de o metanol solvente em que o β -caroteno possui menor solubilidade, além de, em termos de polaridade, o metanol apresenta-se como o solvente mais polar, o que, quando em mistura com ou outros solventes, possa ter provocado o aumento da polaridade da solução, diminuindo assim a afinidade com o analíto, que é um composto apolar [76,78,80]. Entre as misturas ternárias, a associação entre acetona:metanol:acetonitrila foi o termo mais significativo.

Tabela 4. Equações polinomiais para os modelos matemáticos em que y é a concentração de β -caroteno extraído da polpa de buriti.

Extração Convencional (EC)	
Modelo	Equação
Linear	$y = 757,25a + 534,23b + 327,15c + 420,14d$
Quadrático	$y = 694,79a + 547,82b + 271,26c + 432,07d + 454,38ac - 260,92bd$
Cúbico especial	$y = 706,97a + 558,07b + 286,25c + 446,74d + 261,342ac - 109,29bc - 413,36bd + 1141,62abc + 1030,44abd + 2650,86acd + 1991,34bcd$
Extração Assistida por Ultrassom (EAU)	
Linar	$y = 943,63a + 725,76b + 464,62c + 590,97d$
Quadrático	$y = 864,48a + 361,82b + 211,36c + 333,15d + 1060,33ab + 600,55ad + 1993,68bc + 1538,58bd + 1398,36cd$

Cúbico especial $y = 873,50a + 358,41b + 228,31c + 351,76d + 1193,35ab + 337,36ad + 1983,77bc + 1498,95bd + 992,24cd - 1496,53abc + 6031,41acd + 1783,91bcd$

$a =$ acetona; $b =$ etanol; $c =$ metanol; $d =$ acetonitrila

A análise da figura 2, mostra que existe uma correlação entre os valores experimentais e os valores previstos para os dois métodos de extração, revelando que o modelo cúbico especial é capaz de prever com boa exatidão os valores experimentais. A análise dos resíduos para os modelos (Figura 3) demonstrou que os mesmos seguem uma distribuição normal, indicando que as variações nas medidas realizadas resultam de erros aleatórios e inerentes ao processo analítico.

Figura 2. Gráfico dos valores experimentais vs valores previstos para a extração convencional (A) e assistida por ultrassom (B).

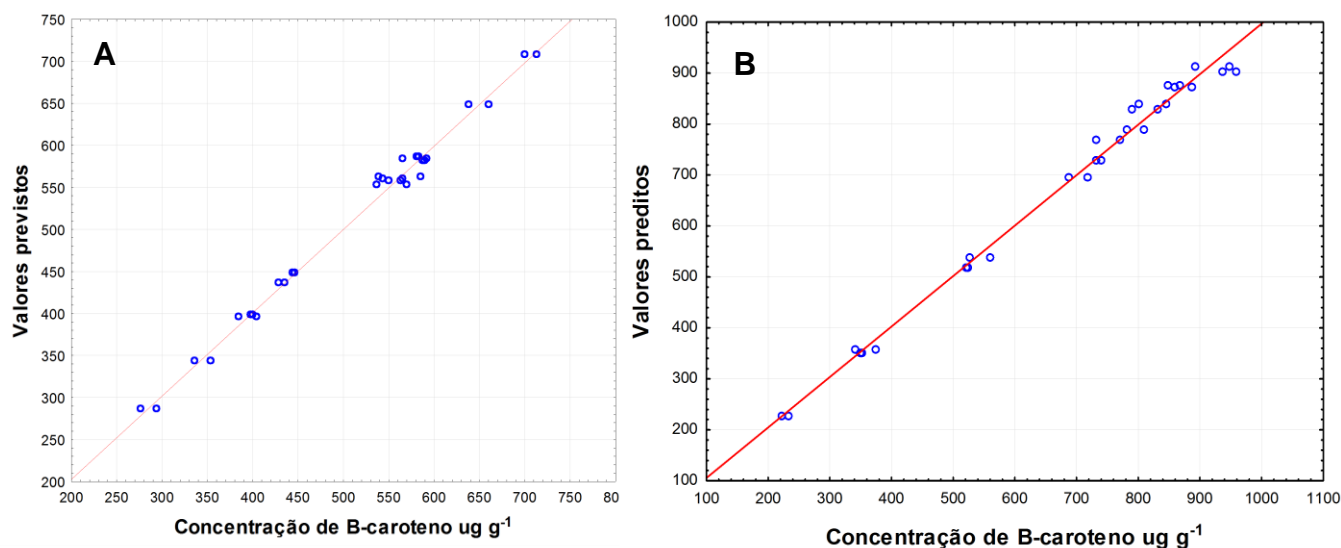
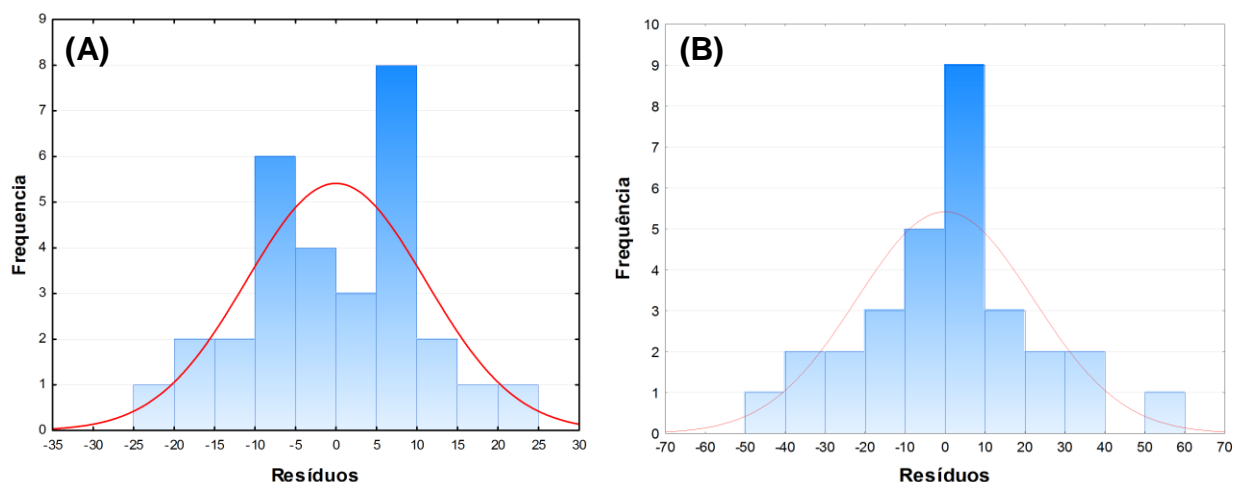
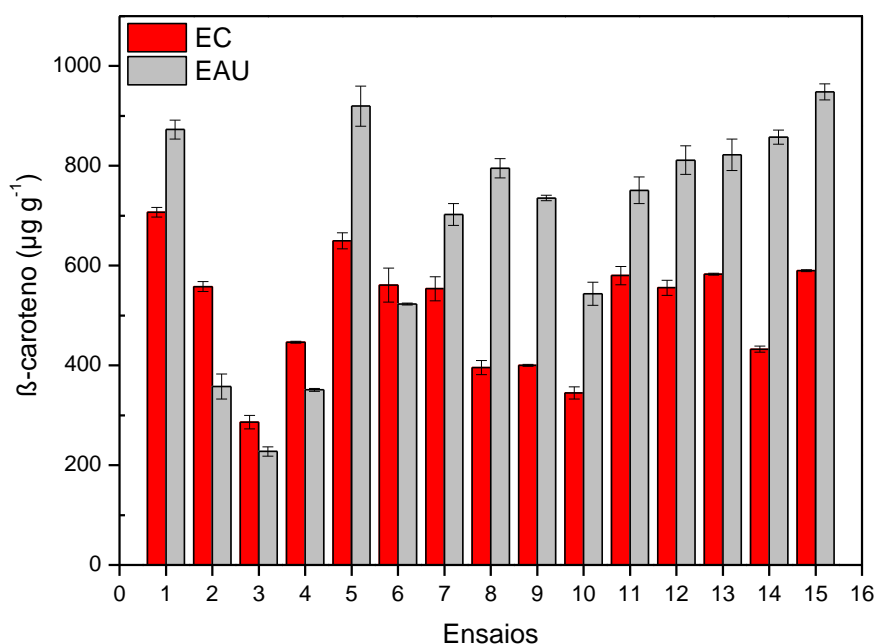


Figura 3. Histograma de resíduos vs frequência para a extração convencional (A) e assistida por ultrassom (B).



A figura 4, apresenta a comparação para os valores de β -caroteno em cada ensaio nos dois métodos de extração realizados (EC e EAU), em que, embora o ensaio 5, realizado para EC, com a mistura binária de acetona:etanol tenha apresentado menor rendimento de extração ($649,49 \pm 15,95 \mu\text{g g}^{-1}$) quando comparado ao ensaio 1 ($706,84 \pm 9,65$), contendo apenas acetona, o teste Tukey, a 95% de confiança, indicou que a discrepância entre os valores não foi significativamente diferente. Observa-se que a influência da energia ultrassom foi positiva na maioria dos experimentos, possibilitando a obtenção de extratos mais concentrados e superiores aos EC nos casos 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 com a mistura quaternária de acetona:etanol:metanol:acetonitrila extraíndo uma maior quantidade de β -caroteno ($948,3 \pm 16,0 \mu\text{g g}^{-1}$). Nos últimos anos, as EAU de antioxidantes têm sido amplamente aplicada devido à sua alta eficiência e elevada taxa de extração. A força de cavitação aplicada pela energia ultrassom pode acelerar a transferência de calor e massa, em que o aumento da extração tem sido atribuído a ondas de grande amplitude que viajam através de um meio, provocando a compressão e o cisalhamento de moléculas do solvente, resultando em diferenças localizadas na densidade e no módulo de elasticidade da solução [81,82].

Figura 4. Comparação entre os teores de β -caroteno extraído para a extração convencional (EC) e assistida por ultrassom (EAU).



Como consequência, a compressão inicialmente senoidal e as ondas de cisalhamento, a uma distância finita do transdutor ultrassônico, são distorcidas em ondas de choque. A diminuição abrupta da pressão na borda da onda ultrassônica no ciclo de pressão negativa gera pequenas bolhas. Essas bolhas colapsam no ciclo de pressão positiva e produzem condições de fluxo turbulento associados a altas pressões e temperaturas, causando ruptura de tecido vegetal e aumentando a liberação de substâncias intracelulares no solvente, melhorando a eficiência da extração [83,84]. Os efeitos da cavitação dependem fortemente dos parâmetros operacionais, como a intensidade ultrassônica, a temperatura, etc., que é crucial em um projeto e operação eficientes dos reatores sonoquímicos. O aumento da intensidade da energia ultrassom propicia a ocorrência de efeitos cavitacionais aprimorados, aumentando a ruptura celular e com isso gerando extratos mais concentrados. Além do aumento da ruptura celular, a EAU facilita a dilatação e a hidratação, ocasionando o aumento dos poros presentes na parede celular e com isso a difusão do solvente para dentro da célula, esses fatores possivelmente contribuíram para a maior eficiência de extração apresentada pela EAU [81,85].

Vários estudos compararam os efeitos da extração de solventes convencionais e EAU na recuperação de carotenoides a partir de diferentes materiais vegetais e seus

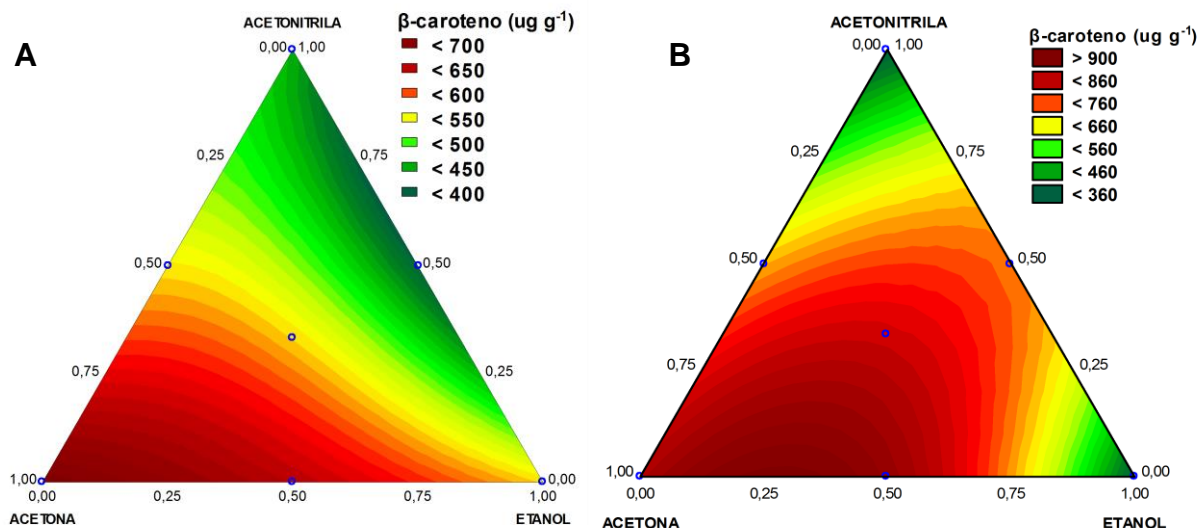
subprodutos, como o tomate [86–88], resíduos de tomate [89], cenoura [90], milho [91], toranja [92]. No entanto, nenhuma informação sobre a extração assistida por ultrassom de carotenoides a partir de polpa de buriti está disponível na literatura.

Os resultados obtidos para os experimentos 5, para a EAU, ($919,8 \pm 40,2 \mu\text{g g}^{-1}$) e 15 ($948,3 \pm 16,0 \mu\text{g g}^{-1}$) apresentaram-se superiores, no entanto, o teste de Tukey, a 95% de confiança, indicou que os resultados obtidos para a mistura binária de acetona:etanol (ensaio 5) e a mistura quaternária, acetona:etanol:metanol:acetonitrila, foram estatisticamente iguais. Uma possível explicação para o elevado teor de β -caroteno extraído no ensaio 5 é que os dois solventes polares (acetona:etanol), devido ao seu pequeno volume molar, alta capacidade de ligação de hidrogênio, causam o inchaço do tecido da planta, facilitando assim a penetração do solvente [76].

Após a avaliação da significância dos efeitos e da adequação do modelo cúbico especial pela ANOVA, obteve-se a superfície de contorno da figura 5, que apresenta a concentração de β -caroteno em função da composição da solução extratora. De acordo com a figura 5A, a região que corresponde a 100% de acetona proporciona uma melhor condição de extração para o β -caroteno. A medida que se distancia da região correspondente a totalidade de acetona para a direção do etanol, tem-se a diminuição na eficiência da extração, dentre os três solventes da figura 5A, a acetonitrila apresenta menor teor de β -caroteno extraído. A figura 5B, porpõe que mistura de 75% de acetona e 25% de etanol é a melhor solução para a EAU, com um valor previsto superior a $900 \mu\text{g g}^{-1}$, entre os quatro solventes estudados o metanol foi o responsável pelo menor teor de β -caroteno para ambos os métodos avaliados.

Os solventes orgânicos são empregados para promover a extração dos carotenoides em geral, de acordo com a literatura, os solventes mais utilizados são os solventes apolares, hexano, tetrahidrofurano (THF), éter de petróleo além de solvente polares como a acetona o etanol, metanol e misturas desses solventes [28]. A escolha do solvente ou da mistura de solventes apropriada para o procedimento de extração é uma etapa crucial, em que cada amostra apresenta uma matriz particular o que pode dificultar o procedimento de extração [75].

Figura 5. Superfície de contorno para o modelo cúbico especial, onde a concentração de β -caroteno é predita em função da razão entre os solventes acetona:etanol:acetonitrila.



Carotenoides apolares como o licopeno e o β -caroteno apresentam extensa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas, além de não possuírem grupo funcional [14]. Entre os solventes mais utilizados para a extração tanto de carotenoides polares quanto apolares, destacam-se a acetona e o hexano. O hexano (C_6H_{14}) é um hidrocarboneto alceno comumente utilizado nas indústrias químicas e petroquímicas, e na extração de óleos vegetais, porém, apresenta atividades carcinogênicas e neurotóxicas [93]. A acetona, o etanol e o metanol são solventes considerados seguros (GRAS – Generally Recognized As Safe), quando comparados com hexano, éter dietílico, diclorometano e o clorofórmio, a acetona e o etanol são preferíveis por questões ambientais, de saúde e segurança. Os carotenoides estão presentes nas mais diferentes matrizes vegetais e cada uma possui particularidade quanto a composição da parede celular, ao metanol e etanol, é atribuída a capacidade de alteração da permeabilidade celular facilitando a extração [77].

Devido a sua miscibilidade em água, a acetona e o etanol são comumente empregados para a extração de carotenoides derivados de vegetais que contém considerável teor de umidade. Existe relação entre o grau de hidratação das amostras e o teor de carotenoides extraído, onde embora a presença de umidade possa acarretar a diminuição da solubilidade do β -caroteno devido a água residual [77], o maior conteúdo de carotenoides extraído pela acetona, pode ser atribuído ao fato de

que a água promoveu a intensificação da penetração do solvente na parede celular, conseqüentemente, ocorreu o aumento no teor de β -caroteno extraído.

Em relação a polaridade dos solventes orgânicos utilizados, pode-se atribuir a maior extração pela acetona devido a sua baixa polaridade quando comparada ao etanol, metanol e acetonitrila. A escala de polaridade ET (transição eletrônica) que relaciona as propriedades físico-químicas como: constante dielétrica, momento dipolar, viscosidade da solução, pontua que altos valores de ET correspondem a solventes de maior elevada polaridade, observa-se que a acetona é menos polar que os outros solventes estudados. Onde os valores de ET encontrados na literatura para os solventes em Kcal mol^{-1} estão listados na tabela 5.

Tabela 5. Valores de E_t (30) para os solventes avaliados neste trabalho [78,80].

Solvente	Valores de E_t
Acetona	42,2
Acetonitrila	45,6
Etanol	51,9
metanol	55,4

Em relação ao teor de β -caroteno obtido, observa-se que quanto menor a polaridade da solução extratora, maior o conteúdo extraído. Para solventes de maior polaridade, por exemplo o metanol, foi observada concentrações menores. Não foram encontrados na literatura, valores de ET para as misturas binárias, ternárias e quaternárias avaliadas nesse trabalho.

O teor de β -caroteno extraído com acetona ($706,84 \pm 9,65 \mu\text{g g}^{-1}$) foi bastante superior aos encontrados na literatura para outros vegetais, de acordo com a tabela 6 a concentração de β -caroteno presente na polpa de buriti é cerca de dez vezes superior ao encontrado na cenoura, tuberculosa mais conhecida pela presença de carotenoides e por apresentar altos teores de vitamina A.

Tabela 6. Concentrações de β -caroteno em amostras frescas reportadas na literatura para matrizes vegetais.

Fontes vegetais	β-caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ref
Cenoura	41,7 – 111,4	[73,94,95]
Batata doce	147,2 – 214,7	[73,94]
Acerola	6,1 – 17,0	[57,96]
Caja´	1,4 – 2,6	[94,96]
Caju	0,5 – 1,8	[96]
Goiaba	1,1 – 12,0	[96]
Manga	2,0 – 25,2	[96]
Maracujá	2,4 – 13	[96]

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a deficiência de vitamina A afeta aproximadamente 200 milhões de crianças e 19 milhões de mulheres grávidas, principalmente na África e no Sudeste Asiático. A vitamina A exerce funções importantes no organismo humano, como a de influenciar no crescimento e na eficiência reprodutiva, além da manutenção dos tecidos epiteliais [97]. Por isso, os retinóides têm sido utilizados para tratamento dermatológicos, como a acne, devido à sua capacidade antioxidante, o β -caroteno é utilizado como protetor solar oral para prevenir o fotoenvelhecimento da pele e as queimaduras de sol, além de ser adicionado a alimentos para retardar o processo de oxidação [13,28,98].

A elevada concentração de β -caroteno presente no buriti pode contribuir para que os subprodutos advindos dessa matriz também possuam altos teores desse antioxidante, o que resulta em produtos naturalmente mais resistentes ao processo de degradação, provocada pelo tempo, temperatura, exposição ao oxigênio ou ao ar [99,100]. Com isso, o óleo extraído desse fruto pode ser uma matéria prima interessante para a produção de biodiesel com altas concentrações de antioxidantes naturais e com uma elevada estabilidade oxidativa.

5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Os objetivos propostos neste capítulo foram atingidos satisfatoriamente, uma vez que os estudos realizados contibuíram para agregar informações sobre o perfil nutricional do buriti ampliando os estudos relacionados aos compostos bioativos presentes no fruto. Além de que, esse trabalho ampliou as informações sobre o processo de extração de carotenóis, estudando a influência da energia ultrassom em amostras vegetais.

A análise do conjunto de dados para os dois métodos de extração (EC e EAU) propostos revelou que, em ambos, o modelo cúbico especial foi o que melhor descreveu o conjunto de dados, apresentando uma variação máxima explicada de 98,4% para a EC e de 98,2% para EAU. Para a EC a acetona pura foi a melhor condição, extraíndo cerca de $706,8 \pm 9,7 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno e que dentre os solvente puros, o metanol foi o menos efetivo na extração ($286,1 \pm 13,6 \mu\text{g g}^{-1}$), foi observado que as misturas de etanol:metanol e metanol:acetonitrila apresentaram efeito antagônico no sistema com uma resposta inferior à dos seus solventes puros. No método EAU, assim como o observado para a EC, a acetona apresentou-se como o solvente mais efetivo na extração ($872,8 \pm 18,9 \mu\text{g g}^{-1}$) e que o metanol foi o menos eficaz ($227,6 \pm 9,4 \mu\text{g g}^{-1}$), o ensaio 15 composto pela mistura quaternária (acetona, etanol, metanol e acetonitrila) apresentou o maior teor de β -caroteno ($948,3 \pm 16,0 \mu\text{g g}^{-1}$), porém a análise da superfície de contorno para o modelo cúbico especial propôs que a melhor condição é obtida pela mistura de aproximadamente 75% de acetona e 25% de etanol. Na maioria dos ensaios de extração realizados (1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15) a EAU apresentou teores mais elevados de β -caroteno extraído. Portanto, este estudo mostrou que a melhor condição para a extração deste antioxidante em amostras de buriti frescas cosiste na utilização da mistura entre acetona:etanol (3:1) empregando energia ultrassom.

Capítulo 2

Estabilidade oxidativa do biodiesel de Buriti (*Mauritia flexuosa*) pelo método de Rancimat

1 OBJETIVO

Esse capítulo teve como objetivo, avaliar a estabilidade do biodiesel obtido pela transesterificação metílica do óleo de buriti pelo método de Rancimat, bem como estudar a influência da etapa de produção do biodiesel na concentração de β -caroteno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Combustíveis fósseis

Caracterizam-se como combustíveis fósseis, aqueles formados por meio de processos lentos de decomposição de restos de vegetais e animais. O termo “fóssil” deve-se ao fato do longo processo de formação, que dura milhões de anos, em que são exemplos de combustíveis fósseis o carvão mineral, gás natural e o petróleo [101]. Durante os últimos anos, o consumo de combustíveis fósseis aumentou em todo mundo. Por volta de 1985, aproximadamente 2.807 milhões de toneladas de petróleo foram consumidas, em 2008 esse número atingiu 3.928 milhões de toneladas. O petróleo trata-se de uma fonte passível de esgotamento, além de ser uma das principais causas da liberação de gases que provocam o efeito estufa [102,103].

Atualmente, os setores de transportes são quase que totalmente dependentes dos combustíveis derivados do petróleo, em que, um quinto das emissões globais de CO₂ é gerado por esse setor. Em 2007, havia cerca de 806 milhões de veículos terrestres movidos a combustão de derivados do petróleo, em 2030, estima-se que esse número aumente para 1,3 bilhões e que no ano de 2050 alcance a marca de 2000 milhões de veículos [102]. Esse crescimento acentuado pode afetar a estabilidade do planeta, assim como as reservas mundiais de petróleo. O consumo de combustíveis fósseis apresenta um impacto significativo na qualidade do meio ambiente, em que a poluição do ar, mudanças climáticas, os derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são resultados do uso desenfreado desses combustíveis [4,104]. As fontes de energia renovável vêm se destacando nos últimos anos devido ao seu potencial como substituto aos combustíveis derivados do petróleo,

em termos ambientais e econômicos. A energia solar, eólica, hídrica e os biocombustíveis ganham mais atenção a cada ano, como alternativa para os tradicionais combustíveis [105].

2.2 Biodiesel

Os combustíveis renováveis ou biocombustíveis são aqueles originados da biomassa, isto é, toda matéria orgânica, de origem vegetal ou animal que é utilizada para a produção de energia. São exemplos de biocombustíveis o etanol comumente produzido a partir da cana de açúcar e o biodiesel obtido de oleaginosas e de gordura animal [101,106]. Entre as vantagens dos biocombustíveis frente aos combustíveis fósseis, está a de ser uma fonte de energia renovável e a de liberar menor quantidade poluentes na atmosfera após o processo de queima, na comparação com o diesel, o biodiesel pode emitir em média 48% a menos de monóxido de carbono, 47% a menos de material particulado e 67% menos hidrocarbonetos [107,108].

A utilização de oleaginosas na produção de biocombustíveis teve início por volta de 1900 com engenheiro Rudolph Diesel, inventor do motor a diesel, nessa época, Rudolph realizou testes em motores de compressão utilizando óleo de amendoim. Os óleos vegetais foram usados nos motores a diesel até a década de 1920, porém, nessa época, os baixos preços dos combustíveis fósseis favoreceram a utilização de derivados do petróleo. As primeiras pesquisas relacionadas a produção de biodiesel iniciaram em 1937 na Bélgica, com o depósito de uma patente que descrevia a produção de biodiesel por meio de catálise básica. A patente intitulada "*Procédé de transformation d'huiles végétales en vue de leur utilisation comme carburants*" (Processo de conversão de óleos vegetais para uso como combustível) depositada pelo belga Charles George Chavanne [109], que observou a redução da viscosidade do óleo, facilitando, desta forma, sua queima em motores a diesel. A patente deposita, tinha como objetivo a transformação do óleo vegetal em éster de ácidos graxos de cadeia longa, para utilização como matéria prima energética em motores a diesel. Nas décadas de 40 e 50 intensificaram as pesquisas sobre a reação de transesterificação e aplicação de biodiesel em motores [110].

Entre as definições para o biodiesel, alguns pesquisadores o definem com uma mistura de óleos vegetais e diesel fóssil, enquanto outros como uma mistura de

ésteres alquílicos e diesel [111,112]. Segundo a American Society for Testing Materials (ASTM) o biodiesel é um combustível líquido sintético, obtido a partir de matéria prima renovável e constituída por uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeias longas, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais. A Agência Nacional de Petróleo, define-o como derivado da biomassa renovável que pode substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados do petróleo e gás natural em motores a combustão [6,113].

O biodiesel começou a ser utilizado como combustível comercial por volta de 1988 em muitos países Europeus, impulsionado por uma redução de 90% nos impostos que possibilitou a venda na Europa com preços competitivos com o diesel convencional [114]. Estima-se, que em 2014, aproximadamente 71 milhões de toneladas de biodiesel foram produzidos, dentre os principais produtores, destacam-se os Estados Unidos, Brasil e Alemanha com 30; 17 e 2,6 milhões de toneladas, respectivamente [4,115]. A utilização nos EUA começou a se intensificar a partir da motivação mundial em melhorar a qualidade do meio ambiente [107], reduzindo a quantidade de gases do efeito estufa emitidos e com várias iniciativas, entre elas o programa intitulado de “Programa Ecodiesel” [19]. Até meados de 2010, a Alemanha detinha cerca de 42% da produção mundial de biodiesel, obtidos em sua grande maioria a partir da colza, as folhas da planta servem também de forragem para o gado por seu alto conteúdo em lipídios e conteúdo médio em proteínas [116].

2.2.1 Processos de síntese do biodiesel

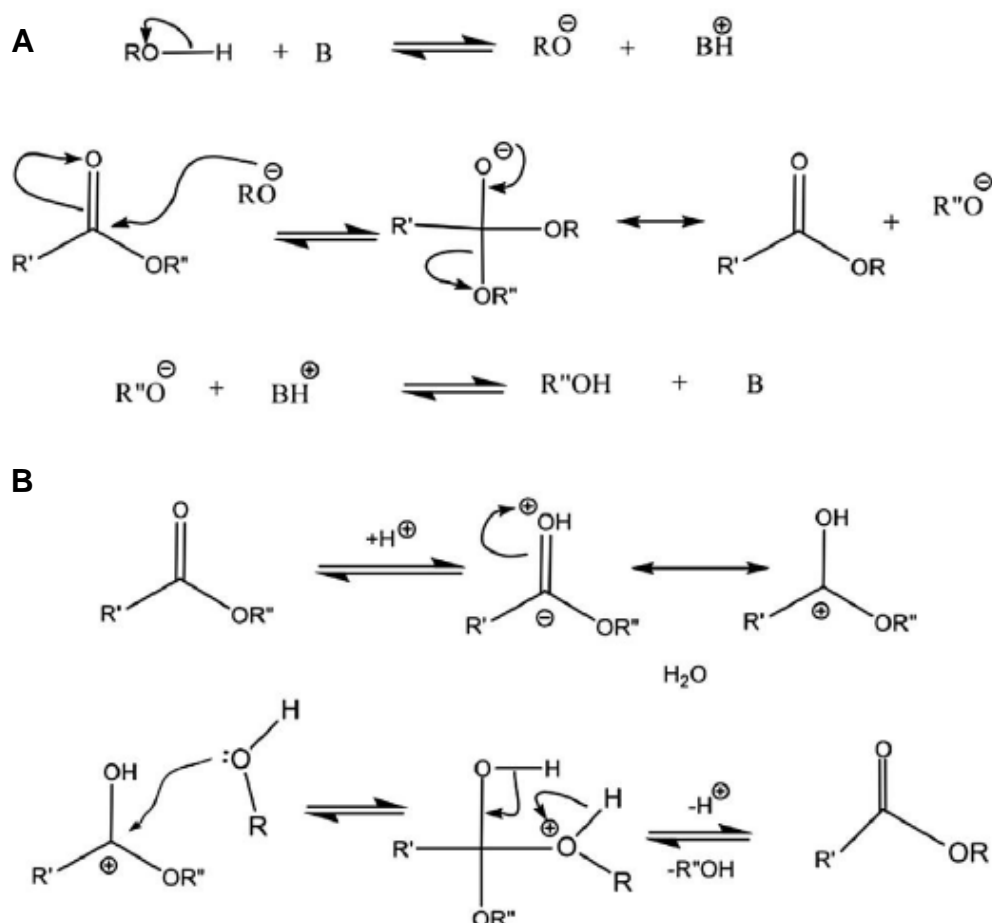
As principais formas de obtenção do biodiesel são pelas reações de transesterificação, esterificação e a tecnologia de craqueamento que consiste na quebra da molécula do triglicerídeo a altas temperaturas (acima de 400 °C) para a formação dos ésteres [105,108,111]. A principal rota para a obtenção do biodiesel é através da reação de transesterificação em que um álcool de cadeia curta reage com os triglicerídeos, formando ésteres e glicerol, além de triglicerídeos e diglicerídeos não reagidos. Para completar estequiometricamente uma reação de transesterificação, é necessário utilizar uma razão molar de 3:1 de álcool pra os triglicerídeos, todavia, na prática, a fim de se obter um rendimento reacional maior, utiliza-se o álcool em

excesso, para que o equilíbrio seja deslocado para o lado dos produtos e permita a separação do glicerol formado [117].

Para facilitar e acelerar a reação de transesterificação, comumente, empregam-se catalisadores, que podem ser ácidos, básicos ou enzimáticos. A reação deve ocorrer sob constante agitação, porém, uma agitação demasiadamente intensa pode ocasionar a formação de sabões, conseqüentemente, a formação de uma emulsificação de difícil separação [118]. A transesterificação homogênea ocorre com reagentes na forma líquida, de acordo com a figura 6, para a catálise ácida, o mecanismo reacional equivale à protonação do grupo alquila dos triglicerídeos e ao ataque do álcool ao carbono protonado. Na catálise básica homogênea, o mecanismo reacional consiste no ataque nucleofílico do álcool à carbonila dos triglicerídeos [119], inicialmente o álcool reage com a base para a formação do alcóxido, na segunda etapa tem-se o ataque nucleofílico (alcóxido) ao grupo carbonila do triglicerídeo formando um intermediário tetraédrico, posteriormente, há a formação do éster e o ânion correspondente ao diglicerídeo, depois, o ânion abstrai um próton do álcool e produz o íon alcóxido que desprotona o catalisador e gera a base. Com uma segunda molécula de álcool há o início de um novo ciclo catalítico até que os diglicerídeos e os monoglicerídeos sejam convertidos em éster e glicerol [120].

A transesterificação utilizando catalisadores ácidos é comumente empregada para óleos com elevado teor de ácidos graxos livres, os catalisadores mais utilizados são os ácidos sulfúrico, clorídrico, sulfônico e fosfórico, entre as desvantagens da catálise ácida, estão a sensibilidade a água, a baixa velocidade reacional [121,122] se comparada com a catálise alcalina, pois o álcool é um nucleófilo mais fraco que o íon alcóxido, altas razões molares óleo/álcool [123]. Na transesterificação básica os hidróxidos de sódio e potássio são os mais utilizados, entre as vantagens desse método tem-se o seu baixo custo relativo e o alto rendimento reacional, porém, apresenta como desvantagem a de separação do glicerol, a necessidade de óleos com baixas concentrações de água e ácidos graxos livres, além da necessidade de ao final da reação ser realizada a purificação para a retirada do catalisador e do álcool remanescente [121,124]. O subproduto da reação de transesterificação é o glicerol, um líquido de alta viscosidade e alto ponto de ebulição que apresenta aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e química, sendo utilizado como estabilizante, antioxidante, umectante, emulsificante e na obtenção de resinas [112].

Figura 6. Mecanismo de reação para a catálise básica (A) e ácida (B). Adaptado de Aransiola *et al* [125].



2.2.2 Histórico do Biodiesel no Brasil

Por volta da década de 1920 surgiram os primeiros relatos envolvendo o uso de óleo vegetal como combustível automotivo no Brasil, em testes coordenados pelo INT (Instituto Nacional Tecnológico). A baixa na produção de petróleo na década de 70 e 80 ocasionada pela elevação no preço do barril de 3 para 12 U\$ pela OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) e devido à guerra na região Irã-Iraque, impulsionou a implantação de programas de incentivo à produção de combustíveis renováveis no país [126,127].

Para contornar essa adversidade da época, o governo brasileiro criou diversos programas, entre eles os programas Pro-álcool com o objetivo de aumentar a

produção de etanol por meio da cana-de-açúcar, para ser adicionado à gasolina e com isso reduzir a necessidade de importação do petróleo, e o Pro-óleo, que era o plano de incentivo à produção de óleos vegetais para utilização como combustíveis. O Pro-óleo era utilizado na forma de *blends* (misturas) de até 30% de óleos vegetais adicionados ao diesel comercial [126,127]. Surgiram nessa época, os estudos coordenados pelo professor Expedito José de Sá Parente, da Universidade Federal do Ceará, O PRODIESEL, e posteriormente o PROSENE, projeto criado para a produção de querosene para avião, a fim de fortalecer os projetos nacionais [110].

No ano de 2002, surgiu o ProBiodiesel, criado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia do Brasil, que tinha por objetivo incrementar gradativamente, o biodiesel ao diesel em automóveis brasileiros, inicialmente seria adicionado cerca de 5% de biodiesel no ano de 2005, em 2010 essa porcentagem seria de 10% e 20% no ano de 2020. O biodiesel apresentou crescimento de 175% na participação da matriz energética entre 2008-2015 [127]. Em, 2011, a produção de biodiesel aumentou em R\$ 7,1 bilhões o PIB brasileiro e gerou 85 mil novos empregos. No ano de 2016 o Brasil tornou-se o segundo maior produtor de biodiesel, com uma produção de 17 milhões de toneladas, com um faturamento estimado em R\$ 8,5 bilhões em 2015. O Brasil reduziu suas importações em 30% o que representou uma economia de R\$ 2,6 bilhões. Com o incentivo de políticas de desenvolvimento do biodiesel, o Brasil teve um aumento de 736 m³ em 2005 para 3.801.339 m³ na produção anual, esse crescimento, pode ser justificado pela obrigatoriedade da adição do biocombustível ao diesel, que em 2008 era de 2% e de 8% em 2017 [110,128,129].

2.3 Matérias-primas para a produção de biodiesel

Devido a extensa área geográfica do Brasil e os variados climas, existe uma grande diversidade de oleaginosas que podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel. A escolha da matéria prima a ser utilizada está muito relacionada com a disponibilidade e o potencial econômico da região, o desafio é o aproveitamento das potencialidades de cada área para a produção de biodiesel. Nas regiões Sul e Centro-oeste, destacam-se a gordura animal e a soja, o Nordeste brasileiro tem como principais bases para a produção de biodiesel o pinhão manso, o

algodão, o babaçu e a mamona, na região norte do país, destaca-se o dendê [110,127] as principais oleaginosas brasileiras estão representadas na figura 7.

Figura 7. Produção de óleos vegetais e tendências regionais brasileiras



De acordo com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o país não deve privilegiar rotas tecnológicas ou matérias-primas, porém, a soja ainda se destaca com a principal oleaginosa utilizada na produção do biodiesel. De acordo com a ANP, em 2010, as principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel foram, óleo de soja, sebo, óleo de algodão. Embora o biodiesel possa ser produzido com qualquer ácido graxo, os óleos vegetais são considerados a principal matéria-prima para a produção [110,126]. Apesar do atual crescimento da produção de biodiesel no Brasil, este aumento ocorre de forma irregular, liderado praticamente pelas regiões Sul e Centro-oeste do país, que é possivelmente explicado pela heterogeneidade das monoculturas de oleaginosas presentes nessas regiões [127].

Além dos óleos e gorduras virgens, os óleos e gorduras residuais, provenientes de processos de fritura, domésticos, comerciais e industriais, podem ser utilizados

como matéria-prima. Entre as principais vantagens decorrentes da utilização dos óleos residuais de fritura está a de dispensa do processo de extração, além de ser uma matéria-prima de baixo custo, por se tratar de um resíduo e existe a vantagem de cunho ambiental, que se caracteriza pela destinação adequada de um resíduo que em sua grande maioria é descartado inadequadamente, contaminando o solo e os recursos hídricos. Diferentemente do diesel, o biodiesel é mais sensível à oxidação, isso ocorre devido à composição do biocombustível, ou seja, a presença de ésteres insaturados advindos da matriz utilizada para a produção do biodiesel, torna-o mais suscetível à degradação. É importante destacar que a natureza da matéria prima a ser utilizada para a síntese do biodiesel influencia diretamente nas propriedades e na estrutura do mesmo, após o processo de transesterificação, o biodiesel apresenta o mesmo perfil de ácidos graxos da sua matéria prima de origem [4,130].

As insaturações presentes na estrutura dos ácidos graxos, são responsáveis por sítios suscetíveis à oxidação, o que justifica a baixa estabilidade apresentada por esse biocombustível. O tipo e o teor de ácidos graxos presentes no óleo vegetal influenciam diretamente na estabilidade do biodiesel, em que quanto maior o grau de insaturações presentes, menor a estabilidade do biocombustível [131]. O processo de oxidação ocasiona a formação de hidroperóxidos que contribuem para a formação de composto insolúveis que precipitam e provocam o entupimento de filtros e sistemas de injeção. Quando a estabilidade oxidativa do biodiesel é considerada insuficiente, pode ser feita a adição de antioxidantes, sintéticos ou naturais [111].

2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, retarde ou iniba o processo de oxidação desse substrato de maneira eficaz [132]. Podem agir de diversas formas, como diminuindo a concentração de oxigênio, abstraindo o oxigênio singlete, evitando assim a fase de iniciação da oxidação pelo sequestro do radical hidroxil. Os antioxidantes podem ser classificados em primários, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos [108].

Os compostos primários são os antioxidantes que promovem a remoção ou a inativação dos radicais livres formados durante as etapas de iniciação ou propagação,

atuam através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. São exemplos de antioxidantes primários os compostos fenólicos, tocoferóis e os carotenoides [133].

2.4.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados para combater o processo de oxidação em diversas matrizes, alimentares, farmacêuticas e combustíveis, entre os mais utilizados em biodiesel estão o Butil-hidroxitolueno (BHT), Butil-hidroxi-anisol (BHA), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), galato de propilo (GP) e pirogalhol (PA) [11,134]. O BHT, é um antioxidante sintético pertencente ao grupo dos antioxidantes primários, usado como aditivo alimentar, remédios, combustível, borracha e taxidermia. É produzido a partir do cresol e do isobutileno, possui fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$ e apresenta baixa solubilidade em água. O bom desempenho do BHT em combustíveis ocorre devido a suas características como ser estável em elevadas temperaturas, eficaz em pequenas quantidades, apresentar alto grau de pureza, solúvel em óleo, entre outras [135].

O BHA é um antioxidante de pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como aqueles contidos em óleo de coco e palma [136]. O TBHQ é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos e gorduras e não se complexa com íons de cobre e ferro, como o galato de propilo. É considerado, em geral, mais eficaz em óleos vegetais do que o BHA ou o BHT; em relação à gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo do que o BHT. O BHA e o TBHQ são os mais utilizados na conservação de óleos vegetais estocados [137,138].

Outros compostos que vem sendo investigados como antioxidantes sintéticos são os naftóis. Os naftóis são derivados do naftaleno e são pertencentes à família dos fenóis. Assim como o naftaleno, seus derivados o α -naftol e β -naftol são considerados como poluentes orgânicos oriundos de processos industriais. Esses compostos podem apresentar elevada toxicidade dependendo da posição dos seus grupos substituintes e podem ser encontrados em efluentes de indústrias têxteis [139].

2.4.2 Antioxidantes Naturais

A utilização de antioxidantes naturais ganha força a cada dia, principalmente na indústria alimentícia, de produtos farmacêuticos e cosméticos, por não serem tóxicos ao organismo humano. A maioria dos antioxidantes naturais utilizados contém polifenóis, antioxidantes monofenólicos que ajudam a estabilizar a maioria dos óleos vegetais [52,108]. Os flavonoides, que são pertencentes ao grupo de polifenóis totais, cumprem as exigências as quais são estabelecidas aos antioxidantes, pois estudos realizados comprovaram a sua eficácia em retardar ou evitar o processo de oxidação, mesmo em pequenas quantidades [140].

Características estruturais, como, a presença de conjugação e a sua aromaticidade, propiciam elevada estabilidade a esses compostos. A literatura relata que, compostos fenólicos são eficientes antioxidantes contra a deterioração oxidativa de ácidos graxos polinsaturados. A atividade antioxidante dos flavonóides ocorre devido à sua habilidade de sequestrar radicais livres, atuando assim, como doadores de hidrogênio e quelantes de metais [141]. Os tocoferóis apresentam como desvantagem a alta suscetibilidade a oxidação provocada pelo ar e são estáveis apenas na ausência em sua ausência. Além disso, a presença da enzima lipoxigenase degrada os tocoferóis, em que esta enzima deve ser desativada para retardar a degradação [108].

Entre os carotenoides, destaca-se o β -caroteno que é encontrado principalmente no óleo de palma e de buriti, é um potente antioxidante e sua eficácia depende principalmente da pressão parcial de oxigênio em contato. Quando em elevadas pressões parciais, o β -caroteno pode desenvolver ação pró-oxidante [16]. Em geral, os óleos vegetais possuem antioxidantes naturais, como tocoferóis, tocoestrienóis, polifenóis, clorofilas, ascorbatos, lignina e carotenóides que exercem um papel protetor essencial na oxidação dos ácidos graxos. Os resultados de muitas pesquisas mostram que mesmo o éster altamente saturado perde sua estabilidade rapidamente se contém um baixo nível de antioxidantes naturais [142,143].

Embora os combustíveis biodiesel produzidos a partir de gorduras animais terrestres, como a banha e o sebo bovino, contenham grandes quantidades de gorduras saturadas, eles têm pouca estabilidade porque contêm uma quantidade menor de antioxidantes naturais [108]. O óleo de buriti, altamente insaturado (80%

insaturado), tem maior estabilidade à oxidação, independentemente de seu alto teor de ácido oleico, devido à presença de grandes quantidades de tocoferóis e carotenoides, porém, a maioria desses antioxidantes naturais pode ser reduzida ou destruída durante a transesterificação durante o processo de refino [20]. Os biodieseis produzidos a partir de óleos vegetais não refinados contêm mais antioxidantes naturais e melhor estabilidade, mas não satisfazem outros requisitos de para serem utilizados como combustíveis [144].

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Amostras

O óleo utilizado para a síntese do biodiesel foi extraído em laboratório. Para o procedimento de extração, em um béquer de 1 L, aproximadamente 300 mL de água deionizada foi aquecida até a ebulição, então a polpa foi adicionada e permaneceu sob aquecimento a temperatura e agitação constante por 1 h, após decorrido esse tempo, a mistura foi deixada em repouso para que houvesse a separação de fases, então, o óleo foi coletado da fase superior com o auxílio de uma seringa.

3.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes para os procedimentos de síntese e caracterização do biodiesel foram de pureza analítica. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada com resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ obtida por sistema de purificação Millipore® Milli-Q Direct purification system (Darmstadt, Alemanha). Para a síntese do biodiesel, foi utilizado metanol e hidróxido de sódio (Sigma – Aldrich, EUA). Os reagentes para os ensaios de caracterização foram, reagente de Wijs (Química Moderna, Brasil), ácido clorídrico e ácido acético (Merck, Alemanha), hexano (Sigma – Aldrich, EUA), clorofórmio (Synth, Brasil), etanol (J. T. Baker, Brasil) iodeto de potássio (Dinâmica, Brasil), tiosulfato de sódio (Synth, Brasil) e fenolftaleína, (Synth, Brasil).

3.3 Síntese do biodiesel

O biodiesel utilizado neste estudo foi produzido por transesterificação catalítica de óleo de buriti em excesso de metanol (30% m/m) e com NaOH (0,7% m/m) como catalisador alcalino. A massa de NaOH foi solubilizada em metanol e a solução foi adicionada ao óleo de buriti previamente aquecido a 60 °C, a reação de transesterificação procedeu por 50 min sob agitação constante, a formação do biodiesel foi confirmada pelo aparecimento do glicerol de coloração mais escura que o óleo [145]. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e após 1 h o glicerol decantou ao fundo e foi removido. O biodiesel foi então lavado com água

deionizada aquecida a 60 °C para a retirada glicerol e do NaOH remanescente, com a verificação da ausência pelo teste da água de lavagem com solução de fenolftaleína 1%. Após a remoção do catalizador, o biodiesel foi seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frasco de vidro âmbar ao abrigo da luz e da umidade.

3.4 Quantificação do teor de β -caroteno no óleo e no biodiesel de buriti

Para as análises do teor de β -caroteno presentes no óleo e do biodiesel de buriti, aproximadamente 0,1 g de amostra foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e dissolvidos em acetona até um volume final de 10 mL, a mistura foi então lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 455 nm.

3.5 Avaliação da estabilidade do biodiesel

A medida da estabilidade oxidativa do biodiesel foi conduzida de acordo com a norma EN 14112 empregando o equipamento Rancimat (Metrohm, modelo: 873). Para o procedimento experimental, aproximadamente $3 \pm 0,2$ g de amostra foi pesada em triplicata diretamente dentro dos tubos de ensaio de vidro e foram aquecidas em blocos controlados por termostato nas temperaturas de 90, 100 e 110 °C sob fluxo de ar constante de 10 L h⁻¹. Os produtos voláteis da oxidação formados durante o processo, são arrastados pelo fluxo de ar e coletados em um recipiente de medição de condutividade elétrica contendo 50 mL de água deionizada. Os dados de condutividade elétrica (μ S) x tempo (h) foram plotados e o ponto de inflexão da curva representando o tempo de indução (h) foi obtido manualmente.

3.6 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada por um cromatógrafo trace GC Ultra da ThermoScientific acoplado com espectrômetro de massa modelo ISQ, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida SPTM-2560 (100m x 0,25 mm x 0,2 um film thickness), tendo como gás de arraste o hélio, com vazão 1 mL min⁻¹. Para a análise, cerca de 0,110 g de biodiesel foi dissolvida em 1,5 mL de hexano. A programação do equipamento para determinar o perfil dos ácidos graxos, na forma de ésteres metílicos

foi: temperaturas: do injetor e do detector 240 °C e da fonte de íons a 240 °C; a coluna foi inicialmente aquecida a 90 °C, permanecendo nesta temperatura por 1 min, em seguida foi elevada a 180 °C, com uma taxa de aquecimento de 4 °C min⁻¹ e mantida nessa temperatura por 1 min; finalizando, com uma taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ foi elevada até 220 °C e mantida por 10 min. Logo, a duração de toda análise foi equivalente a 47,83 min.

3.7 Caracterização do Biodiesel

O óleo e o biodiesel de buriti foram submetidos à caracterização físico-química por métodos oficiais estabelecidos pela American Oil Chemists 'Society (AOCS), pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) e pelo Comitê Europeu de Normalização (EN). As seguintes propriedades foram determinadas: índice de acidez (EN 14104), índice de peróxido (AOCS Cd 8-53) índice de saponificação (AOCS Cd 3–25), índice de iodo (EN 14111) e a análise do teor de água presente no óleo e no biodiesel de buriti foi realizada de acordo com a norma ASTM D 6304 utilizando um aparelho Karl Fischer (Metrohm, 831). Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e os valores médios foram reportados com desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Propriedades físico-químicas do óleo e do biodiesel de buriti

Os efeitos da degradação oxidativa em termos de manutenção da qualidade dos biocombustíveis apresentam uma preocupação legítima pela ampla aceitação do biodiesel. Durante o armazenamento, ocorrem alterações na composição, bem como nas propriedades físico-químicas do biodiesel, que incluem o índice de acidez, densidade, viscosidade, índice de peróxido, tempo de indução (TI) [1]. A tabela 7 apresenta os resultados para os resultados para algumas dessas propriedades.

Tabela 7. Propriedades físico-químicas do biodiesel utilizado neste trabalho.

Propriedade	Método	Óleo	Biodiesel	Máx Bio*
Índice de acidez (IA) (mg KOH g ⁻¹)	EN 14104	3,75 ± 0,06	0,40 ± 0,04	0,5
Índice de iodo (II) (g I ₂ /100g)	EN 14111	6,91 ± 0,23	7,11 ± 0,87	20
Índice de peróxido (IP) (meq Kg ⁻¹)	AOCS Cd 8-53	12,20 ± 0,61	8,94 ± 0,98	-
Índice de saponificação (IS) (mg KOH g ⁻¹)	AOCS Cd 3-25	180 ± 2,72	185,32 ± 7,20	180 – 200
Umidade (ppm)	ASTM D 6304-07	33,33 ± 1,44	60,0 ± 3,5	200

*Valores máximos regulamentados pela ANP

O índice de acidez é uma medida da quantidade de ácidos graxos livres presentes no biodiesel ou no óleo, estando diretamente relacionado à estabilidade. Os ésteres presente no biodiesel tendem a se hidrolisar em álcool e ácidos quando em presença de oxigênio, acarretando um aumento no número de ácidos totais. Além dos produtos da oxidação e da hidrólise, os ácidos minerais residuais utilizados no processo de síntese do biodiesel são responsáveis pela presença de compostos ácidos, que conseqüentemente, contribuem para o aumento do IA [4]. O valor encontrado para o biodiesel de buriti (0,40 ± 0,04 mg KOH g⁻¹) está em concordância

com o estabelecido pela ANP de no máximo $0,5 \text{ mg KOH g}^{-1}$. O IA é um importante parâmetro para avaliar a qualidade do biodiesel produzido, bem como monitorar o nível de oxidação durante o período de armazenamento, um valor elevado de IA não é favorável porque afeta as partes metálicas do motor e leva à corrosão [107]. Os óleos vegetais e gorduras podem ser utilizados para a produção de biodiesel por transesterificação alcalina quando apresentam valores de acidez inferiores a 6 mg KOH/g , sendo assim, o óleo utilizado nesse trabalho apresenta IA ($3,75 \pm 0,06$) viável para a síntese do biodiesel [146].

Por meio da análise do índice de iodo é possível obter informações a cerca da magnitude das insaturações presentes nos ácidos graxos ou nos ésteres [4]. O óleo e o biodiesel de buriti apresentaram valores em concordância com o respectivo grau de insaturação, com valores de $6,91 \pm 0,23 \text{ g I}_2/100\text{g}$ e $7,11 \pm 0,87 \text{ g I}_2/100\text{g}$, respectivamente. Quanto maior o grau de insaturação, maior a quantidade de iodo utilizado, porém, não é possível identificar a posição na cadeia e a quantidade de carbonos olefínicos nos ácidos graxos, pois neste teste, todos os hidrogênios são considerados igualmente reativos, portanto, com base no índice de iodo, não é possível concluir as diferenças estruturais presentes em diferentes compostos graxos. Conseqüentemente, o índice de iodo não fornece informações para determinar se os hidrogênios são alílicos ou bisalílicos às duplas ligações, o que é um fator importante para determinar a propensão a oxidação do biodiesel [6,7].

O índice de peróxido é uma medida da quantidade de peróxido formado durante o processo de oxidação, o aumento do valor de IP assim como o aumento da acidez, pode ocasionar a corrosão das partes do sistema de combustível, o entupimento das tubulações, o endurecimento dos componentes de borracha e o atraso no procedimento de ignição. Embora o IP não seja especificado nas normas para o biodiesel devido ao aumento durante os estágios iniciais de oxidação e a diminuição durante o período final, trata-se de um importante parâmetro para a determinação do nível de oxidação e da qualidade do óleo a ser utilizado como matéria prima. Segundo alguns relatos da literatura, o valor máximo desse índice para óleos refinados e gorduras vegetais é de aproximadamente 10 meq Kg^{-1} [12,147]. O óleo de buriti apresentou IP igual a $8,94 \pm 0,98 \text{ meq Kg}^{-1}$, o que sugere um estágio considerável de oxidação, entretanto, este valor pode não representar o real estágio de degradação, pois, durante o procedimento de titulação, devido à forte coloração avermelhada do

óleo, a observação dos pontos de viragem é dificultada. Em um estudo sobre as características dos óleos de planta da Amazônia, Serra et al. [148] encontrou um valor de $12,05 \pm 0,10$ meq Kg⁻¹, e esse alto valor foi atribuído a dificuldade na observação do ponto de viragem para o óleo.

O índice de saponificação indica a quantidade relativa de ácidos graxos de alto e baixo peso molecular. Os ésteres de ácidos graxos de baixo peso, requerem mais base para a saponificação, enquanto que os de alto, consomem uma quantidade menor [148]. Valores de IS acima de 200 mg KOH g⁻¹ são característicos de óleos com ácidos graxos de baixo peso molecular [4], portanto, o IS é inversamente proporcional. Os valores para o IS do óleo ($180,51 \pm 2,73$ mg KOH g⁻¹) e do biodiesel de buriti ($185,32 \pm 7,20$ mg KOH g⁻¹) estão dentro da faixa de 180 – 200 mg KOH g⁻¹, indicando a presença de ácidos graxos de alto peso molecular.

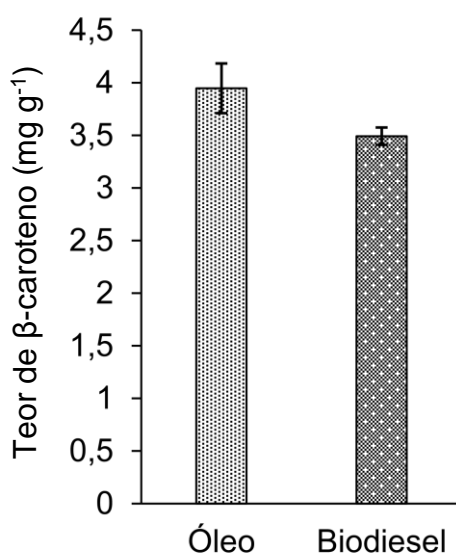
Uma das principais preocupações a cerca da estabilidade do biodiesel é a degradação oxidativa, porém, a estabilidade durante o armazenamento também pode envolver problemas causados pela contaminação da água e crescimento microbiano [2]. O efeito da água no biodiesel pode levar a degradação hidrolítica de ésteres para álcool e ácidos livres diminuindo a qualidade do biodiesel, resultando na corrosão do tanque, formação de emulsões, além de hidrólise ou oxidação hidrolítica [3]. A água presente no combustível pode causar a formação de ferrugem e corrosão, exacerbada pela presença de ácidos e hidroperóxidos formados pela oxidação, assim, por meio da análise da tabela 7, o biodiesel utilizado neste trabalho apresentou-se em conformidade com o valor máximo estabelecido para o teor de água [15].

4.2 Teor de β -caroteno presente no óleo e no biodiesel de buriti

Com o intuito de avaliar as perdas de β -caroteno advindas do processo de transesterificação, procedeu-se com a quantificação na amostra de óleo e posteriormente no biodiesel obtido. A partir da figura 8, observa-se que o teor de β -caroteno encontrado no óleo de buriti foi de $3,95 \pm 0,24$ mg g⁻¹, após o processo de transesterificação, lavagem e desumidificação do biodiesel, cerca de $3,5 \pm 0,08$ mg g⁻¹ de β -caroteno se manteve presente, embora a média encontrada após o processo de transesterificação tenha sido menor, o teste de Turkey, ao nível de confiança de 95%, revela que não há diferença significativa. Porém, essa diferença no teor médio

de β -caroteno entre o óleo e o biodiesel pode ser atribuída a fatores como o aquecimento utilizado para facilitar a reação de transesterificação ou a etapa de lavagem para a retirada da glicerina e do metanol residual [147].

Figura 8. Teor de β -caroteno presente no óleo e no biodiesel de buriti



Para a síntese do biodiesel, costumasse empregar a razão estequiométrica álcool/triglicerídeo de 3:1, todavia, é comum a utilização de uma razão molar mais alta, com o álcool em excesso para garantir uma maior eficiência reacional [117]. Após o processo de transesterificação, o biodiesel é lavado para a remoção da glicerina, do catalizador básico e do álcool remanescente. Durante o processo de lavagem, utiliza-se água deionizada aquecida a 60 °C e observa-se que a água de lavagem apresenta coloração amarelada, compatível com atribuída ao antioxidante β -caroteno, esse fenômeno pode ser justificado pela solubilização do antioxidante no metanol residual, o β -caroteno apresenta solubilidade de 10 mg L^{-1} em metanol e que por ser miscível em água, é possível que o álcool seja retirado do meio com percentuais do antioxidante [76].

Além da perda proveniente da solubilização em metanol, é possível que a temperatura utilizada para a reação de síntese do biodiesel possa ter promovido a degradação de parte do β -caroteno, ainda que em baixa intensidade. Devido às suas estruturas altamente insaturadas, os carotenóides são suscetíveis a processos de oxidação, que podem ser causados pela exposição ao calor, luz, oxigênio,

catalisadores e outros fatores. A estrutura também pode influenciar na sua estabilidade, como por exemplo, a posição e o número das insaturações. Por possuírem um sistema de ligações duplas conjugadas, os carotenoides são vulneráveis ao calor, quando sob altas temperaturas [149].

Em um estudo sobre a influencia da temperatura na degradação de carotenoides no suco de laranja, durante a pasteurização por microondas foi observado que os teores de α -caroteno, β -caroteno, luteína e zeaxantina no suco pasteurizado a 85 °C por 60 s reduziram em aproximadamente 50%, 57%, 66%, 54% e 58%, respectivamente [150]. Estudos anteriores também encontraram uma perda de β -caroteno em nanoemulsões armazenadas em temperaturas elevadas [151]. Assim, mesmo que a sensibilidade térmica dos carotenoides seja uma característica conhecida, ela não segue um padrão exato, tendo variações de resultados entre diferentes matrizes. Por exemplo, a ebulição (durante 20 min), a fritura (10 min) ou a secagem (a 57 °C durante 10h) da batata doce reduzem o teor de carotenoides como o all-trans- β -caroteno em 77% - 88%. Similarmente, o teor de carotenoides em pimentões diminuiu em 55% - 80% à medida que a temperatura do processo de desidratação osmótica aumenta de 25 °C para 55 °C [26,45,47,49]. Desse modo, diminuir a temperatura, reduzir o tempo de processamento e a exposição das amostras ao oxigênio pode garantir uma menor degradação dos carotenoides. Observa-se que mesmo a perda do antioxidante durante o processo de lavagem ou a degradação proveniente da temperatura utilizada para favorecer a reação de transesterificação não representou grande impacto na concentração final de β -caroteno presente no biodiesel de buriti.

4.3 Tempo de indução (TI)

O método de Rancimat para a avaliação da estabilidade oxidativa consiste em submeter uma amostra de gordura, óleo ou biodiesel a um fluxo de ar e temperatura constantes. Durante o estágio inicial da oxidação, os ésteres metílicos de ácidos graxos são oxidados a peróxidos. Então, os peróxidos são completamente decompostos para formar compostos orgânicos voláteis e ácidos orgânicos, principalmente o ácido fórmico e o ácido acético. Os gases liberados são então coletados em um frasco contendo água deionizada e um eletrodo é responsável por

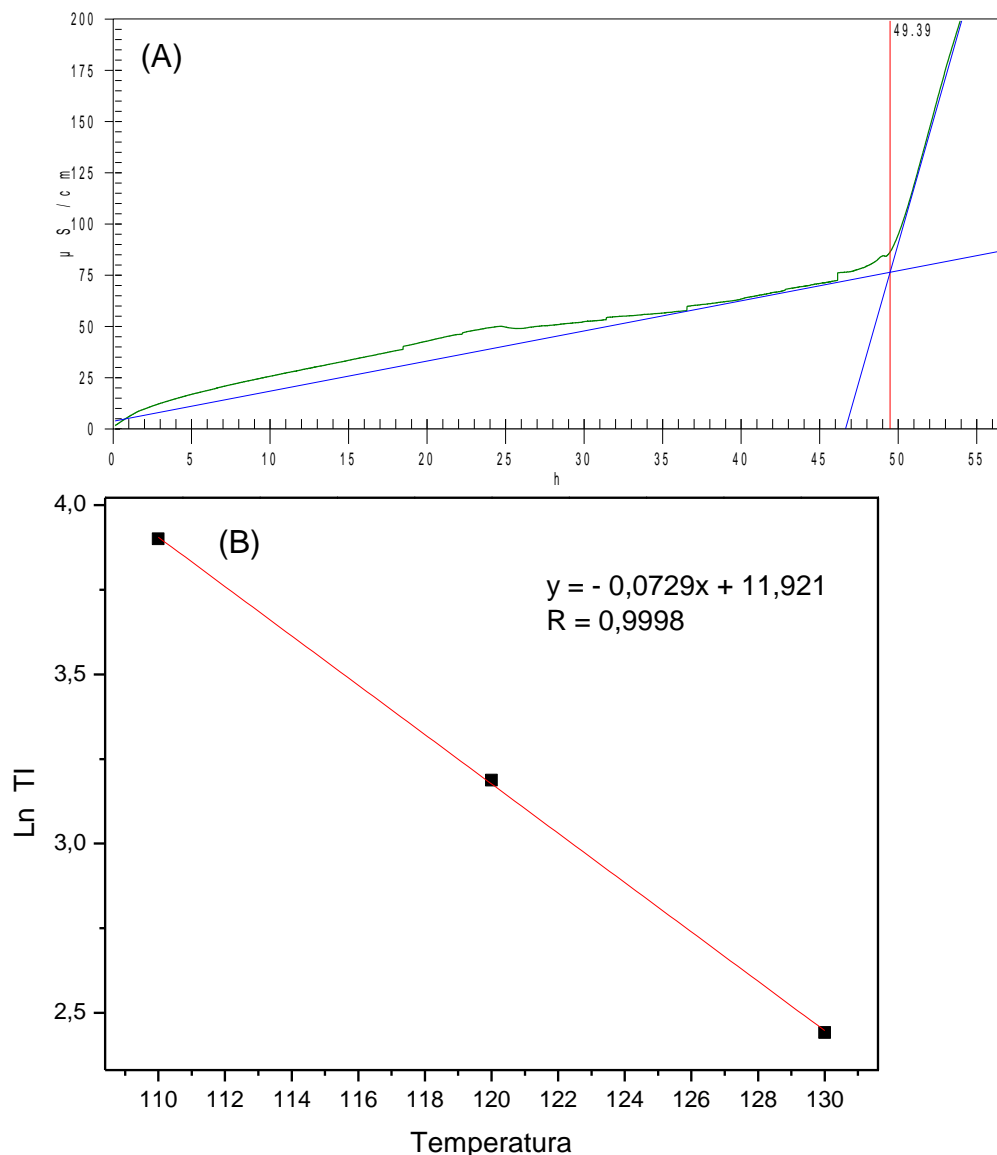
medir a condutividade da solução [4,107]. O TI é observado quando ocorre o aumento pronunciado da condutividade, em que a medição contínua fornece uma curva de oxidação (Figura 9A). A análise da estabilidade oxidativa para o biodiesel de buriti foi realizada nas temperaturas de 110, 120 e 130 °C, apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Tempo de indução e vida de prateleira para o óleo e o biodiesel de buriti

Temperatura ° C	TI (h)		Ln TI	
	Óleo	Biodiesel	Óleo	Biodiesel
130	11,7	11,5	2,46	2,44
120	21,1	24,2	3,05	3,19
110		49,4		3,90
25		24306,5		10,10

O gráfico do ln do TI vs temperatura para o biodiesel foi plotado e pode ser observado na figura 9B. Por meio da extrapolação do gráfico é possível encontrar o PI a 25 °C que corresponde a vida de prateleira de 24306,52 h ou 2,81 anos, esse é o tempo teórico de validade para o biodiesel de buriti. A obtenção do tempo de prateleira pode ser realizada de duas formas, pelo teste de estabilidade acelerada ou pelo teste de estabilidade em tempo real. O teste de estabilidade em tempo real apresenta a desvantagem do longo tempo necessário para a ocorrência da degradação significativa do biodiesel sob condições controladas [152]. A fim de avaliar o tempo de indução para o óleo antes da transesterificação, procedeu-se com o estudo da estabilidade acelerada nas mesmas condições em que o biodiesel. Nas temperaturas de 130 e 120 °C o óleo de buriti apresentou TI próximos aos do biodiesel (tabela 8). O biodiesel apresentou TI próximos aos do óleo, possivelmente devido a grande concentração de β -caroteno que se manteve presente após a síntese. Observou-se que embora o biodiesel apresente grandes quantidades de ácidos graxos insaturados (90,1%), principalmente o ácido oleico e o linolênico, a alta estabilidade oxidativa determinada deve-se basicamente ao elevado teor de antioxidantes naturais presentes.

Figura 9. (A) TI para o biodiesel de buriti utilizado neste trabalho a 110 °C. (B) Gráfico para o Ln do TI vs temperatura.



O teste de Rancimat é considerado o parâmetro mais importante em relação à estabilidade do biodiesel. A ANP estabelece que a determinação da estabilidade oxidativa a 110 °C com um TI mínimo de 8 h pelo método de Rancimat, pelo método da ASTM D-6751 especifica-se um tempo mínimo de indução de 3 h. Constatou-se que o biodiesel de buriti apresentou o TI aproximadamente 7 vezes superior ao estabelecido pela ANP pelo método EN 14112.

Quando comparado a outros biodieseis da literatura (tabela 9), o de buriti apresenta TI muito superior a soja que é a principal matéria prima para a produção de biocombustíveis, todavia, devido a presença altas porcentagens de ácidos graxos

insaturados, com predominância dos ácidos linoleico e oleico, o biodiesel de soja apresenta alta vulnerabilidade a oxidação, para aumentar a estabilidade oxidativa do biodiesel de soja, é comum a adição de antioxidantes sintéticos, que encarecem o processo de produção além de não ser interessante do ponto de vista ambiental, a considerável estabilidade apresentada pelo biodiesel obtido do babassu deve-se a baixa composição de ácidos graxos insaturados [153].

Tabela 9. Estabilidade oxidativa para e percentual de ácidos graxos insaturados para diferentes biodieseis.

Matéria-prima	Estabilidade Oxidativa (TI, a 110 °C, h)	Ácidos graxos insaturados (%)	Ref
Buriti (neste trabalho)	49,39	90,1 ± 9,5	[148,154,155]
Algodão	4,9	74,1	[146]
Amêndoa	3,0	86,4	[153]
Amendoim	2,0	84,4	[153]
Babassu	19,4	16,0	[79]
Colza	2,0	93,6	[153]
Girassol	0,8 – 1,56	88,9	[153]
Jatropha	4,80	73,64	[19]
Karanja	4,20	86,70	[19]
Milho	1,2 – 5,9	91,7 ± 11,2	[79,153]
Óleo de fritura	3,0	75,35	[2]
Oliva	3,3	84,4	[153]
Soja	1,3 – 5,1	85,0 ± 5,9	[79,153]
Uva	0,5	88,5	[153]

O elevado TI para o biodiesel de buriti deve-se a alta concentração de β -caroteno ($3,5 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$) remanescente após a reação de transesterificação. A atividade antioxidante dos carotenoides baseia-se na extinção do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou por meio da reação com radicais livres. O primeiro caso envolve a transferência de energia de excitação do oxigênio singlete para o carotenoide, resultando em oxigênio no estado fundamental e carotenoide excitado no estado triplete. A energia de excitação é dissipada, produzindo energia térmica e o

carotenoide assume o estado fundamental, resultando na oxidação do pigmento com o desaparecimento da coloração vermelha característica do óleo e do biodiesel de buriti. Os carotenoides possuem forte ação antioxidante devido as duplas ligações conjugadas. Isso os torna capazes de capturar radicais livres, especialmente os radicais alquil-peroxil [14].

A interação entre os carotenoides e os radicais alquil-peroxil ocorrem de três maneiras diferentes: por transferência de elétrons, abstração de hidrogênio e formação de uma espécie radical. Essas propriedades dos carotenoides enfatizam os resultados de muitas pesquisas que mostram que mesmo o éster altamente saturado tende a perder sua estabilidade rapidamente se contiver um baixo nível de antioxidantes naturais. O altamente insaturado óleo de buriti, por exemplo, tem maior estabilidade, independentemente do seu alto teor de óleo oleico, devido à presença de grandes quantidades do β -caroteno [14,156].

Sabe-se que é difícil cumprir o estabelecido pela ANP para biodieseis sem que seja realizada a adição de antioxidantes. Em um estudo realizado por Tang et al. [157] para avaliar a qualidade do biocombustível comercializado nos EUA, foi observado que a qualidade dos produtos é aceitável, todavia, em face a estabilidade oxidativa, 45% das amostras não atingiram a estabilidade mínima de 8 h pelo método de Rancimat. Em outro estudo, Ramos et al. [153] avaliou a estabilidade de biodieseis produzidos de diversas fontes vegetais, como, óleo de oliva, soja, girassol, uva, amêndoa e milho, nenhum dos biodieseis produzidos apresentou estabilidade superior a 6 h sem a adição de antioxidantes. Comparando a composição dos ácidos graxos para o biodiesel de buriti e o de soja, tabela 9, observa-se que os dois apresentam composição similar, porém, apenas o biodiesel de buriti está de acordo com a EN 14112, portanto, pode-se atribuir a maior estabilidade frente a oxidação ao alto teor de β -caroteno que atua retardando o processo de oxidação.

5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Quanto ao teor de β -caroteno no óleo e no biodiesel de buriti, pode-se observar que o processo de transesterificação metílica não influenciou significativamente na concentração deste antioxidante, em que o óleo apresentou concentração de $3,95 \pm 0,24 \text{ mg g}^{-1}$ e após a síntese, lavagem e secagem do biodiesel, cerca de $3,49 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ de β -caroteno se manteve presente. Constatou-se que, embora o β -caroteno seja um antioxidante sensível ao calor e possa ter sido retirado do meio solubilizado no metanol, durante o processo de lavagem do biodiesel, esses processos não representaram perdas significativas na concentração deste antioxidante. Com realização do teste da estabilidade acelerada pelo método de Rancimat, conclui-se que biodiesel de buriti apresenta elevado ponto de indução a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ (49,39 h), além de uma vida de prateleira a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ estimada em 2,81 anos. O óleo de buriti, quando submetido ao teste em Rancimat, em condições iguais ao biodiesel, nas temperaturas de 130 e $120 \text{ }^\circ\text{C}$ apresentou TI de 11,72 e 21,13 h; próximo aos valores encontrados para o biodiesel (11,50 e 24,22 h).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho revelaram novas informações acerca da extração de carotenoides e da estabilidade de biodieseis. A proposta de otimização da extração de β -caroteno empregando planejamento de misturas foi eficiente, com o modelo cúbico especial explicando melhor os dados obtidos para os dois métodos de extração (EC e EAU). Dentre os solventes analisados (acetona, etanol, metanol e acetonitrila), a acetona destacou-se como o mais efetivo na extração do antioxidante para os métodos EC e EAU, com valores $706,8 \pm 9,7 \mu\text{g g}^{-1}$ e $872,8 \pm 18,9 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Constatou-se que a EAU foi mais eficiente que a EC na extração de β -caroteno extraído da polpa de buriti, produzindo extratos mais concentrados, com a melhor condição de extração proposta pelo modelo cubico especial sendo a acetona pura para a EC e a mistura de acetona:etanol (3:1) para a EAU. Dentre todos os solventes, o mais polar, o metanol, foi o que apresentou menor eficiência na extração nos dois métodos avaliados.

Os resultados provenientes das análises do teor de β -caroteno antes e após o processo de transesterificação, revelaram que o processo de tratamento térmico e a lavagem do biodiesel, não resultaram em perdas significativas do antioxidante, em que para o óleo a concentração de β -caroteno foi de $3,95 \pm 0,24 \text{ mg g}^{-1}$ e após a síntese o biodiesel apresentou o teor de $3,49 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ do antioxidante. A alta concentração de antioxidantes presentes no biodiesel de buriti contribuiu para a elevada estabilidade oxidativa, com o tempo de indução de 49,39 h, muito superior a outros biodieseis da literatura e ao estabelecido como limite mínimo pela ANP desenvolvido de acordo com o método de Rancimat (8 h). O teste da estabilidade acelerada estimou que a temperatura de 25 C° o biodiesel de buriti apresenta ponto de indução de 2,81 anos, esse tempo também pode ser entendido como a vida de prateleira para o biodiesel, ou seja, o período em que, a temperatura ambiente, o biodiesel de buriti começaria a se degradar significativamente. A análise do óleo, antes do processo de transesterificação, nas mesmas condições em que o biodiesel foi submetido revelou que ambos apresentam TI próximos nas temperaturas de 130 e 120 °C, possivelmente devido a elevada concentração de antioxidantes presentes no óleo e no biodiesel.

Como perspectivas futuras, tem-se a avaliação de outros fatores como, temperatura, tempo, luminosidade etc, na extração do β -caroteno na amostra de buriti, bem como a possibilidade de avaliação da polaridade quantitativas para misturas, entre solventes por meio de estudos de solvatocromismo, com o intuito de compreender melhor a relação entre a polaridade dos solventes e da mistura na extração de carotenoides em amostras de buriti. Além disso, pretende-se realizar a avaliação da estabilidade oxidativa acelerada para o biodiesel de buriti nas temperaturas de 100 e 90 °C para a melhor compreensão acerca da cinética de degradação desse biocombustível.

REFERÊNCIAS

- [1] Focke WW, Westhuizen I Van Der, Grobler ABL, Nshoane KT, Reddy JK, Luyt AS. The effect of synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. *Fuel* 2012;94:227–33. doi:10.1016/j.fuel.2011.11.061.
- [2] Jian Zhou, Yun Xiong XL. Evaluation of the oxidation stability of biodiesel stabilized with antioxidants using the Rancimat and PDSC methods. *Fuel* 2017;188:61–68. doi:10.1016/j.fuel.2016.10.026.
- [3] Dueso C, Muñoz M, Moreno F, Arroyo J, Gil-Lalaguna N, Bautista A, et al. Performance and emissions of a diesel engine using sunflower biodiesel with a renewable antioxidant additive from bio-oil. *Fuel* 2018;234:276–85. doi:10.1016/j.fuel.2018.07.013.
- [4] Yaakob Z, Narayanan BN, Padikkaparambil S, Unni K. S, Akbar P. M. A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;35:136–53. doi:10.1016/j.rser.2014.03.055.
- [5] Kumar N. Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel* 2017;190:328–50. doi:10.1016/j.fuel.2016.11.001.
- [6] Saluja RK, Kumar V, Sham R. Stability of biodiesel – A review. *Renew Sustain Energy Rev* 2016;62:166–81. doi:10.1016/j.rser.2016.05.001.
- [7] Fu J, Hue BTB, Turn SQ. Oxidation stability of biodiesel derived from waste catfish oil. *Fuel* 2017;202:455–63. doi:10.1016/j.fuel.2017.04.067.
- [8] Bouaid A, Martinez M, Aracil J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. *Fuel* 2007;86:2596–602. doi:10.1016/j.fuel.2007.02.014.
- [9] Rizwanul Fattah IM, Masjuki HH, Kalam MA, Hazrat MA, Masum BM, Imtenan S, et al. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;30:356–70. doi:10.1016/j.rser.2013.10.026.
- [10] Karavalakis G, Stournas S, Karonis D. Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Fuel* 2010;89:2483–9. doi:10.1016/j.fuel.2010.03.041.

- [11] JAKERIA MR, FAZAL MA, HASEEB ASMA. Influence of different factors on the stability of biodiesel: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;30:154–63.
- [12] Romagnoli ÉS, Borsato D, Silva LRC, Chendynski LT, Angilelli KG, Canesin EA. Kinetic parameters of the oxidation reaction of commercial biodiesel with natural antioxidant additives. *Ind Crops Prod* 2018;125:59–64.
doi:10.1016/j.indcrop.2018.08.077.
- [13] Saini RK, Nile SH, Park SW. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. vol. 76. Elsevier B.V.; 2015. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.047.
- [14] Bollinedi H, Dhakane-Lad J, Gopala Krishnan S, Bhowmick P, Prabhu K, Singh N, et al. Kinetics of β -carotene degradation under different storage conditions in transgenic Golden Rice® lines. *Food Chem* 2018.
doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.121.
- [15] Ribeiro BD. Aplicação de Tecnologia Enzimática na Obtenção de β -Caroteno a partir de Óleo de Buriti (*Mauritia vinifera*). 2008.
- [16] Cândido TLN, Silva MR, Agostini-Costa TS. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. *Food Chem* 2015;177:313–9.
doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.041.
- [17] Godoy, H. T., & Rodriguez-Amaya DB. Buriti (*Maurita vinífera*) uma fonte riquíssima de provitamina A. *Arq Biol e Tecnol* 1995;38:109–120.
- [18] Bataglioni GA, da Silva FMA, Eberlin MN, Koolen HHF. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Res Int* 2014;66:396–400.
doi:10.1016/j.foodres.2014.09.035.
- [19] Rawat DS, Joshi G, Lamba BY, Tiwari AK, Kumar P. The effect of binary antioxidant proportions on antioxidant synergy and oxidation stability of *Jatropha* and *Karanja* biodiesels. *Energy* 2015;84:643–55.
doi:10.1016/j.energy.2015.03.024.

- [20] Spacino KR, Borsato D, Buosi GM, Chendynski LT. Determination of kinetic and thermodynamic parameters of the B100 biodiesel oxidation process in mixtures with natural antioxidants. *Fuel Process Technol* 2015;137:366–70. doi:10.1016/j.fuproc.2015.05.006.
- [21] Resende LM, Franca AS, Oliveira LS. Buriti (*Mauritia flexuosa* L . f .) fruit by-products fl ours : Evaluation as source of dietary fi bers and natural antioxidants 2019;270:53–60. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.079.
- [22] Koolen HHF, da Silva FMA, da Silva VSV, Paz WHP, Bataglion GA. Buriti fruit— *Mauritia flexuosa*. Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-803138-4.00004-6.
- [23] Sampaio, M Aurício B Onesso Schmidt ISBES. Harvesting Effects and Population Ecology of the Buriti Palm (*Mauritia flexuosa* L . f . , Arecaceae) in the Jalapão Region , 2008;62:171–81.
- [24] SANTOS LMP. Nutritional and ecological aspects of buriti (*Mauritia flexuosa*) or aguaje (*Linnaeus filius*): A carotene-rich palm fruit from Latin America. *Ecol Food Nutr* 2005;44:345–58.
- [25] Cecília M, Vasconcelos E, Souza VR De. Fruits From The Brazilian Cerrado Region: Physico-Chemical Characterization, Bioactive Compounds, Antioxidant Activities, And Sensory Evaluation. *Food Chem* 2017. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.104.
- [26] RICHTER P, HÄDER DP. *Pigments*. Elsevier Inc.; 2017.
- [27] Parmar RS, Singh C. A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. *Biochem Biophys Reports* 2018;13:22–6. doi:10.1016/j.bbrep.2017.11.002.
- [28] Saini RK, Keum YS. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem* 2018;240:90–103. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.099.
- [29] Mi J, Jia K, Wang JY, Al-babili S. *Analytica Chimica Acta* A rapid LC-MS method for qualitative and quantitative pro fi ling of plant apocarotenoids. *Anal Chim Acta* 2018:1–9. doi:10.1016/j.aca.2018.07.002.

- [30] Sun T, Yuan H, Cao H, Yazdani M, Tadmor Y, Li L. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. *Mol Plant* 2018;11:58–74. doi:10.1016/j.molp.2017.09.010.
- [31] Goodwin TW. The comparative biochemistry of carotenoids. 1^a ed. London: Chapman & Hall LTD; 1952.
- [32] Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog Lipid Res* 2013;52:539–61. doi:10.1016/j.plipres.2013.07.001.
- [33] Giuffrida D, Zoccali M, Giofrè S V, Dugo P, Mondello L. Apocarotenoids determination in *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero, by supercritical fluid chromatography-triple-quadrupole / mass spectrometry. *Food Chem* 2017;231:316–23. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.145.
- [34] Giuliani A. Colors : Properties and Determination of Natural Pigments. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00189-6.
- [35] Meléndez-martínez AJ, Mapelli-brahm P, Stinco CM. Journal of Food Composition and Analysis The colourless carotenoids phytoene and phytofluene : From dietary sources to their usefulness for the functional foods and nutraceuticals industries. *J Food Compos Anal* 2018;67:91–103. doi:10.1016/j.jfca.2018.01.002.
- [36] Rodríguez-amaya DB, Sul F. Bioactive Carotenoids and Xanthophylls in Plant Foods. Elsevier; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-814026-0.22359-7.
- [37] Igielska-kalwat AJ, Olejnik A, PT SC. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2019. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.02.003.
- [38] Niu F, Lu Q, Bu Y, Liu J. Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids : Carotenoids and isoprenoid-based biofuels. *Synth Syst Biotechnol* 2017;1–9. doi:10.1016/j.synbio.2017.08.001.
- [39] Wang E, Dong C, Park RF, Roberts TH. Carotenoid pigments in rust fungi : Extraction, separation, quantification and characterisation. *Fungal Biol Rev* 2018. doi:10.1016/j.fbr.2018.02.002.
- [40] Uenojo M, Maróstica MR, Pastore GM. Carotenóides: Propriedades,

- aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim Nova* 2007;30:616–22. doi:10.1590/S0100-40422007000300022.
- [41] Young AJ, Lowe GM. MINIREVIEW Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids 2001;385:20–7. doi:10.1006/abbi.2000.2149.
- [42] Dias L, Mazzutti S, De JAL, Ferreira SRS, Soares LAL, Stragevitch L, et al. Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO₂, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities. *J Supercrit Fluids* 2018. doi:10.1016/j.supflu.2018.11.011.
- [43] POLYAKOV NE, KRUPPA AI, LESHINA T V., KONOVALOVA TA, KISPERT LD. CAROTENOIDS AS ANTIOXIDANTS: SPIN TRAPPING EPR AND OPTICAL STUDY. *Free Radic Biol Med* 2001;31:43–52.
- [44] Ferreira ICFR. Trends in Food Science & Technology Wastes and by-products : Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications 2017;62. doi:10.1016/j.tifs.2017.01.014.
- [45] Aprodu I, Dumitras L. Thermal Stability of Carotenoids – a -Lactalbumin Complex 2019;2:583–8. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22422-0.
- [46] Yamada R, Yamauchi A, Ando Y, Kumata Y, Ogino H. Modulation of gene expression by cocktail δ -integration to improve carotenoid production in *Saccharomyces cerevisiae* Ryosuke Yamada *, Azusa Yamauchi , Yorichika Ando , Yuki Kumata , Hiroyasu Ogino. *Bioresour Technol* 2018. doi:10.1016/j.biortech.2018.08.044.
- [47] Achir N, Randrianatoandro VA, Bohuon P, Laffargue A, Avallone S. Kinetic study of α -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment 2010;349–61. doi:10.1002/ejlt.200900165.
- [48] Pasaporte MS, Rabaya FJR, Toleco MM, Flores DM. Xanthophyll content of selected vegetables commonly consumed in the Philippines and the effect of boiling. *FOOD Chem* 2014;158:35–40. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.090.
- [49] Cervantes-paz B, Yahia EM, Ornelas-paz JDJ, Victoria-campos CI, Ibarra-junquera V, Pérez-martínez JD, et al. Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeño peppers at

- intermediate stages of ripening. *Food Chem* 2014;146:188–96.
doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.060.
- [50] Pezeshki A, Hamishehkar H. Author 's Accepted Manuscript. *Food Biosci* 2018. doi:10.1016/j.fbio.2018.11.004.
- [51] Hejri A, Khosravi A, Gharanjig K, Hejazi M. Optimisation of the formulation of β -carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. *FOOD Chem* 2013;141:117–23. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.080.
- [52] Rodriguez-Amaya DB. Carotenes and xanthophylls as antioxidants. Elsevier Ltd; 2015. doi:10.1016/B978-1-78242-089-7.00002-6.
- [53] Kunzler A, Ribeiro CT, Gasparotto J, Petiz LL, Thais H, Delgado J, et al. The effects of retinol oral supplementation in 6-hydroxydopamine dopaminergic denervation model in Wistar rats. *Neurochem Int* 2019. doi:10.1016/j.neuint.2019.02.002.
- [54] Kasperczyk J, Osta A, Zalejska-fiolka J, Birkner E. Beta-carotene reduces oxidative stress , improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers 2014;280:36–41. doi:10.1016/j.taap.2014.07.006.
- [55] Zhou L, Ouyang L, Lin S, Chen S, Liu Y, Zhou W, et al. International Immunopharmacology Protective role of β -carotene against oxidative stress and neuroinflammation in a rat model of spinal cord injury. *Int Immunopharmacol* 2018;61:92–9. doi:10.1016/j.intimp.2018.05.022.
- [56] Nagarajan J. *Nutraceutical and Functional Food Components*. Nutraceutical and Functional Food Components; 2017.
- [57] Jaeschke DP, Marczak LDF, Mercali GD. Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. *Food Chem* 2016;199:128–34. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.117.
- [58] Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants 2006;17:300–12. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004.
- [59] Yue Y, Qiu Z-D, Xian-You Q, Deng A-P, Yuan Y, Huang L-Q, et al. Discoursing

- on Soxhlet extraction of ginseng using association analysis and scanning electron microscopy. *J Pharm Anal* 2018. doi:10.1016/j.jpha.2018.08.003.
- [60] Abrahamsson AV, Cunico LP, Nilsson B, Turner C. SC. *J Supercrit Fluids* 2018. doi:10.1016/j.supflu.2018.05.007.
- [61] Lima MDA, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. The Journal of Supercritical Fluids Optimisation and modelling of supercritical CO₂ extraction process of carotenoids from carrot peels G R A P H I C A L A B S T R A C T. *J Supercrit Fluids* 2018;133:94–102. doi:10.1016/j.supflu.2017.09.028.
- [62] Hiranvarachat B, Devahastin S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation : Extraction of carotenoids from carrot peels. *J Food Eng* 2014;126:17–26. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.024.
- [63] Luque-garcı JL, Castro MDL De. Ultrasound : a powerful tool for leaching 2003;22:41–7. doi:10.1016/S0165-9936(03)00102-X.
- [64] Romdhane M, Gourdon C. Investigation in solid – liquid extraction : influence of ultrasound. *Chem Eng J* 2002;87:11–9.
- [65] Rammuni MN, Ariyadasa TU, Nimarshana PH V, Attalage RA. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chem* 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.066.
- [66] Heffernan N, Smyth TJ, Fitzgerald RJ, Vila-soler A, Mendiola J, Ibáñez E, et al. Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016. doi:10.1016/j.ifset.2016.06.004.
- [67] Maurer MM, Mein JR, Chaudhuri SK, Howard L. An improved UHPLC-UV method for separation and quantification of carotenoids in vegetable crops. *FOOD Chem* 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.038.
- [68] Granado-Lorencio F, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B, Hernández-Álvarez E. Biomarkers of carotenoid bioavailability. *Food Res Int* 2017;99:902–16. doi:10.1016/j.foodres.2017.03.036.
- [69] Hulshof PJM, Kosmeijer-Schuil T, West CE, Hollman PCH. Quick screening of

- maize kernels for provitamin A content. *J Food Compos Anal* 2007;20:655–61. doi:10.1016/j.jfca.2006.04.014.
- [70] Kimura M, Kobori CN, Rodriguez-Amaya DB, Nestel P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chem* 2007;100:1734–46. doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.020.
- [71] Wang N, Manabe Y, Sugawara T, Paul NA, Zhao J. Identification and biological activities of carotenoids from the freshwater alga (*Oedogonium intermedium*). *Food Chem* 2017. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.075.
- [72] Luterotti S, Kljak K. Spectrophotometric estimation of total carotenoids in cereal grain products. *Acta Chim Slov* 2010;57:781–7.
- [73] Biswas AK, Sahoo J, Chatli MK. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *LWT - Food Sci Technol* 2011;44:1809–13. doi:10.1016/j.lwt.2011.03.017.
- [74] Mariutti LRB, Mercadante AZ. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? *Arch Biochem Biophys* 2018;648:36–43. doi:10.1016/j.abb.2018.04.005.
- [75] Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends Anal Chem* 2014;56:49–73. doi:10.1016/j.trac.2013.12.011.
- [76] Craft N, Craft NE. Relative solubility , stability , and absorptivity of lutein and β - carotene in organic solvents in *Organic Solvents*. *NIST Spec Publ* 2016:431–4. doi:10.1021/jf00015a013.
- [77] Rivera S, Canela R. Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in Maize. *Molecules* 2012;17:11255–68. doi:10.3390/molecules170911255.
- [78] Naderi F, Farajtabar A, Gharib F. Solvatochromic and preferential solvation of fluorescein in some water-alcoholic mixed solvents. *J Mol Liq* 2014;190:126–32. doi:10.1016/j.molliq.2013.10.028.
- [79] Viegas IMA, Barradas Filho AO, Marques EP, Pereira CF, Marques ALB.

- Oxidative stability of biodiesel by mixture design and a four-component diagram. *Fuel* 2018;219:389–98. doi:10.1016/j.fuel.2018.01.124.
- [80] Cerón-Carrasco JP, Jacquemin D, Laurence C, Planchat A, Reichardt C, Sraïdi K. Solvent polarity scales: Determination of new ET(30) values for 84 organic solvents. *J Phys Org Chem* 2014;27:512–8. doi:10.1002/poc.3293.
- [81] Goula AM, Ververi M, Adamopoulou A, Kaderides K. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrason Sonochem* 2017;34:821–30. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.07.022.
- [82] Luengo E, Condón-Abanto S, Condón S, Álvarez I, Raso J. Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Sep Purif Technol* 2014;136:130–6. doi:10.1016/j.seppur.2014.09.008.
- [83] Ordóñez-Santos LE, Pinzón-Zarate LX, González-Salcedo LO. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. *Ultrason Sonochem* 2015;27:560–6. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.04.010.
- [84] Moreira GC, de Souza Dias F. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. *Microchem J* 2018;141:247–52. doi:10.1016/j.microc.2018.04.035.
- [85] Zaghdoudi K, Pontvianne S, Framboisier X, Achard M, Kudaibergenova R, Ayadi-Trabelsi M, et al. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chem* 2015;184:131–9. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.072.
- [86] Lianfu Z, Xiaolin D. Establishment of a new lycopene determination method. *Food Ferment Ind* 2001;27:51–5.
- [87] Lianfu Z, Zelong L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem* 2008;15:731–7.

- [88] Eh AL-S, Teoh S-G. Novel modified ultrasonication technique for the extraction of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem* 2012;19:151–9.
- [89] Kumcuoglu S, Yilmaz T, Tavman S. Ultrasound assisted extraction of lycopene from tomato processing wastes. *J Food Sci Technol* 2013:1–6.
- [90] Almahy HA, Ali MA, Band Ali AA. Extraction of Carotenoids as Natural dyes from the *Daucus carota* Linn (carrot) using Ultrasound in Kingdom of Saudi Arabia. *Res J Chem Sci* 2013;3:63–6.
- [91] Ye JD, Wang K, Li F-D, Sun Y-Z, Liu X-H. Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal, blood meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein levels. *Aquac Nutr* 2011;17:337–47.
- [92] Xu Y, Pan S. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.). *Ultrason Sonochem* 2013;20:1026–32.
- [93] Kljak K, Grbeša D. Carotenoid content and antioxidant activity of hexane extracts from selected Croatian corn hybrids. *Food Chem* 2015;167:402–8. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.002.
- [94] Rodriguez D. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. 2001.
- [95] Li Y, Fabiano-Tixier AS, Tomao V, Cravotto G, Chemat F. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrason Sonochem* 2013;20:12–8. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.07.005.
- [96] Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfan J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Compos Anal* 2008;21:445–63. doi:10.1016/j.jfca.2008.04.001.
- [97] WHO. World Health Organization (2009) Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995 – 2005. 2009.
- [98] Kourouma V, Mu T-H, Zhang M, Sun H-N. Effects of cooking process on carotenoids and antioxidant activity of orange-fleshed sweet potato. *Lwt* 2019.

doi:10.1016/j.lwt.2019.01.011.

- [99] Kumar N. Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. *Fuel* 2017;190:328–50. doi:10.1016/j.fuel.2016.11.001.
- [100] Sahar A, Rahman UU, Aadil RM, Ishaq A. Stabilization of Carotenoids in Foods. *Ref Modul Food Sci* 2018:1–16. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21670-3.
- [101] Altin R, Çetinkaya S, Yucesu HS. The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines. *Energy Convers Manag* 2001;42:529–38.
- [102] Balat M, Balat H. Progress in biodiesel processing. *Appl Energy* 2010;87:1815–35.
- [103] Balat M, Balat H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl Energy* 2009;86:2273–82.
- [104] Dueso C, Muñoz M, Moreno F, Arroyo J, Gil-Lalaguna N, Bautista A, et al. Performance and emissions of a diesel engine using sunflower biodiesel with a renewable antioxidant additive from bio-oil. *Fuel* 2018;234:276–85. doi:10.1016/j.fuel.2018.07.013.
- [105] Lam MK, Lee KT, Mohamed AR. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel. *Biotechnol Adv* 2010;28:500–18.
- [106] Ramos LP, Kucek KT, Domingos AK, Wilhelm HM. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Rev Biotechnol Ciência Desenvolv* 2003;31:28–37.
- [107] Pullen J, Saeed K. An overview of biodiesel oxidation stability. *Renew Sustain Energy Rev* 2012;16:5924–50. doi:10.1016/j.rser.2012.06.024.
- [108] Varatharajan K, Pushparani DS. Screening of antioxidant additives for biodiesel fuels. *Renew Sustain Energy Rev* 2018;82:2017–28. doi:10.1016/j.rser.2017.07.020.
- [109] Demirbas A. Studies on cottonseed oil biodiesel prepared in non-catalytic SCF conditions. *Bioresour Technol* 2008;99:2008.

- [110] Menezes RS. Biodiesel no Brasil: Impulso Tecnológico. Lavras; 2016.
- [111] Jain S, Sharma MP. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. *Renew Sustain Energy Rev* 2010;14:1937–47. doi:10.1016/j.rser.2010.04.011.
- [112] Yaakob Z, Narayanan BN, Padikkaparambil S, Unni K. S, Akbar P. M. A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;35:136–53. doi:10.1016/j.rser.2014.03.055.
- [113] Pinto AC, Guarieiro LL, Rezende MJC, Ribeiro NM, Torres EA, Lopes WA, et al. Biodiesel: An overview. *J Brazilian Chem Soc* 2005;16:1313–30.
- [114] Lang XD. Preparation and characterization of bio-diesel from various bio-oils. *Bioresour Technol* 2001;80:53–62.
- [115] Rawat DS, Joshi G, Lamba BY, Tiwari AK, Kumar P. The effect of binary antioxidant proportions on antioxidant synergy and oxidation stability of *Jatropha* and *Karanja* biodiesels. *Energy* 2015;84:643–55. doi:10.1016/j.energy.2015.03.024.
- [116] Rathmann R, Szklo A, Schaeffer R. Land use competition for production of food and liquid biofuels: An analysis of the arguments in the current debate. *Renew Energy* 2010;35:14–22.
- [117] Enweremadu CC, Mbarawa MM. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil. *Energy Rev* 2009;13:2205–24.
- [118] Encinar JM, González JF, Rodríguez-Reinares A. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. *Fuel Process Technol* 2007;88:513–22.
- [119] Schuchardt U, Sercheli R, Vargas RM. Transesterification of vegetable oils: a review. *J Brazilian Chem Soc* 2008;9:199–210.
- [120] Vicente G, Martínez M, Aracil J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour Technol* 2004;92:297–305.
- [121] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of

- oils. *J Biosci Bioeng* 2001;92:405–16.
- [122] Canakci M, Gerpen JH Van. Biodiesel production via acid catalysis. *Am Soc Agric Eng* 1999;42:1203–10.
- [123] Maçaíra J, Santana A, Recasens F, Angeles LM. Biodiesel production using supercritical methanol/carbon dioxide mixtures in a continuous reactor. *Fuel* 2011;90:2280–8.
- [124] Cetinkaya M, Karaosmanoglu F. Optimization of base catalyzed transesterification reaction of used cooking oil. *Energy Fuel* 2004;18:1888–95.
- [125] Aransiola EF, Ojumu T V, Oyekola OO, Madzimbamuto TF, Ikhuomogbe DIO. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass and Bioenergy* 2013;30:1–22.
- [126] Parente EJS. Proposta de um óleo diesel alternativo. UFC; 1993.
- [127] Iturra AR. Histórico do biodiesel no Brasil. Brasília: 2003.
- [128] ANP -Agência Nacional de Petróleo GN e B. Produção de biocombustíveis. Março 2017 n.d. <http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos> (accessed February 10, 2019).
- [129] ANP -Agência Nacional de Petróleo GN e B. Resultados de todos os leilões 2005-2016 n.d. <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017> (accessed February 10, 2019).
- [130] Knothe G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process Technol* 2007;88:669–77. doi:10.1016/j.fuproc.2007.01.005.
- [131] HOEKMAN SK, BROCH A, ROBBINS C, CENICEROS E, NATARAJAN M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew Sustain Energy Rev* 2012;16:143–69.
- [132] Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Commun* 1990;9:1–32.
- [133] Shahidi F, Wanasundara PKJ. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;32:67–103.

- [134] KARAVALAKIS G, HILARI D, GIVALOU L, KARONIS D, STOURNAS S. Storage stability and ageing effect of biodiesel blends treated with different antioxidants. *Energy* 2011;36:369–74.
- [135] Lapuerta M, Rodríguez-Ferández J, Ramos Á, Alvarez B. Effect of the test temperature and anti-oxidant addition on the oxidation stability of commercial biodiesel fuels. *Fuel* 2012;93:391–6.
- [136] Ferrari RA, Souza WL. Avaliacao da Estabilidade oxidativa de Biodiesel de Oleo de Girassol com antioxidantes. *Quim Nova* 2009;32:106–11.
- [137] Luo M, Zhang RY, Zheng Z, Wang JL, Ji JB. Impact of some natural derivatives on the oxidative stability of soybean oil based biodiesel. *J Brazilian Chem Soc* 2012;23:241–6.
- [138] Damasceno SS, Santos NA, Santos IMG, Souza AL, Souza AG, Queiroz N. Caffeic and ferulic acids: an investigation of the effect of antioxidants on the stability of soybean biodiesel during storage. *Fuel* 2013;107:641–6.
- [139] Algar SO, Martos NR, Díaz AM. A continuous flow system combined with a sensing fluorimetric transducer for the determination of β -naphthol. *Microchem J* 2002;73.
- [140] Liang YC, May CY, Foon CS, Ngan MA, Hock CC, Basiron Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. *Fuel* 2006;85:867–70. doi:10.1016/j.fuel.2005.09.003.
- [141] Sarin A, Singh NP, Sarin R, Malhotra RK. Natural and synthetic antioxidants: Influence on the oxidative stability of biodiesel synthesized from non-edible oil. *Energy* 2010;35:4645–8. doi:10.1016/j.energy.2010.09.044.
- [142] Milanez JT, Neves LC, Colombo RC, Shahab M, Roberto SR. Bioactive compounds and antioxidant activity of buriti fruits, during the postharvest, harvested at different ripening stages. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2018;227:10–21. doi:10.1016/j.scienta.2017.08.045.
- [143] Ribeiro D, Freitas M, Silva AMS, Carvalho F, Fernandes E. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food Chem Toxicol* 2018;120:681–99. doi:10.1016/j.fct.2018.07.060.

- [144] Rizwanul Fattah IM, Masjuki HH, Kalam MA, Hazrat MA, Masum BM, Imtenan S, et al. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;30:356–70. doi:10.1016/j.rser.2013.10.026.
- [145] McCormick RL, Ratcliff M, Moens L, Lawrence R. Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests. *Fuel Process Technol* 2007;88:651–7. doi:10.1016/j.fuproc.2007.01.006.
- [146] Fernandes DM, Serqueira DS, Portela FM, Assunção RMN, Munoz RAA, Terrones MGH. Preparation and characterization of methyl and ethyl biodiesel from cottonseed oil and effect of tert-butylhydroquinone on its oxidative stability. *Fuel* 2012;97:658–61. doi:10.1016/j.fuel.2012.01.067.
- [147] Sharma YC, Singh B, Upadhyay SN. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* 2008;87:2355–73. doi:10.1016/j.fuel.2008.01.014.
- [148] Serra JL, Rodrigues AM da C, de Freitas RA, Meirelles AJ de A, Darnet SH, Silva LHM da. Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition. *Food Res Int* 2019;116:12–9. doi:10.1016/j.foodres.2018.12.028.
- [149] Ty B, Choo Y. Oxidation and Thermal Degradation of Carotenoids. *J Oil Palm Res* 1999;11:62–78.
- [150] Fratianni A, Cinquanta L, Panfili G. Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Sci Technol* 2010;43:867–71. doi:10.1016/j.lwt.2010.01.011.
- [151] Ribeiro HS, Chu BS, Ichikawa S, Nakajima M. Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocoll* 2008;22:12–7. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.04.009.
- [152] Hasenhuettl GL, Wan PJ. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the metrohm rancimat. *J Am Oil Chem Soc* 1992;69:525–7. doi:10.1007/BF02636102.
- [153] Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á. Influence of fatty

acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour Technol* 2009;100:261–8. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.039.

- [154] Medeiros MC, Aquino JS, Soares J, Figueiroa EB, Mesquita HM, Pessoa DC, et al. Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. *Int J Dev Neurosci* 2015;46:7–13. doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.05.001.
- [155] Durães JA, Drummond AL, Pimentel TAPF, Murta MM, Bicalho F da S, Moreira SGC, et al. Absorption and photoluminescence of Buriti oil/polystyrene and Buriti oil/poly(methyl methacrylate) blends. *Eur Polym J* 2006;42:3324–32. doi:10.1016/j.eurpolymj.2006.09.012.
- [156] Gao A, Sun X, Liang X, Fang X, Zhu Z, Xie Y. The alkyl peroxy radicals and their anions: Structures and electron affinities. *J Mol Struct THEOCHEM* 2008;862:105–11. doi:10.1016/j.theochem.2008.05.001.
- [157] Tang H, Abunasser N, Wang A, Clark BR, Wadumesthrige K, Zeng S, et al. Quality survey of biodiesel blends sold at retail stations. *Fuel* 2008;87:2951–5. doi:10.1016/j.fuel.2008.04.029.