



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**EXTRATO DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis L.*): UM
ANTIOXIDANTE EFICIENTE PARA USO NO BIODIESEL**

Maria Lins de Medeiros

João Pessoa – PB

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Extrato de Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Um
antioxidante eficiente para uso no biodiesel**

Maria Lins de Medeiros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientadores: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

Prof.^a Dr.^a Antônia Lúcia de Souza

João Pessoa – PB

2013

M488e Medeiros, Maria Lins de.

Extrato de alecrim (Rosmarinus officinalis L.): um antioxidante eficiente para uso no biodiesel / Maria Lins de Medeiros.- João Pessoa, 2013.

74f. : il.

Orientadores: Antônio Gouveia de Souza e Antônia Lúcia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

1. Química. 2. Biodiesel. 3. Alecrim (Rosmarinus officinalis L.). 4. Sinergismo antioxidante. 5. Estabilidade oxidativa. 6. Rancimat.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

Extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): um oxidante eficiente para uso no biodiesel.

Tese de Doutorado de Maria Lins de Medeiros aprovada pela banca examinadora em 13 de dezembro de 2013:



Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza
Orientador/Presidente

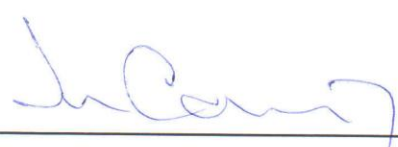
Profa. Dra. Antônia Lúcia de Souza
2º. Orientadora



Prof. Dr. Luiz Edmundo Bastos Soledade
Examinador



Profa. Dra. Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro
Examinadora



Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho
Examinador



Profa. Dra. Marta Maria da Conceição
Examinadora

Dedico:

Ao Deus Triuno (Pai, Filho e Espírito Santo) que em sua soberania me concedeu a graça de realizar um sonho, adormecido.

Aos meus filhos, Daniel e Danilo e às minhas noras, Pollyanna e Andrea, por todo incentivo, apoio, compreensão, solidariedade e presença em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus porque Ele é tudo na minha vida. Fazendo-me superar as dificuldades encontradas no percurso deste trabalho, pelo fortalecimento espiritual, pelo imenso amor concedido, pela sua presença em todos os momentos e por me carregar em seus braços.

Aos meus irmãos, Ana, Argemira, Almira, Mércia, João e Rafael, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Dr. Antônio Gouveia, orientador e coordenador do LACOM, pela confiança, apoio, dedicação, profissionalismo, encorajamento e pela convivência agradável por muitos anos. Um grande amigo!

Às Professoras Dr^a. Antônia Lúcia (co-orientadora) e a Neide pelas sugestões, críticas, experiências compartilhadas, ajuda e amizade.

Ao Professor Dr. José Rodrigues pela sua presteza e dedicação em ajudar-me em todos os momentos que precisei, o meu muito obrigada!

Aos professores, Iêda, Ari, Gardênia, Graça, Marçal, Petrônio, Antônio, Aldeisa e Tereza.

À minha amada amiga Angela, pela solidariedade, apoio, confiança e pelos momentos inesquecíveis de descontrações. Deus lhe abençoe!

Às amigas Neide e Lúcia pela ajuda prestada nos momentos difíceis, amizade solidificada e, pelos bons momentos de convivência.

Às minhas filhas amadas, Clediana, Flavinha e Sara, o meu muito obrigada de poder chamá-las de filhas, pelos abraços e sorrisos recebidos todas as manhãs, pela solidariedade e amizades verdadeiras e pelos momentos inesquecíveis de descontração. Deus as guarde!

Aos colegas: Alex, Andréa Melo, Andréa Suame, Marco Aurélio, Poliana, Jaqueline, Cassandra, Alcilene, Yago, Pedro, Tiago, Márcia, João, Jerffeson, Guilherme, Rebeca, Marcos Pequeno, Kiko, Ielena, Nataly, Raul, Anderson, Maristela, Evaneide, Gabriel, Fagner, Geuza, Manuel, Marileide, Isabelle, e a todos os outros, pelo companheirismo e agradável convívio.

Ao meu sobrinho, Arthur pelo seu apoio e contribuição nos momentos de dificuldade com o notebook e a internet. Meu muito obrigada! Que Deus lhe abençoe.

RESUMO

Biodiesel é suscetível a processos oxidativos devido a vários fatores, incluindo a presença de oxigênio, calor, luz, enzimas, traços de metais, entre outros. A estabilidade à oxidação é um importante critério de qualidade para o biodiesel. A literatura reporta pesquisas feitas com antioxidantes sintéticos e naturais, adicionados à biodieseis de fontes variadas, objetivando aumentar a estabilidade oxidativa e, conseqüentemente, o tempo de vida útil do mesmo. Além, de proporcionar a redução de emissões de gases tóxicos. Neste estudo, foram utilizados extratos de alecrim e antioxidantes sintéticos para retardar a oxidação do biodiesel metílico do óleo de algodão. Este biodiesel foi aditivado e armazenado em depósitos de aço carbono. Durante o armazenamento, foi observada a melhor estabilidade oxidativa de biodiesel adicionado com TBHQ e com a mistura de extrato de alecrim com TBHQ. Estas formulações antioxidantes protegeram o biodiesel por 90 dias, enquanto que o extrato etanólico de alecrim protegeu por 60 dias e o antioxidante sintético BHT não cumpriu os parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. O extrato etanólico de alecrim pode ser considerado promissor para manter a qualidade do biodiesel. Além disso, o perfil térmico obtido por análise termogravimétrica mostrou que o extrato etanólico de alecrim pode ser considerado um termoestável, uma vez que mostrou uma perda de massa, provavelmente, acima de 190 °C.

Palavras-chave: biodiesel, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sinergismo antioxidante, estabilidade oxidativa, Rancimat.

ABSTRACT

Biodiesel is susceptible to oxidative processes due to several factors, including the presence of oxygen, heat, light, enzymes, trace of metals, among others. Oxidation stability is an important quality criterium for biodiesel. The literature reports surveys of natural and synthetic antioxidants added to biodiesels from various sources, in order to increase the oxidative stability and thus the lifetime thereof. Beyond this, it provides reducing emissions of toxic gases. In this study, rosemary extracts and synthetic antioxidants were used to retard the oxidation of methyl biodiesel cotton (BA). This biodiesel was additive and stored in carbon steel tanks. During storage, the better oxidative stability was observed, for the biodiesel with the addition of TBHQ and the addition of the mixture of rosemary extract and TBHQ. These antioxidant formulations protected the biodiesel for 90 days, while the ethanol extract of rosemary protected for 60 days and the synthetic antioxidant BHT has not fulfilled the parameters established by ANP. The ethanol extract of rosemary can be considered promising to maintain the quality of biodiesel. Furthermore, the thermal profile obtained by thermogravimetric analysis showed that the ethanolic extract of rosemary may be considered a heat stable since it shows a loss of mass, above 190 ° C.

Keywords: biodiesel, rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) antioxidant synergism, oxidative stability, Rancimat.

V

LISTA DE ABREVIÇÕES

%AA	Percentagem de atividade antioxidante
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BA	Biodiesel metílico de algodão
BAEB	Biodiesel metílico de algodão aditivado com EEA
BAHT	Biodiesel metílico de algodão aditivado com BHT
BAT	Biodiesel metílico de algodão aditivado com TBHQ
BATEB	Biodiesel metílico de algodão aditivado com TBHQ e EEA
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CEN	Comité Européen de Normalization
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH•	2,2 –difeníl–beta–picril–hidrazila
DTG	Derivada da termogravimetria
EAG	Equivalente grama do ácido gálico
EC ₅₀	Concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical DPPH•
ECA	Extrato clorofórmico de alecrim
EEA	Extrato etanólico de alecrim
EPA	Agência de Proteção Ambiental
FRAP	<i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i>
FT	Fenólicos totais
IA	Índice de acidez
II	Índice de iodo
IP	Índice de peróxido

ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
L•	Radical livre do ácido graxo
LACOM	Laboratório de Combustíveis e Materiais
LH	Ácido Linoléico
NC	Número de cetano
PEFF	Ponto de entupimento de filtro a frio
PF	Ponto de fluidez
PG	Propil-galato
PI	Período de indução
PN	Ponto de névoa
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
TBHQ	ter-butil-hidroquinona
TG	Termogravimetria
TPTZ	2,4,6 - tri (2-piridil) -1,3,5 - triazina
TROLOX	6 - hidroxil - 2,5,7,8-tetrametilcroman - 2 - ácido carboxílico
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de Reação de Auto-oxidação	22
Figura 2 - Formas de ressonância do ácido linoléico pela abstração dos hidrogênios <i>alílico</i> e <i>bis-alílico</i>	24
Figura 3 - Estruturas dos hidroperóxidos isômeros do ácido linoléico.....	25
Figura 4 - Mecanismo da formação do oxigênio singlete	26
Figura 5 – Hidroperóxidos do ácido linoléico produzidos na foto-oxidação.....	27
Figura 6 - Estrutura química dos antioxidantes sintéticos mais conhecidos.....	28
Figura 7 - Mecanismo de ação de um antioxidante diante de um radical livre.	29
Figura 8 - Mecanismo de ação de flavonoide frente a um radical livre (a) e Íon metálico (b).....	31
Figura 9 – Algumas estruturas de compostos fenólicos identificados no alecrim.....	32
Figura 10 – Fluxograma de obtenção dos extratos etanólico e clorofórmico	35
Figura 11 – Captura do DPPH• pela ação de um antioxidante.....	45
Figura 12 – Redução do Fe(III) à Fe(II) no complexo TPTZ.....	46
Figura 13 - Depósitos de armazenamento, contendo o biodiesel de algodão aditivado sem aditivo	49
Figura 14 - Curvas TG/DTG para o EEA.....	52
Figura 16 - Curvas TG/DTG para o BHT	53
Figura 17 - Curvas TG/DTG para o TBHQ	53
Figura 18 - Índice de Peróxido (a), Dienos (b) e Trienos Conjugados (c), em função dos dias de estocagem para cada amostra.....	62
Figura 19 - Valores de PI obtidos pelo método Rancimat em função dos dias de estocagem para cada amostra.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programação da temperatura do forno do cromatógrafo a gás, para o BA	40
Tabela 2 - Código das amostras do BA sem aditivo e aditivadas.....	44
Tabela 3 - Código das amostras do BA sem aditivo e aditivado para o armazenamento	48
Tabela 4 - Rendimento dos extratos de alecrim	50
Tabela 5 - Valores obtidos das curvas TG/DTG dos extratos EEA, ECA, TBHQ e BHT.	51
Tabela 6 - Características do BA.....	54
Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos do BA	55
Tabela 8 - Rancimat das amostras do BA sem aditivo e aditivado, expresso em período de indução (PI)	57
Tabela 9 - Teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante, determinada pelos métodos DPPH•, FRAP e Sist. β -c/ác. L., do extrato etanólico de alecrim.....	58
Tabela 10 - Código das amostras do BA nas suas concentrações para o armazenamento	59
Tabela 11 - Resultados das características do BA armazenado por 90 dias	60

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Índice de Iodo	37
Equação 2 - Índice de Acidez.....	37
Equação 3 - Índice de Peróxido	38
Equação 4 - Viscosidade Cinemática	40
Equação 5 - Percentagem da atividade antioxidante do extrato etanólico de alecrim	46
Equação 6 – Percentagem de Oxidação.....	48
Equação 7 – Percentagem de Proteção.....	48
Equação 8 - Percentual de Oxibilidade de Biodiesel.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1. ÓLEOS E BIODIESEL	19
3.2. OXIDAÇÃO DE BIODIESEIS	20
3.2.1. Auto-oxidação	21
3.2.2. Foto-oxidação	25
3.2.3. Oxidação enzimática	27
3.3. ANTIOXIDANTES	28
3.3.1. Antioxidantes sintéticos	28
3.3.2. Antioxidantes naturais	30
3.3.2.1. Alecrim como antioxidante	31
4. METODOLOGIA	34
4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ALECRIM	34
4.2. TERMOGRAVIMETRIA DOS ANTIOXIDANTES EEA, ECA, BHT e TBHQ ...	36
4.3. BIODIESEL METÁLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO (BA)	36
4.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL METÁLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO	36
4.4.1. Índice de iodo (método-EN 14111: 2003-E)	36
4.4.2. Índice de acidez (método-ASTM D 664-09A)	37
4.4.3. Índice de peróxido (AOCS OFFICIAL METHOD CD8-53)	38
4.4.4. Dienos e trienos	39
4.4.5. Determinação da composição dos ácidos graxos no biodiesel, por cromatografia gasosa	39
4.4.6. Viscosidade cinemática (método ABNT NBR 10441)	40
4.4.7. Propriedades de fluxo à frio (ABNT NBR 14747)	41
4.4.8. Ponto de fulgor (método ABNT NBR 14598)	41
4.4.9. Massa específica (método ABNT NBR 7148)	42

4.4.10. Teor de água (ASTM D 6304).....	42
4.4.11. Número de cetano (método ASTM D 613).....	42
4.4.12. Estabilidade à oxidação	42
4.4.12.1. Rancimat (método EN 14 112)	43
4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS DE BODIESEL ADITIVADAS	43
4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DO ALECRIM.....	44
4.6.1. Determinação do teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteau (FT)	44
4.6.2. Determinação da atividade antioxidante	45
4.6.2.1. Método de sequestro de radicais DPPH• (2,2–difetil-1-picril-hidrazila)	45
4.6.2.2. Método de redução do ferro- FRAP (<i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i>)	46
4.6.2.3. Método do sistema β -caroteno / ácido linoléico (Sist. β -c/ác.L).....	47
4.7. ARMAZENAMENTO DO BODIESEL METÍLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO .	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE ALECRIM	50
5.2. PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DOS ANTIOXIDANTES EEA, ECA, BHT E TBHQ.....	50
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO BODIESEL METÍLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO - BA	54
5.4. ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BA ADITIVADO COM EEA, ECA, BHT E TBHQ.....	56
5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE ALECRIM	57
5.6. ARMAZENAMENTO DO BODIESEL METÍLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO .	59
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

No contexto energético mundial, o biodiesel se destaca por ser uma das fontes alternativas ao diesel fóssil. É obtido a partir da reação de transesterificação de óleos e gorduras. Apresenta propriedades combustíveis compatíveis com as do petrodiesel, podendo, portanto, ser utilizada nos motores do ciclo diesel sem que haja a necessidade de adaptações nos referidos motores.

O biodiesel oferece inúmeras vantagens em relação ao diesel fóssil. Apresenta lubricidade superior, é praticamente isento de enxofre, possui origem renovável e sustentável, maior ponto de fulgor, repercutindo em maior segurança no manuseio e transporte, menor emissão de poluentes na atmosfera, além de ser biodegradável (KNOTHE, 2006). No entanto, a baixa estabilidade do biodiesel ocorre por ser constituído por uma mistura de ésteres de ácidos graxos insaturados e saturados. O mesmo pode sofrer oxidação quando estocado por longos períodos, ocasionando alteração nas propriedades físico-químicas, provocando a redução da qualidade do combustível e tornando-o inadequado ao uso (KNOTHE, 2006).

Alternativas para melhorar a resistência do biodiesel à auto-oxidação têm sido pesquisadas através da adição de antioxidantes e preparação de blends de biodiesel / diesel e de uso de misturas de óleos de diferentes estabilidades oxidativas no preparo do biodiesel. A literatura reporta pesquisas feitas com antioxidantes sintéticos e naturais adicionados ao biodiesel de fontes variadas objetivando aumentar o tempo de vida útil do mesmo (DUNN, 2005). Os antioxidantes butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) além de aumentarem a estabilidade oxidativa do biodiesel, também proporcionam a redução nas emissões dos óxidos de nitrogênio (LIANG, 2006).

Os antioxidantes sintéticos e suas misturas, possivelmente, são a combinação mais adequada para uso em biodiesel, entretanto o uso de extratos vegetais pode ser uma opção para o controle das reações oxidativas, pois a indústria de óleos e gorduras já o faz com sucesso. Dentre os grupos de substâncias naturais com atividade antioxidante estão os compostos fenólicos, que podem ser encontrados em frutas, ervas e cereais. Vários estudos demonstram a atividade antioxidante de extratos de fontes vegetais que ajudam na prevenção do estresse oxidativo (FU et al., 2011; WOJDYŁO et al., 2007; CAI et al., 2004; DIWANI; RAFIE; HAWASH, 2009).

Entre as fontes vegetais, o *Rosmarinus officinalis* L., alecrim, planta originária da região do Mediterrâneo, adaptado em várias partes do mundo, tem se destacado por apresentar grande número de compostos que são fontes potenciais de antioxidantes naturais, como os ácidos fenólicos, flavonóides, diterpenóides e triterpenos fenólicos, ricos em ácido carnósico, carnosol, rosmanol e ácido rosmarínico (ALMELA et al., 2006; MAHMOUD et al., 2005). Diversos estudos relatam que a ação antioxidante dos extratos de alecrim ocorre através do sequestro de radicais livres retardando a oxidação lipídica (NOGALA-KALUCKA et al., 2005).

Considerando o exposto acima, este trabalho investigou a eficiência antioxidante dos extratos de alecrim e o efeito sinérgico da combinação destes extratos com antioxidantes sintéticos no controle da estabilidade oxidativa do biodiesel metílico do óleo de algodão, através do método Rancimat.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência dos extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e o efeito sinérgico com antioxidantes comerciais no controle da estabilidade oxidativa do biodiesel metílico do óleo de algodão.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos de alecrim por diferentes solventes (etanol e clorofórmico);
- Avaliar a estabilidade térmica dos extratos etanólico e clorofórmico de alecrim, e dos antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ, por termogravimetria;
- Caracterizar o biodiesel metílico de algodão, segundo as exigências da ANP;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico de alecrim, através da determinação do conteúdo de fenólicos totais e da capacidade antioxidante;
- Avaliar o efeito protetor dos antioxidantes sintéticos (BHT e TBHQ), do natural (EEA), e o sinergismo dos antioxidantes EEA e TBHQ no biodiesel de algodão, durante 90 dias de armazenamento em recipiente de aço carbono, através da técnica Rancimat.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. ÓLEOS E BIODIESEL

O uso de óleos vegetais como combustíveis, apesar de bastante promissor, apresenta sérios inconvenientes, dentre os quais estão a viscosidade e a densidade elevadas dos óleos e a baixa volatilidade. Estes fatores, se não corrigidos, podem ocasionar combustão incompleta e formação de depósitos de carbono no sistema de injeção do combustível, levando a obstrução dos filtros de óleo, bem como do próprio sistema de injeção, comprometendo o tempo de vida útil do motor (SCHWAB et al., 1987). Estes problemas podem ser eliminados através da reação de transesterificação destes óleos e gorduras, levando à formação de ésteres alquílicos de ácidos graxos, denominado biodiesel (TYSON et al., 2004; KNOTHE et al., 2006).

O biodiesel apresenta características físico-químicas compatíveis com as do combustível fóssil, o diesel. Dentre as quais estão o número de cetano, o calor de combustão, o ponto de fluidez, a viscosidade cinemática e a lubricidade (KNOTHE et al., 2006).

Atualmente, as pesquisas envolvendo combustíveis renováveis são focadas principalmente na produção de biodiesel, pois se trata de um combustível biodegradável que contribui com a redução das emissões de gases e de partículas cancerígenas emitidas pela combustão do diesel (NGUYEN et al., 2010; SINGH; SINGH, 2010; ATADASHI et al., 2012).

O governo brasileiro tem proporcionado recursos financeiros, novas tecnologias, esforços políticos e campanhas publicitárias para viabilizar o uso do biodiesel no país. Além dos benefícios ambientais, a inserção do biodiesel na matriz energética brasileira, ocorrida desde 2005, através do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), permite a implantação de programas de inclusão social e de desenvolvimento regional, fortalecendo a agricultura familiar e gerando emprego e renda em toda a cadeia produtiva do biodiesel.

De acordo com a RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.5.2012 ficou estabelecido, que todo diesel usado no Brasil seria aditivado com 5% de biodiesel desde 1º janeiro de 2010 (ANP, 2005). A produção de 8,3 bilhões de litros de biodiesel, desde a implantação do PNPB até 2011, reduziu, portanto as importações de diesel em um montante de 5,3

bilhões de dólares, contribuindo positivamente para a Balança Comercial Brasileira (BRASIL, 2013).

Inúmeras fontes lipídicas podem servir como matérias-primas para a produção de biodiesel. Dentre as mais utilizadas estão os óleos de soja, dendê, girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso, mamona, algodão, colza, além do sebo bovino e de aves (ROSENHAIM, 2009). No Brasil, segundo os dados da ANP (2011), a produção de biodiesel concentra-se basicamente na utilização da soja, sebo bovino e algodão, contudo, cada vez mais estudos vêm apresentando novas fontes de óleos e gorduras com potencialidade para a produção de biodiesel.

Os parâmetros de controle da qualidade do biodiesel, nacional ou importado, são estabelecidos pelo Regulamento Técnico nº 4 da ANP. Este regulamento determina as características e especificações do biodiesel que deverão ser feitas mediante o emprego de normas como ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), ASTM (American Society for Testing and Materials), ISO (International Organization for Standardization) e CEN (Comité Européen de Normalization).

O perfil dos ésteres alquílicos de ácidos graxos que constituem o biodiesel é derivado do óleo de origem. Estes, na sua maioria são ácidos graxos insaturados, os quais apresentam na sua estrutura carbonos em posições *alílicas* e *bis-alílicas* que podem sofrer oxidação (KNOTHE, 2006; MEHER et al., 2006; DCR, 2009). A baixa estabilidade oxidativa do biodiesel tem sido um dos pontos técnicos mais críticos à sua consolidação na matriz energética mundial. É responsável por processos oxidativos que degradam o biocombustível, afetando drasticamente suas propriedades, principalmente durante longos períodos de armazenamento (KNOTHE, 2006).

A estabilidade oxidativa é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da qualidade dos biodieseis (SMOUSE, 1995; ANTONIASSI, 2001). Durante todas as fases de obtenção, processamento, distribuição, armazenamento e utilização, os biodieseis estão sujeitos a uma série de reações que podem levar a modificações de suas estruturas, ocasionando a oxidação (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

3.2. OXIDAÇÃO DE BODIESEIS

Os biodieseis são suscetíveis às reações de oxidação na presença de sistemas catalíticos tais como luz, calor, enzimas, íons metálicos, metalo proteínas e micro-organismos, conduzindo a processos complexos de auto-oxidação, foto-oxidação e

oxidação enzimática, com a formação de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação. Esses hidroperóxidos sofrem decomposição em temperaturas moderadas devido à quebra homolítica no grupamento (-O-O-), formando os radicais: peróxido ($\text{ROO}\cdot$), alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e hidroxila ($\text{HO}\cdot$), os quais produzem reações paralelas durante a oxidação (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

3.2.1. Auto-oxidação

A auto-oxidação é o mais comum de todos os processos de deterioração e, acontece quando o oxigênio molecular está dissolvido no biodiesel, na presença de um catalizador (DAVÍDEK; VELÍŠEK, 1990).

A intensidade da oxidação está relacionada ao grau de instauração dos ésteres. Logo, os ácidos graxos insaturados, particularmente os ácidos oleico, linoléico e linolênico apresentam alta propensão à auto-oxidação, sendo a velocidade da reação aumentada pelo número de instaurações de cada molécula (PÈREZ-GALVES; MIGUÉZ-MOSQUEIRA, 2004).

Bolland (1947), Beletiz e Grosch (1999) *apud* Schaich (2005) propuseram um mecanismo de auto-oxidação para compostos de dupla ligação, incluindo os ácidos graxos. Este mecanismo é induzido por radicais, resultando numa reação em cadeia. Ainda hoje, essa é a melhor proposta para explicar a rota de oxidação via formação de radicais livres.

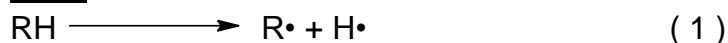
Os radicais livres são qualquer espécie que apresente um ou mais elétrons desemparelhados. A Figura 1 mostra que os radicais livres formados dos ácidos graxos livres ou ésteres na etapa inicial (1) reagem rapidamente com o oxigênio, formando radical peroxila (2) e (4). Estes radicais reagem com outras moléculas de ésteres ou ácidos graxos livres insaturados existentes no meio, retirando-lhes um hidrogênio e sendo convertido a hidroperóxidos (3), assim, os radicais são regenerados.

A concentração de radicais $\text{ROO}\cdot$ no meio reacional é alta porque a energia de ativação necessária para a sua formação é baixa. Em consequência, todo mecanismo é limitado pela conversão destes radicais a monohidroperóxidos (ROOH) (3). Essa reação é muito lenta e seletiva, pois busca a ligação mais fraca do átomo de hidrogênio do ácido graxo livre ou éster. À proporção que a auto-oxidação prossegue, a concentração de hidroperóxido atinge um nível no qual a geração de radicais livres se dá pela

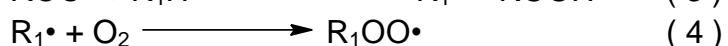
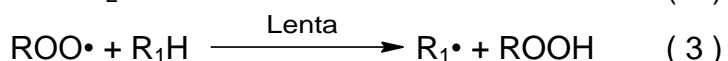
decomposição de uma molécula de hidroperóxido (5) ou pela degradação bimolecular [6] (BELITZ; GROSCH, 1999)

Figura 1- Mecanismo de Reação de Auto-oxidação

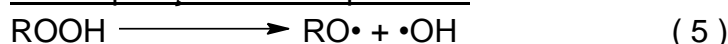
Início



Propagação



Decomposição do hidroperóxido



Término Produtos finais estáveis



RH = Ácido graxo
 $\cdot OH$ = Radical hidroxila;
 $R\cdot = R_1\cdot$ = Radical livre;
 $RO\cdot$ = Radical alcoxila;
 $ROO\cdot$ = Radical peroxila;
 $ROOH$ = Composto hidroperóxido.

Fonte: BOLLAND, 1945; BELITZ; GROSCH, 1999.

A concentração de radicais $ROO\cdot$ no meio reacional é alta porque a energia de ativação necessária para a sua formação é baixa. Em consequência, todo mecanismo é limitado pela conversão destes radicais a monohidroperóxidos ($ROOH$) (3). Essa reação é muito lenta e seletiva, pois busca a ligação mais fraca do átomo de hidrogênio do ácido graxo livre ou éster. À proporção que a auto-oxidação prossegue, a concentração de hidroperóxido atinge um nível no qual a geração de radicais livres se dá pela decomposição de uma molécula de hidroperóxido (5) ou pela degradação bimolecular (6). As reações (7), (8) e (9) representam a etapa de finalização da reação radicalar (BELITZ; GROSCH, 1999).

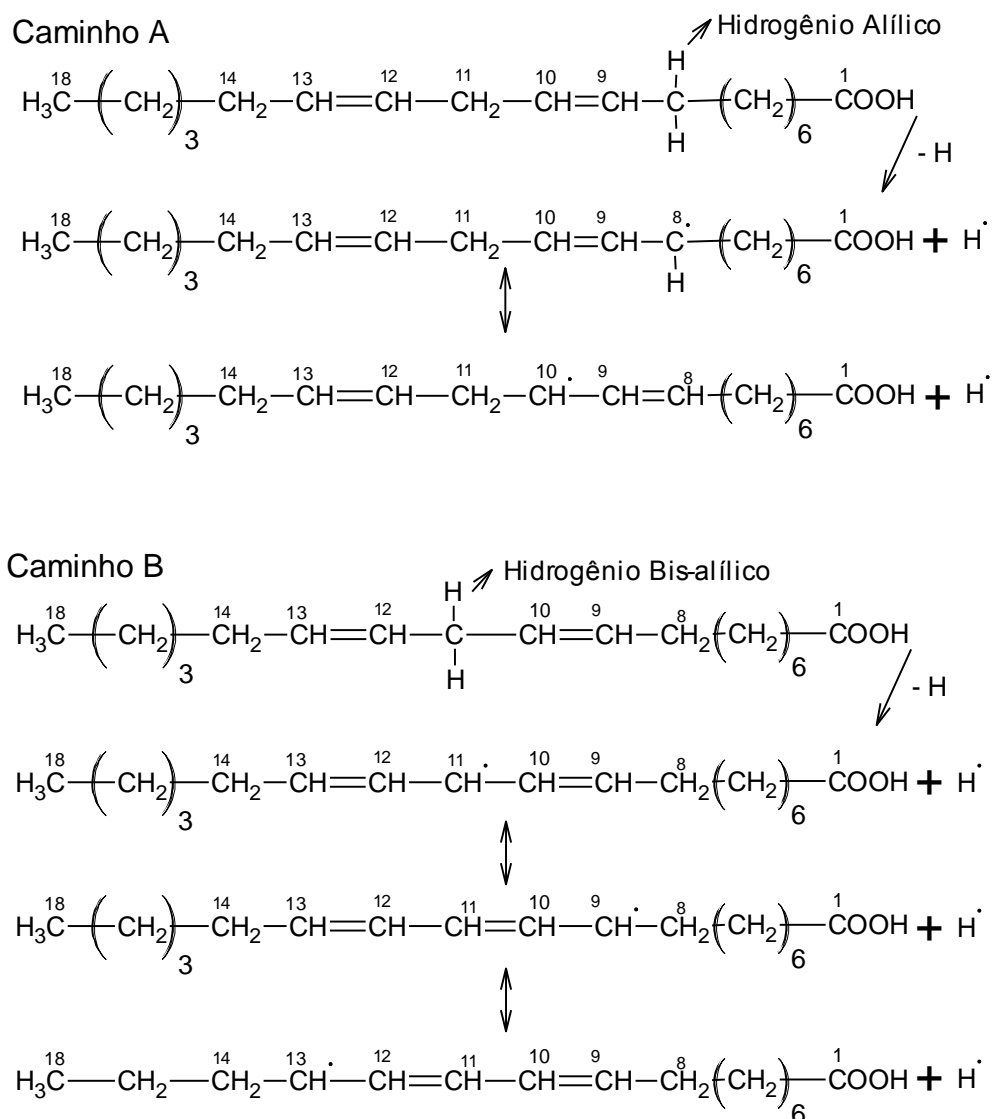
A reação de auto-oxidação de ésteres de ácidos graxos mono e poli-insaturados não conjugados é iniciada pela retirada de um átomo de hidrogênio *alílico* ou hidrogênio *bis-alílico*. A força da ligação do átomo de hidrogênio *bis- alílico* é menor do que a do átomo de hidrogênio *alílico*. O radical formado absorve o oxigênio para formar um radical peróxido. Esse radical reage com outra molécula do ácido graxo insaturado livre ou com

outra molécula de éster, abstraindo um átomo de hidrogênio, tendo como resultado um hidroperóxido e um radical livre que dá continuidade à reação em cadeia.

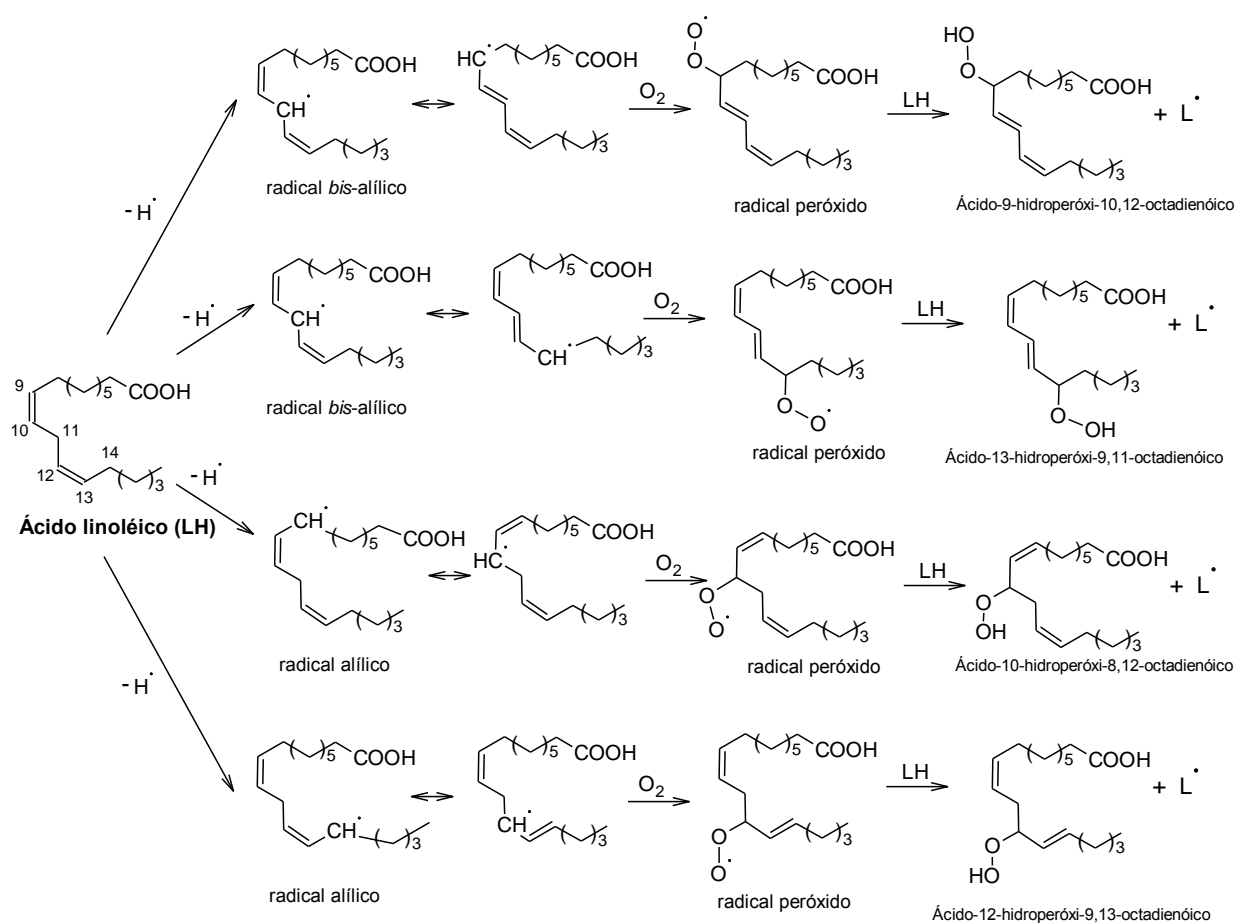
O ácido linolênico apresenta duas posições *bis-alílicas* e a velocidade de perda de átomos de hidrogênio da sua molécula é duas vezes maior do que no ácido linoleico. A abstração dos hidrogênios alílicos e *bis*-alílicos gera radicais estabilizados por ressonância. Quanto maior o número de formas de ressonância, maior é a estabilidade do radical e, conseqüentemente, menor a energia de dissociação do radical livre (SOLOMOS; FRYHLE, 2001). Durante a auto-oxidação dos ésteres de ácidos graxos poli-insaturados não conjugados, ocorre cerca de 90% de conjugação dos casos (ROVELLINI; CORTESI; FEDELI, 1997).

Na Figura 2 estão representadas as formas de ressonância do ácido linoleico. Os ácidos oleico e linolênico apresentam mecanismos semelhantes.

Figura 2 - Formas de ressonância do ácido linoléico pela abstração dos hidrogênios *alílico* e *bis-alílico*.



Quando ocorre ressonância nas cadeias carbonadas dos ácidos graxos insaturados, há formação de estruturas diferentes, ou seja, compostos diferentes que possuem a mesma forma molecular, os quais são chamados de isômeros de posição (LEHNINGER, 1976; OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Os hidroperóxidos ou isômeros de posição do ácido linoleico estão mostrados na Figura 3. Os dienos conjugados são mais estáveis do que os dienos isolados. Essa estabilidade vem, em parte, da deslocação dos elétrons π que ocorre entre os dienos conjugados (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Figura 3 - Estruturas dos hidroperóxidos isômeros do ácido linoléico

3.2.2. Foto-oxidação

A foto-oxidação ocorre quando estão presentes no meio reacional: a luz, certas moléculas fotossensibilizadoras e o oxigênio singleto. A foto-oxidação se diferencia da auto-oxidação pela presença de moléculas de oxigênio singleto, onde seus elétrons estão num estado ativado, de maior energia e mais reativo que o oxigênio no estado tripleto (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

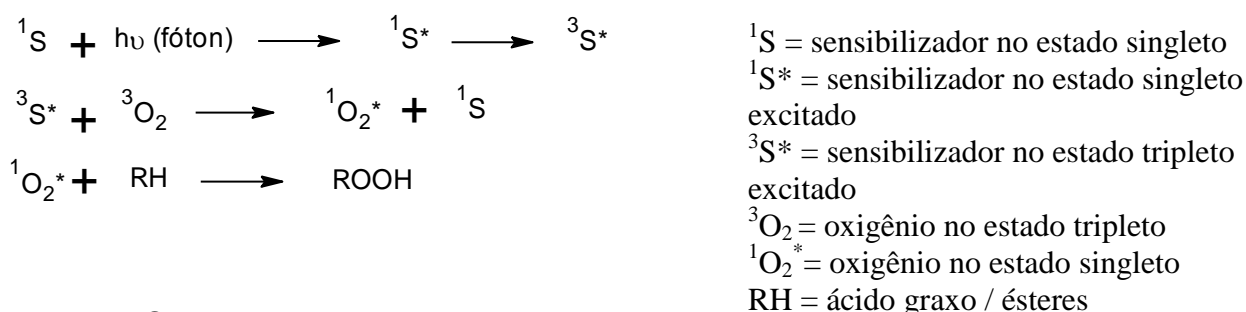
O oxigênio no estado tripleto (3O_2) é um diradical com dois elétrons ($\cdot O - O \cdot$) desemparelhados na molécula, ocupando dois orbitais individualmente (\uparrow)(\uparrow). Quando esses elétrons ficam pareados ($\uparrow\downarrow$), num mesmo orbital, temos o estado singleto.

No estado tripleto, o oxigênio reage preferencialmente com radicais. No caso de ácidos graxos insaturados, não ocorre reação porque a energia de ativação da reação: $RH + ^3O_2 \rightarrow ROOH$ é $146-273 \text{ kJmol}^{-1}$, enquanto que, a energia necessária para o

oxigênio tripleto (\uparrow)(\uparrow) passar para o estado singleto ($\uparrow\downarrow$) é de 92 kJmol^{-1} (BELITZ; GROSCH, 1999).

O oxigênio singleto pode ser formado por reações fotoquímicas desde que haja um sensibilizador, o qual é um composto fotossensível. O sensibilizador passa do estado singleto para um estado tripleto excitado pela absorção de um fóton de energia. O estado tripleto excitado do sensibilizador reage com uma molécula de oxigênio no estado tripleto, convertendo-a a seu estado singleto e recuperando o estado singleto do fotossensibilizador, conforme Figura 4 (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Figura 4 - Mecanismo da formação do oxigênio singleto



Fonte : LOVE, 1985

A foto-oxidação de lipídeos insaturados ocorre quando estão presentes substâncias sensitizantes, como a clorofila. A foto-oxidação é muito mais veloz do que a auto-oxidação. O oxigênio no estado singleto reage até 1500 vezes mais rápido com o linoleato que o oxigênio tripleto (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Os hidroperóxidos produzidos na foto-oxidação e na auto-oxidação são obtidos por mecanismos diferentes e quantidades também diferentes. Na foto-oxidação, o oxigênio singleto reage diretamente com o carbono da dupla ligação, adicionando-se quaisquer dos seus carbonos e abstraindo um hidrogênio alílico para formar diretamente um hidroperóxido.

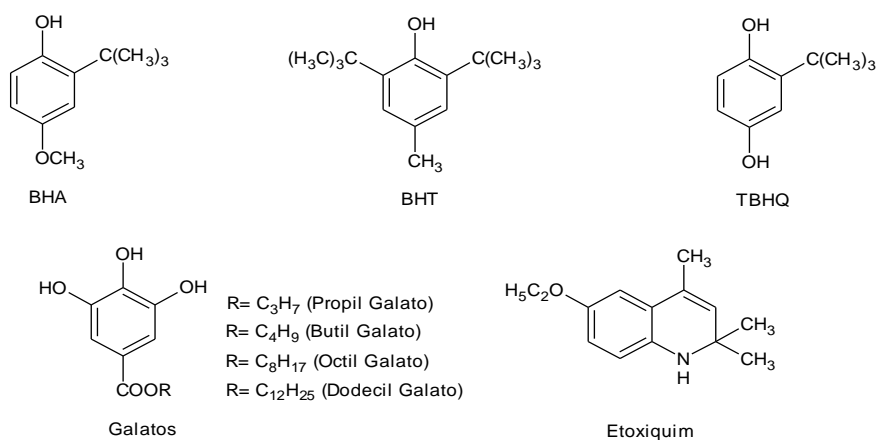
Quantidades iguais de hidroperóxidos são formadas em ambas as extremidades da dupla ligação original, ao mesmo tempo em que a dupla ligação migra (HAMILTON, 1994; OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Os possíveis hidroperóxidos produzidos na foto-oxidação do ácido linoléico estão apresentados na Figura 5.

3.3. ANTIOXIDANTES

3.3.1. Antioxidantes sintéticos

A diminuição dos fatores que favorecem oxidação do biodiesel nem sempre são viáveis e, muitas vezes, o caminho mais simples para inibir a oxidação do biodiesel é o uso de aditivos antioxidantes. No biodiesel comercial são utilizados principalmente os antioxidantes sintéticos butil-hidroxi anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil hidroquinona (TBHQ) e o propil-galato (PG) (DUNN, 2005). Estes compostos fenólicos são conhecidos como antioxidantes primários. Sendo, definidos como substâncias fenólicas que apresentam em sua estrutura um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). A Figura 6 mostra as estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos mais conhecidos.

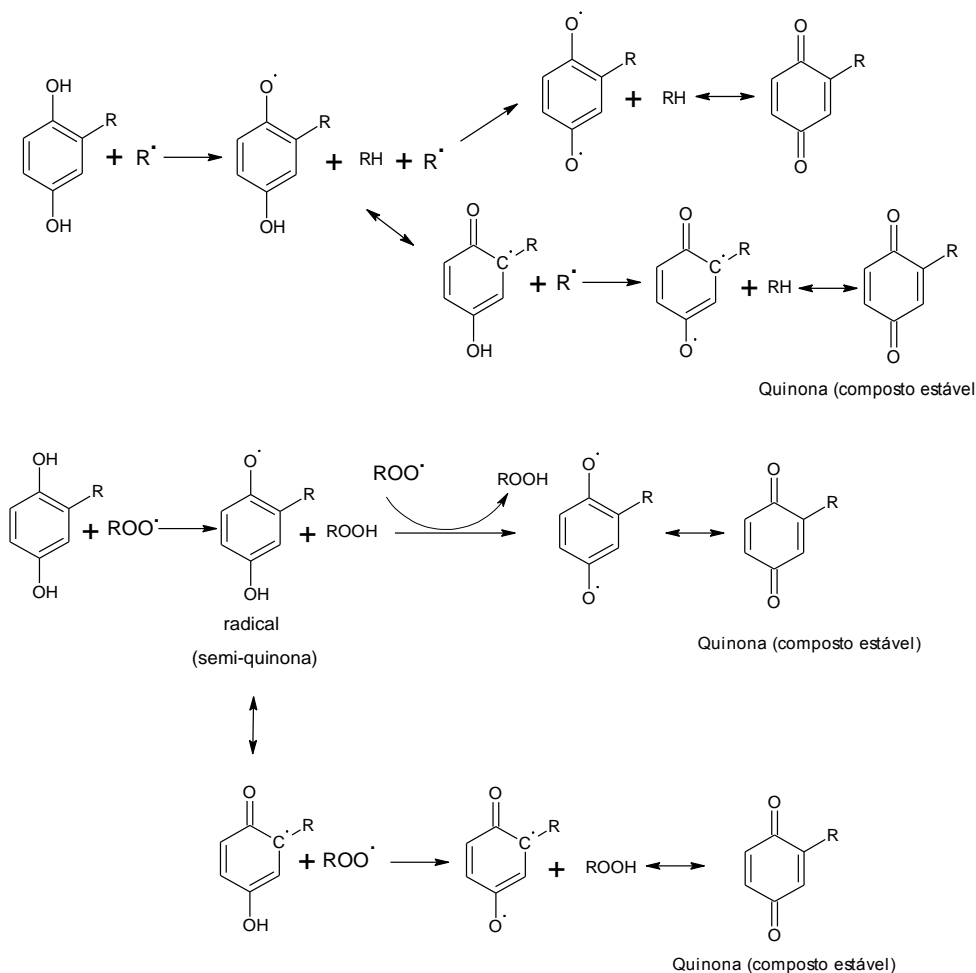
Figura 6 - Estrutura química dos antioxidantes sintéticos mais conhecidos



Os antioxidantes primários podem atuar de duas maneiras. A primeira é doando o hidrogênio da hidroxila ao radical livre do ácido graxo, refazendo assim a molécula e, encerrando o processo oxidativo na primeira etapa, retardando o processo auto-oxidativo até que todo o antioxidante seja usado. A segunda forma de atuação é com a doação do átomo de hidrogênio do grupo hidroxila aos radicais peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•) para formar compostos mais estáveis, e o radical livre do antioxidante é estabilizado por ressonância. A estabilização se dá pelo deslocamento do elétron desemparelhado do anel fenólico (ressonância interna do anel), formando híbridos estáveis (BELITZ; GROSCH,

1999; SOLOMONS; FRYHLE, 2001). A Figura 7 mostra a ação de um antioxidante diante de um radical livre.

Figura 7 - Mecanismo de ação de um antioxidante diante de um radical livre.



Onde: R= grupo alquila; R• = radical do ácido graxo; ROO• = radical peróxido; RH = ácido graxo; ROOH = composto hidroperóxido.

Os compostos fenólicos permitem a doação do hidrogênio fenólico a um radical livre, regenerando-o e interrompendo, assim, o mecanismo de oxidação por radical livre. Desta maneira, os compostos fenólicos transformam-se em radicais livres, os quais são estabilizados por ressonância (RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes secundários são substâncias que diminuem a velocidade de oxidação por diferentes caminhos, mas não transformam radicais livres em compostos estáveis. Esses antioxidantes são capazes de quelar ou sequestrar metais pró-oxidantes e desativá-los, doar átomos de hidrogênio a antioxidantes primários, desativar o oxigênio

singleto, e agir como supressores de oxigênio. São citados, geralmente, como agentes sinergistas, pois melhoram a atividade dos antioxidantes primários (REISCHE et al.,2002), sendo estes, compostos orgânicos e inorgânicos. Os sinergistas incluem os ácidos cítrico, fosfórico, ascórbico e fosfatídeo (lipídios complexos: lecitinas e cefalinas).

3.3.2. Antioxidantes naturais

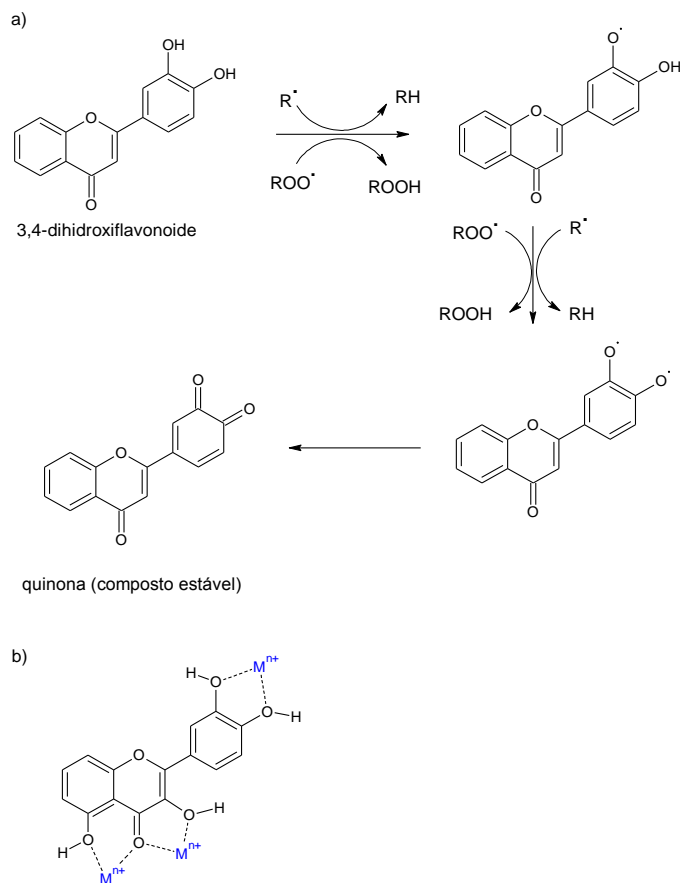
Diversos extratos de ervas, como alecrim, orégano, coentro, canela, tomilho, manjeriço, sálvia e outros têm apresentado poder antioxidante, o qual pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos (WETTASINGHE,1999; SHAHIDI, 2000). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas.

Os compostos fenólicos são produzidos do metabolismo secundário das plantas e são essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, são formados em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outras (NACZK; SHAHIDI, 2004). Dentre os compostos fenólicos de fontes naturais, os que mais se destacam são os ácidos fenólicos e os flavonoides (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos e seus derivados são encontrados em plantas na forma livre, conjugada ou de forma esterificada. Os mais comuns são: ácidos benzoicos (protocatequímico, vanílico, sirígico, gentísico, salicílico e gálico), os ácidos cinâmicos (p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico) e as cumarinas.

Flavonóides é o nome dado a um grande grupo de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, pertencentes à classe dos polifenóis. São encontrados em sementes, frutos, cascas, raízes, flores, folhas e chás onde já foram identificados mais de 9.000 flavonóides (FELDMANN, 2001; WILLIANS, 2004). Sua estrutura química consiste de dois anéis benzenos ligado a um anel pirano (ANGELO; JORGE, 2007; STALIKAS, 2007). A Figura 8 mostra a ação de um flavonóide frente a um radical livre e, como este quela um íon metálico.

Figura 8 - Mecanismo de ação de flavonoide frente a um radical livre (a) e Íon metálico (b).



A formação de radicais livres, bem como a presença de íons metálicos, é responsável pelas reações de oxidação que deterioram biodieséis. Recentemente tem sido dada atenção aos efeitos da oxidação causados pelo contato do biocombustível com o ar ambiente (auto-oxidação), durante o período de armazenamento, o que vem reduzir a qualidade do biodiesel. O uso de substâncias antioxidantes que inibem ou retardam as reações oxidativas tem sido utilizado com sucesso na indústria oleoquímica.

3.3.2.1. Alecrim como antioxidante

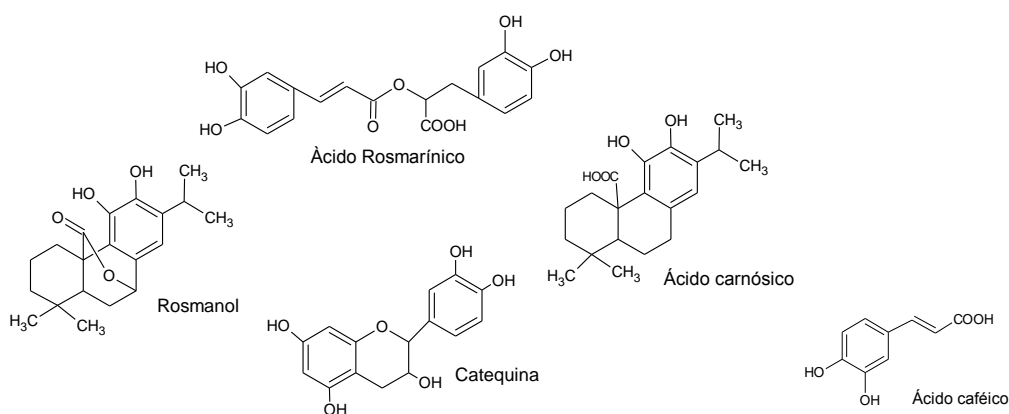
A espécie *Rosmarinus officinalis* L. é típica das regiões secas e quentes do Mediterrâneo. Por muitos séculos, o alecrim tem sido usado na medicina popular e como aromatizante em alimentos. É conhecido por exibir atividades antitumoral, antiviral, antibacteriano, anti-inflamatório e antioxidante. O ácido rosmarínico, constituinte

biologicamente ativo, foi isolado pela primeira vez por Scarpati e Oriente (1958), o que deu origem a inúmeras pesquisas sobre a composição e aplicação desta planta.

Seus benefícios evidentes à saúde atraíram muitas empresas para comercializar produtos à base de extratos de alecrim, encontrando aplicações como ingredientes funcionais em alimentos, cosméticos e nutracêuticos, tais como: AquaROXR, VivOXR, INOLENSR (Vitiva); EssenRoseR (Fenchem Biotek Ltd.); Rosemary-EcoR (Centerchem Inc.), etc (PESHEV et al., 2011).

Cuvelier et al. (1996) investigaram a composição e atividade antioxidante de 24 extratos comerciais de alecrim. Vinte e sete compostos foram detectados e caracterizados por CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, dentre estes, vinte e dois foram identificados. Estes autores também investigaram a relação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos e constataram que a contribuição principal foi dos componentes ácido rosmarínico, ácido carnosol e carnósico, que estavam presentes em concentrações elevadas em todos os extratos comerciais investigados. Também, foram identificados por outros autores os seguintes compostos: ácido caféico, rosmanol, ácido 12-metil-carnósico, metil-carnosol, metil-carnosato, epirorosmanol, romadial, catequina, carnosaldeído, epiisorosmanol, rosmariquinona e o ácido ursólico (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007). A Figura 9 mostra algumas estruturas identificadas no alecrim.

Figura 9 – Algumas estruturas de compostos fenólicos identificados no alecrim.



Recentemente, estudos revelaram o potencial do ácido carnosólico na prevenção de doenças neurodegenerativas como acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer e de Parkinson, que geralmente são causadas por um excesso de radicais livres. Ao contrário

de muitos fármacos e antioxidantes naturais, o ácido carnósico é capaz de atravessar a barreira sangue-cérebro e também pode ser utilizado na chamada terapia patologicamente ativada (SATOH et al., 2008).

Para utilização dos extratos, os componentes ativos são frequentemente isolados a partir do material vegetal por extração sólido-líquido (NACZAK; SHAHIDI, 2004). A seleção do solvente para a extração é necessária, porque tem a função de maximizar o grau de recuperação dos compostos fenólicos mais importantes contidos no vegetal. Devido à toxicidade dos solventes, o etanol é o mais apropriado para uso em alimentos. Normalmente, a evaporação à vácuo é aplicada para recuperação do solvente e para impedir a perda da atividade antioxidante, devido à suscetibilidade térmica do ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico e derivados deles (BONOLI et al., 2003; BASKAN et al., 2007).

4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os padrões de ácido ascórbico, ácido gálico, os antioxidantes sintéticos TBHQ, BHT e os reagentes Tween 40 (monopalmitato de polioxietil-enosorbitana), TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), TPTZ (2,4,6 -tri (2-piridil)-1,3,5 - triazina) e DPPH• foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O reagente Folin-Ciocalteu, heptadecanoato de metila e acetonitrila foram adquiridos da Merck e a água ultrapura foi obtida pelo equipamento Purelab. Os gases (oxigênio, ar sintético e hélio) utilizados foram adquiridos da White Martins - Brasil (99,8% de pureza). Os demais reagentes e solventes, de grau analítico, foram obtidos da FMAIA.

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ALECRIM

O vegetal utilizado para obtenção dos extratos antioxidantes foi da espécie *Rosmarinus officinalis L.* (alecrim), o qual foi adquirido no Mercado Público da Torre, em João Pessoa, na Paraíba.

As folhas de alecrim foram higienizadas, secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C durante 24 horas e trituradas até a forma de pó. Uma parte do pó (170 g) foi imersa em 960 mL de etanol e a outra parte (60 g) em 340 mL de clorofórmio, cada parte, em recipientes de vidro individuais, deixados à temperatura ambiente e agitados manualmente durante quinze dias.

Após este período, foram submetidos a uma agitação mecânica (banho-maria Dubnaff, da MARCONI) por duas horas e filtrados a vácuo. Os filtrados foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida e a uma temperatura próxima ao ponto de ebulição de cada solvente. Os extratos concentrados foram acondicionados em recipientes de vidro âmbar, para eliminação total do solvente.

Os extratos clorofórmico de alecrim (ECA) e etanólico de alecrim (EEA), isentos de solventes, foram macerados e armazenados em recipientes de vidro âmbar. O fluxograma da obtenção dos extratos de alecrim está representado na Figura 10.

Os extratos vegetais e os antioxidante sintético TBHQ e BAHT foram adicionados ao biodiesel metílico do óleo de algodão nas concentrações de 2000 mg.kg⁻¹, 2500 mg.kg⁻¹

¹ e 3000 mg.kg⁻¹ com o objetivo de comparar a atividade antioxidante pelo método de oxidação acelerada Rancimat.

Figura 10 – Fluxograma de obtenção dos extratos etanólico e clorofórmico



4.2. TERMOGRAVIMETRIA DOS ANTIOXIDANTES EEA, ECA, BHT e TBHQ

A Termogravimetria (TG) baseia-se no estudo da variação da massa de uma amostra, quando esta sofre uma transformação física (sublimação, evaporação e condensação) ou química (degradação, decomposição e oxidação). A variação da massa é registrada em função do aumento da temperatura. A temperatura pode causar alterações na estrutura química da amostra e, por consequência em suas propriedades físicas.

As curvas TG apresentam informações sobre a estabilidade térmica e decomposição da amostra, porém, para uma melhor visualização e avaliação derivou-se as curvas TG, obtendo picos em vez de curva degrau que através de suas áreas determina-se a variação da perda de massa da amostra (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

As análises foram feitas no Analizador Térmico Simultâneo TG/DTA da marca Shimadzu, modelo DTG -60H, usando cadinho de alumina, na atmosfera de ar sintético com fluxo de 50mL/min e razão de aquecimento 10°C / min até 600°C.

4.3. BIODIESEL METÍLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO (BA)

O biodiesel metílico do óleo de algodão isento de antioxidante, foi produzido pela Usina Experimental de Biodiesel do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), localizada em Caetés - PE.

O biodiesel metílico do óleo de algodão foi obtido a partir da reação de transesterificação, em temperatura de 50°C, via catálise homogênea e alcalina, numa razão molar 5,5:1(metanol/óleo de algodão), utilizando-se 0,75% do catalizador hidróxido de potássio em relação a massa do óleo, essas especificações foram dadas pela Usina Experimental de Biodiesel de Caetés-PE.

4.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL METÍLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO

A caracterização do biodiesel foi feita seguindo as exigências do Regulamento Técnico da ANP nº 4/2012, empregando os métodos determinados pela mesma.

4.4.1. Índice de iodo (método-EN 14111: 2003-E)

Este índice determina o grau de insaturação dos esteres existentes no biodiesel, considerando que o iodo é adicionado às ligações duplas, logo, quanto maior a

quantidade de iodo adicionada, maior o número de ligações duplas. Os valores destes parâmetros foram calculados a partir da equação 1. O resultado deve ser expresso em gramas de iodo/100 gramas da amostra.

Equação 1 - Índice de Iodo

$$\text{Índice de Iodo} = 12,69 \times M (V_1 - V_2) / m \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

12,69 é referenciado ao equivalente grama do iodo;

M = concentração em mol.L⁻¹ da solução de tiosulfato de sódio (padronizada);

V₁ = volume médio, em mL da solução de tiosulfato de sódio padronizada que foi gasto com o branco;

V₂ = é o volume médio, em mL da solução de tiosulfato de sódio padronizada que foi gasto com a amostra;

m = massa, em grama da amostra.

Mediu-se 0,14 g de amostra em um erlenmeyer e adicionaram-se 20 mL da solução ciclohexano e ácido acético glacial, 1:1 V / V, 25 mL do reagente de Wijs. O frasco foi fechado, homogenizado e conservado no escuro por uma hora. Em seguida, adicionou-se 20 mL da solução de iodeto de potássio (100 g.L⁻¹), 150 mL de água, recém fervida e fria. Adicionou-se algumas gotas da solução de amido 1%. Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹) padronizada. Anotou-se o volume gasto.

Todo esse processo foi repetido, da mesma forma, com o branco.

4.4.2. Índice de acidez (método-ASTM D 664-09A)

Esta técnica consiste em quantificar os ácidos graxos livres no biodiesel, através do número de miligramas do hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama da amostra de biodiesel. O resultado é expresso em mg de KOH.g⁻¹. Os cálculos foram feitos de acordo com a equação 2.

Equação 2 - Índice de Acidez

$$\text{Índice de Acidez} = (A - B) \cdot M \cdot 56,1 / W \quad \text{Eq.2}$$

Onde: A = volume gasto, em mL, da solução alcoólica de KOH, na titulação da amostra;

B = volume gasto, em mL, da solução alcoólica de KOH, na titulação do branco;

M = concentração da solução aquosa de KOH, mol.L⁻¹;

W = massa, em gramas, do biodiesel.

Mediu-se 5 g (\pm 0,0001) num becker, adicionou-se 50 mL de álcool isopropílico anidro (teor de água menor que 0,1%). Titulou-se com a solução alcoólica de KOH, padronizada, e anotou-se o volume. Procedeu-se da mesma forma com o branco.

4.4.3. Índice de peróxido (AOCS OFFICIAL METHOD CD8-53)

Este método determina todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação da amostra. Este parâmetro mede em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000g da amostra, mEq.kg⁻¹.

Os cálculos foram feitos a partir da equação 3.

Equação 3 - Índice de Peróxido

$$\text{Índice de peróxido} = (A - B) \cdot N \cdot f \cdot 1000 / P \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

A = volume gasto em mL da solução de tiosulfato de sódio (0,01N), padronizada, na titulação da amostra;

B = volume gasto em mL da solução de tiosulfato de sódio (0,01N), padronizada, gasto na titulação do branco;

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio padronizada;

f = fator de correção da solução de tiosulfato de sódio;

P = massa da amostra em grama.

Mediu-se 5,0g (\pm 0,05) da amostra em um frasco erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 30 mL da solução ácido acético-clorofórmico (3:2) V/V, agitou-se até a dissolução da amostra. Adicionou-se 0,5 mL da solução saturada de iodeto de potássio e

deixou-se em repouso ao abrigo da luz por exatamente um minuto. Acrescentou-se 30 mL de água recém fervida, 0,5 mL da solução de amido a 1%. Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, padronizada. Anotou-se o volume. Para o branco, preparou-se uma prova sem amostra, nas mesmas condições.

4.4.4. Dienos e trienos

A medida quantitativa dos dienos e trienos conjugados tem sido utilizada para a determinação da oxidação de óleos, gorduras e biodieseis. A peroxidação dos ácidos graxos insaturados acompanha a mudança da dupla ligação na formação dos hidroperóxidos conjugados. Essa estrutura conjugada ou dienos conjugados e/ou trienos, absorve fortemente a luz ultravioleta no comprimento de onda entre 232 nm para dienos e 270 nm para trienos

Quanto maior o valor da absorbância a 232 nm, maior quantidade de dienos conjugados, correspondendo, portanto, ao processo de oxidação. Quanto maior for o valor da absorbância a 270 nm, maior teor de trienos conjugados, produtos da oxidação.

As determinações da absorbância na região de 190-400 nm foram obtidas empregando-se um espectrofotômetro UV-*vis* Shimadzu, modelo UV-2550, utilizando cela de quartzo com um cm de caminho óptico. As soluções dos biodieseis foram preparadas em Isooctano na concentração de 1 mg.mL⁻¹.

4.4.5. Determinação da composição dos ácidos graxos no biodiesel, por cromatografia gasosa

A cromatografia tem como princípio básico a separação dos componentes básicos de uma amostra. A identificação e a quantificação dos perfis dos ácidos graxos existentes na composição dos ésteres metílicos do biodiesel de algodão foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, marca Shimadzu, modelo CG-MS QP 2010, equipado com injetor e mostrador automático. A coluna capilar usada foi a Duraband com fase estacionária DB-23 (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm a espessura da película, com intervalo de temperatura de 40 a 250 °C). O gás de arraste empregado foi o hélio, com vazão de 92,8 mL.min⁻¹.

Foram injetadas amostras de 1 µL do biodiesel numa temperatura do injetor de 230°C. A temperatura inicial da coluna foi de 130 °C e as programações das temperaturas do forno cromatógrafo estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Programação da temperatura do forno do cromatógrafo a gás, para o BA

Taxa de Aquecimento (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Patamar (min)
-	130	1
10	200	1
3	230	2

A identificação dos perfis dos ácidos graxos ocorre por comparação de espectro de massa com os padrões existentes na bibliografia do software (Mass Spectra IDatabase NIST/EPA/NHI).

A quantificação dos ácidos graxos foi determinada com base nos valores da área total dos picos identificados e, sua percentagem, em função da área relativa de cada pico.

4.4.6. Viscosidade cinemática (método ABNT NBR 10441)

A viscosidade cinemática do biodiesel foi determinada através do tempo de escoamento do fluido por um capilar de vidro do tipo *Cannon Fenske*, em banho térmico a 40 °C.

A viscosidade do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação e tem influência no processo de queima na câmara de combustão do motor. Alta viscosidade ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel, ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor.

Alguns fatores, como mono-, di- e/ou triacilglicerídeos restantes da matriz oleaginosa e os produtos da degradação do biodiesel, também, aumentam a viscosidade do biodiesel.

Para determinar a viscosidade do biodiesel utilizou-se um viscosímetro manual, modelo ME V18, Jubalo. Os cálculos da viscosidade das amostras foram feitos pela equação 4.

Equação 4 - Viscosidade Cinemática

$$\text{Viscosidade Cinemática } (\nu) = C.T \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

$$\nu = \text{Viscosidade Cinemática (mm}^2\text{.s}^{-1}\text{);}$$

C= Constante capilar do viscosímetro ($\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$);

T= tempo (s).

4.4.7. Propriedades de fluxo à frio (ABNT NBR 14747)

À baixa temperatura, o biodiesel tende a solidificar-se parcialmente ou a perder sua fluidez, levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor. A partir deste comportamento, foram realizados três ensaios: ponto de névoa, que é a temperatura do biodiesel em um processo de resfriamento, onde se observa a formação dos primeiros cristais; ponto de entupimento de filtro a frio, que é a temperatura em que o biodiesel perde a filtrabilidade quando resfriado; e, o ponto de fluidez, que é a temperatura em que o biodiesel perde sua fluidez, isto acontece porque, a aglomeração dos cristais está disseminada o suficiente para impedir o seu escoamento livre. Quanto maior for o tamanho da cadeia dos ácidos graxos e/ou o caráter saturado das moléculas do biodiesel, mais altos serão os valores destes parâmetros. Logo, é de se esperar que o biodiesel de origem animal apresente valores mais elevados do que os biodieseis de origem vegetal.

O ponto de névoa (PN) e o ponto de fluidez (PF) das amostras do biodiesel foram determinados no equipamento Ponto de Névoa e Fluidez, modelo MPC-102 L, da marca TANAKA. O ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) das amostras do biodiesel foi determinado no equipamento Ponto de Entupimento de Filtro a Frio modelo AFP-102 do fabricante TANAKA, de acordo com ABNT NBR 14747.

4.4.8. Ponto de fulgor (método ABNT NBR 14598)

Ponto de Fulgor é a temperatura mínima, onde ocorrem vapores de biodiesel que se misturam com o ar, formando uma mistura inflamável. O valor do ponto de fulgor para o B100 encontra-se próximo aos 170 °C, porém, mínimas quantidades de álcool adicionadas ao biodiesel ocasionam um decréscimo bastante significativo neste valor. Esta característica do biodiesel é muito importante quanto à segurança no armazenamento e no transporte, principalmente quando a rota da transesterificação for metílica, pois este álcool é bastante inflamável e apresenta elevada toxicidade. Quanto aos valores de ponto de fulgor permitidos para o biodiesel, a norma da ANP (2012) fixa o valor de 100 °C (LÔBO; FERREIRA, 2009).

O ponto de fulgor das amostras foi determinado no equipamento Ponto de Fulgor automático, modelo APM-7, do fabricante TANAKA.

4.4.9. Massa específica (método ABNT NBR 7148)

A massa específica (densidade) do biodiesel está diretamente relacionada à estrutura molecular dos ésteres que o compõe. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica dos ácidos graxos, maior será a densidade. A presença de impurezas também influencia na densidade do biodiesel como, por exemplo, o álcool ou outras substâncias.

A massa específica das amostras do biodiesel foi determinada no Densímetro, modelo DA-645 do KEM.

4.4.10. Teor de água (ASTM D 6304)

A presença de água no biodiesel promove a hidrólise, resultando em ácidos graxos livres e também está associada à proliferação de micro-organismos e à corrosão em tanques de estocagem com deposição de sedimentos.

O teor de água das amostras foi determinado por um Titulador Coulométrico Karl Fischer, modelo MKC-501 do KEM.

4.4.11. Número de cetano (método ASTM D 613)

O número de cetano (NC) é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo diesel.

Se o número de cetano for muito alto, a combustão pode ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados, resultando em combustão incompleta e na emissão de fumaça. Se o número de cetano for muito baixo, podem ocorrer falhas no motor, trepidação, aumento excessivo da temperatura do ar, aquecimento lento do motor ao ser acionado e combustão incompleta. O número de cetano aumenta com o comprimento da cadeia carbônica não ramificada.

O número de cetanos da amostra foi determinado no equipamento IQT-LM (Ignition Quality – Laboratory Model, Advanced Engine Technology Ltd.).

4.4.12. Estabilidade à oxidação

A estabilidade oxidativa é definida como sendo a resistência de uma amostra à oxidação. Ela pode ser expressa pelo que chamamos de período de indução, que é dado

em tempo e corresponde à diferença entre o tempo que se inicia a oxidação e o tempo em que começam a detectados os produtos de oxidação.

A estabilidade do biodiesel está diretamente relacionada com o grau de insaturação dos alquil ésteres presentes, como também com a posição das duplas ligações na cadeia carbônica.

Existem atualmente três métodos automáticos para se determinar a estabilidade do biodiesel. A técnica Rancimat, que é o método padrão presente nas normas Europeia, Americana e Brasileira; a técnica P-DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada), técnica de aproximadamente 12 anos no mercado e a mais recente, PetroOxy. Neste trabalho, foi empregada a técnica Rancimat.

4.4.12.1. Rancimat (método EN 14 112)

Esta técnica avalia a estabilidade oxidativa de uma amostra de biodiesel através da medida de produtos voláteis. Três gramas da amostra são colocadas em um vaso de reação sob fluxo constante de oxigênio 10 L.h^{-1} a uma temperatura de $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os produtos voláteis, que são os produtos secundários da oxidação, são arrastados para um compartimento do aparelho contendo água deionizada e, através de uma célula, a condutividade elétrica da água é medida. O tempo decorrente até a detecção de um aumento súbito na condutividade, decorrente da presença dos compostos orgânicos voláteis de baixa massa molar é denominado período de indução (PI). Segundo as especificações da ANP no regulamento nº 04/2012, o PI mínimo deve ser superior a 6 horas, o que não corresponde ao tempo real da oxidação do biodiesel. Entretanto, até hoje tem sido a técnica de referência para avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel.

O equipamento usado para determinar o PI das amostras dos biodieseis foi o Rancimat, modelo 873 da Metronhm, e os cálculos do PI foram realizados com o auxílio do programa que acompanha o equipamento (software 743-Rancimat)

4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS DE BIODIESEL ADITIVADAS

As amostras de BA foram aditivadas com os extratos de alecrim (etanólico e clorofórmico) e com os antioxidantes sintéticos BHT e TBHQ nas concentrações de 2000 mg.kg^{-1} , 2500 mg.kg^{-1} e 3000 mg.kg^{-1} . Uma amostra sem aditivo foi utilizada como controle em branco. A Tabela 2 apresenta os códigos das amostras de BA sem aditivo e aditivadas.

Tabela 2 - Código das amostras do BA sem aditivo e aditivadas

Amostras	Códigos
BA PURO	BA100
BA + 2000 Extrato etanólico de alecrim	BA+2000EEA
BA + 2500 Extrato etanólico de alecrim	BA+2500EEA
BA + 3000 Extrato etanólico de alecrim	BA+3000EEA
BA + 2000 Extrato clorofórmico de alecrim	BA+2000ECA
BA + 2500 Extrato clorofórmico de alecrim	BA+2500ECA
BA + 3000 Extrato clorofórmico de alecrim	BA+3000ECA
BA + 2000 Antioxidante sintético TBHQ	BA+2000TBHQ
BA + 2500 Antioxidante sintético TBHQ	BA+2500TBHQ
BA + 3000 Antioxidante sintético TBHQ	BA+3000TBHQ
BA + 2000 Antioxidante sintético BHT	BA+2000BHT
BA + 2500 Antioxidante sintético BHT	BA+2500BHT
BA + 3000 Antioxidante sintético BHT	BA+3000BHT

4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DO ALECRIM

4.6.1. Determinação do teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu (FT)

O teor de fenólicos totais do extrato das folhas de alecrim foi determinado, em triplicata, pelo método espectrofotométrico, usando o reagente Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965), com modificações. O reagente Folin-Ciocalteu consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibidênio e o tungstênio se encontraram no estado de oxidação 6⁺. Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul. A mudança do estado de oxidação dos metais permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, as quais são medidas espectrofotometricamente ($\lambda = 765\text{nm}$).

No processo desenvolvido, inicialmente, uma alíquota de 30 μL da solução etanólica de extrato de alecrim foi transferida para os tubos de ensaio, aos quais foram acrescentados 60 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 90 μL de água destilada, os quais

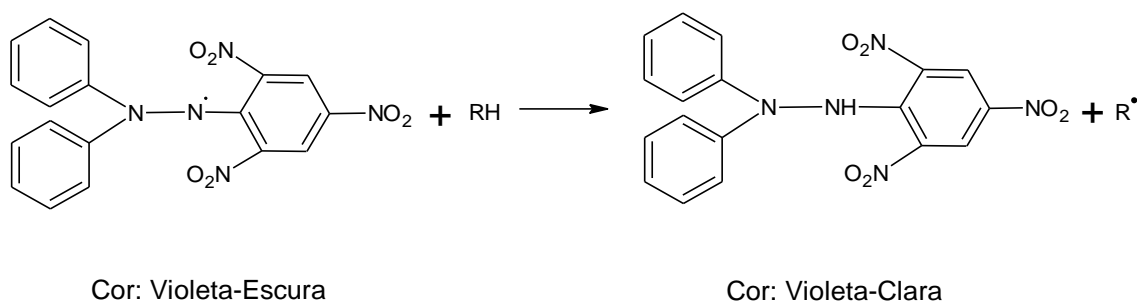
foram agitados por 1 minuto. Em seguida, uma alíquota de 180 μL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15%, foi adicionada, agitando-se por mais 30 segundos, resultando na concentração final de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da amostra. Os tubos permaneceram por 30 minutos, em ambiente escuro, à temperatura de 45°C até o momento da leitura da absorbância em 760 nm, empregando-se um espectrofotômetro UV-*vis* Shimadzu, modelo UV-2550, com cela de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Um padrão com ácido gálico em concentração variando de 2,5 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi obtido nas mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama do extrato ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$)

4.6.2. Determinação da atividade antioxidante

4.6.2.1. Método de sequestro de radicais DPPH• (2,2–difeníl-1-picril-hidrazila)

Este método consiste em avaliar a captura do radical DPPH•, pela ação de um antioxidante, segundo Brand-Williams et al., (1995), como mostra a Figura 11.

Figura 11 – Captura do DPPH• pela ação de um antioxidante



A partir de uma triagem preliminar de quantidades apropriadas da solução etanólica de DPPH•, foram adicionadas 23,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à solução do extrato etanólico das folhas de alecrim, de forma a obter concentrações finais que variaram de 2,5 à 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada concentração do extrato foi testada em triplicata. As soluções foram homogeneizadas num agitador mecânico por 30 minutos. O álcool etílico, como branco, foi usado para calibrar o espectrofotômetro UV-*vis* a 515 nm. Foram realizadas as leituras das amostras, durante as quais observou-se uma redução na absorbância até sua estabilização. Preparou-se uma solução controle constituída de álcool etílico, acetona, água e a solução etanólica de DPPH•.

Com os resultados obtidos, determinou-se a percentagem da atividade antioxidante (%AAT) do extrato etanólico de alecrim, através da equação 5.

Equação 5 - Percentagem da atividade antioxidante do extrato etanólico de alecrim

$$\%AAT = 100 \times \left(\frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

$Abs_{controle}$ é a absorbância da solução etanólica do radical DPPH•

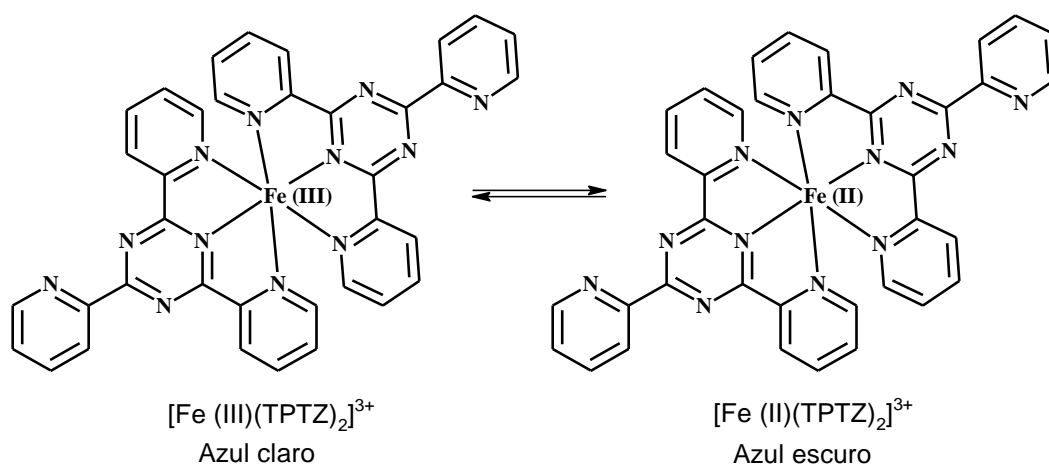
$Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença do extrato ou do padrão.

Outra forma usada para expressar a atividade antioxidante pelo sequestro do DPPH• é o EC_{50} (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical DPPH• inicial da reação). Quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra de um antioxidante, menor será a sua EC_{50} e maior a atividade do antioxidante (BRANWILLIAMS et al., 1995).

4.6.2.2. Método de redução do ferro- FRAP (*Ferric Reduction Antioxidant Power*)

Este método consiste na redução de Fe (III) (cor da solução azul-clara) à Fe (II) (solução azul-escura) existente no complexo TPTZ na presença de antioxidante, conforme Figura 12.

Figura 12 – Redução do Fe(III) à Fe(II) no complexo TPTZ



A capacidade antioxidante do extrato etanólico de alecrim foi determinada seguindo metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com modificações. Para o preparo da solução FRAP, combinou-se 25 mL de tampão acetato (0,3 M), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). A partir da solução do extrato vegetal na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparou-se em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, adicionaram-se alíquotas de cada concentração nos tubos e acrescentou-se 270 μL de água destilada, seguida da adição da solução FRAP. Após homogeneizar, os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C. O espectrofotômetro foi calibrado com a solução FRAP e as leituras da absorbância foram realizadas após 30 minutos da mistura, em 595 nm. Uma curva padrão de sulfato ferroso nas concentrações de 500 a 2000 μM , nas mesmas condições da amostra, foi feita. O resultado é expresso em μM de sulfato ferroso por grama do extrato de alecrim.

4.6.2.3. Método do sistema β -caroteno / ácido linoléico (Sist. β -c/ác.L)

Este método faz a avaliação da atividade antioxidante de uma amostra, por meio de um espectrofotômetro UV-vis, em 470 nm, baseado na descoloração ou oxidação do β -caroteno, causada pelos produtos de degradação do ácido linoléico.

Seguindo metodologia descrita por Marco (1968) com modificações. A determinação da atividade antioxidante iniciou-se com o preparo da solução sistema, em ambiente escuro, adicionando-se em um erlenmeyer de 250 mL uma alíquota de 40 μL de ácido linoléico, seguidos de 50 μL da solução β -caroteno ($20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em clorofórmio), 530 μL de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio para facilitar a solubilização. Após homogeneizar a mistura, com o auxílio do oxigenador, evaporou-se o clorofórmio. Em seguida, adicionou-se água previamente oxigenada por 30 minutos, lendo-se em espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550, em 470 nm, até obtenção da absorbância entre 0,6 a 0,7.

A partir da solução do extrato etanólico das folhas de alecrim na concentração de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparou-se em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata. Após adição de 0,4 mL de cada concentração da amostra, adicionou-se 5 mL da solução sistema (β -caroteno / ácido linoléico). O controle utilizado foi o Trolox ($200\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) procedendo nas mesmas condições da amostra. Os tubos foram agitados e mantidos em banho-maria a 40 °C. Para determinar as absorbâncias, o espectrofotômetro foi calibrado

com água, realizando-se as leituras após 2 minutos de efetuada a mistura e ao final de 120 minutos.

O decréscimo da leitura da absorvância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a percentagem de oxidação (Eq.6). Os resultados foram expressos em porcentagem de proteção subtraindo-se a percentagem de oxidação da amostra de 100 (Eq. 7).

Equação 6 – Percentagem de Oxidação

$$\% \text{ de Oxidação} = \frac{[(\text{Redução Abs})_{\text{amostra}} \times 100]}{(\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde:

Redução Abs = diferença entre a Absorvância inicial e Absorvância final das amostras e do sistema sem antioxidante.

Equação 7 – Percentagem de Proteção

$$\% \text{ de Proteção} = 100 - (\% \text{ de Oxidação}) \quad \text{Eq. 7}$$

4.7. ARMAZENAMENTO DO BIODIESEL METÁLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO

O biodiesel metílico do óleo de algodão foi aditivado e armazenado em 09 de novembro de 2011, durante 90 dias. Foi aditivado com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT e o natural EEA, além da combinação dos antioxidantes TBHQ e EEA, na razão de 1:1. A Tabela 3 mostra os códigos do BA sem aditivo e aditivado para o armazenamento

As amostras de BA foram armazenadas em depósitos especiais projetados e confeccionados em Aço Carbono Grau C ASTM A 283 com capacidade de 1000 mL, os quais são mostrados na Figura 13.

Tabela 3 - Código das amostras do BA sem aditivo e aditivado para o armazenamento

Amostras	Códigos
BA sem aditivo	BA100
BA + BHT	BAHT
BA + TBHQ	BAT
BA + Extrato Etanólico de Alecrim	BAEB
BA + TBHQ + Extrato Etanólico de Alecrim	BATEB

Figura 13 - Depósitos de armazenamento, contendo o biodiesel de algodão aditivado sem aditivo



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE ALECRIM

O processo de aquisição dos extratos das folhas de alecrim permitiu a obtenção de compostos de diferentes polaridades, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento dos extratos de alecrim

Extratos das folhas de alecrim	Rendimento (%)
Extrato etanólico	16
Extrato clorofórmico	8

Observa-se que o extrato etanólico de alecrim apresentou maior rendimento em comparação ao clorofórmio. Este resultado, segundo Julkunen -Tiitto (1985), é devido à predominância de compostos fenólicos em vegetais, os quais, em sua maioria são solúveis em solventes polares. A quantidade do material extraído pode ainda ter sido influenciada pela composição química do substrato e a técnica de extração (Depkevicius et al., 1998). O rendimento obtido da extração clorofórmica foi 50% menor comparada ao extrato etanólico.

Segundo Moure et al. (2001) estes resultados são observados porque os rendimentos de extratos são fortemente dependentes do solvente utilizado na extração, em função das diferentes polaridades dos compostos presentes nos extratos.

5.2. PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DOS ANTIOXIDANTES EEA, ECA, BHT E TBHQ

Estudos envolvendo a técnica de análise termogravimétrica mostraram que a estabilidade de vários antioxidantes diminui com o aumento da temperatura (SANTOS et al., 2012). O tratamento termogravimétrico, TG/DTG (Figuras 14, 15, 16 e 17) dos antioxidantes EEA, ECA, BHT e TBHQ mostrou que os extratos (EEA e ECA) apresentaram perda de massa em quatro etapas de decomposição, enquanto que o BHT e BHQ apresentaram apenas uma etapa de perda de massa. A perda de massa do EEA, extração por solvente, na faixa de temperatura de 62-190°C (1ª etapa), provavelmente, é referente a saída do solvente. A segunda etapa, de 190-380°C, considerada a principal, com maior perda de massa, 56,7%, a terceira (380-458°C) e a quarta (458-600°C) etapas com perda de massa 17,5% e 19,7% respectivamente, são atribuídas, à decomposição. O

extrato clorofórmico (ECA) apresentou a 1ª etapa de perda de massa, na faixa de temperatura de 54-176°C igual a 6,5%, provavelmente, atribuída a perda do solvente. A segunda etapa, considerada a principal, com maior perda de massa, 55,8%, atribuída a decomposição. As duas últimas etapas, nas faixas de temperatura de 374-457°C e 457-504°C, apresentaram perdas de massa de 19,4% e 15,6% respectivamente, também, podendo ser atribuída a uma decomposição. O BHT apresentou uma etapa de perda de massa correspondendo a 99,7% numa faixa de temperatura de 70-210°C e o TBHQ mostrou também, uma única etapa, com perda de massa de 98% numa faixa de temperatura de 110-270°C, essas perdas de massa provavelmente, são referentes à decomposição. Segundo os dados termogravimétricos, o EEA se mostrou o mais eficiente, comparado aos outros antioxidantes. Os valores das perdas de massa dos antioxidantes (naturais e sintéticos) e suas respectivas curvas TG/DTG estão apresentados na Tabela 5 e nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

Tabela 5 - Valores obtidos das curvas TG/DTG dos extratos EEA, ECA, TBHQ e BHT.

TG-Dinâmica								
Eventos	EEA		ECA		TBHQ		BHT	
	Temperatura (°C)	Δm (%)	Temperatura (°C)	Δm (%)	Temperatura (°C)	Δm (%)	Temperatura (°C)	Δm (%)
1º	62-190	6,0	54-176	6,5	110-270	98	70-210	99,7
2º	190-380	56,7	176-374	55,8				
3º	380-458	17,5	374-457	19,4				
4º	458-600	19,7	457-504	15,6				

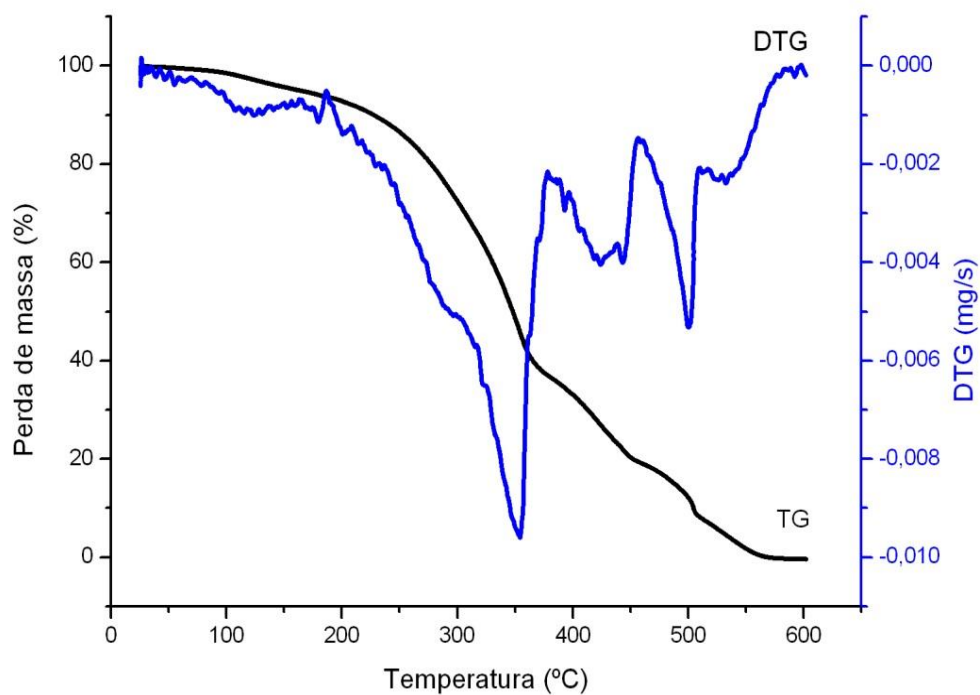
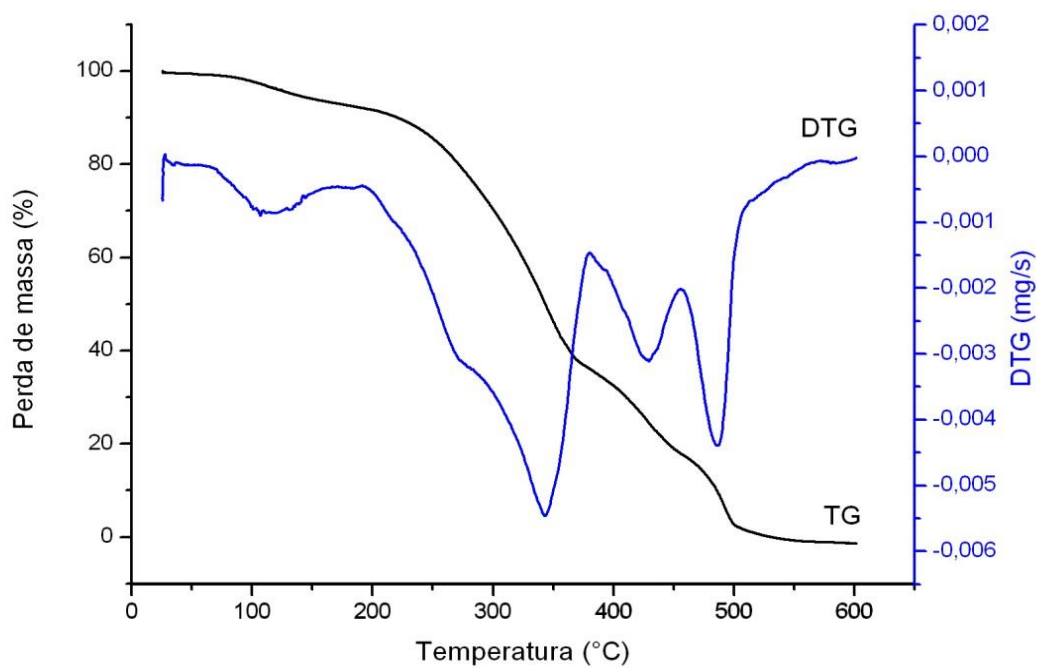
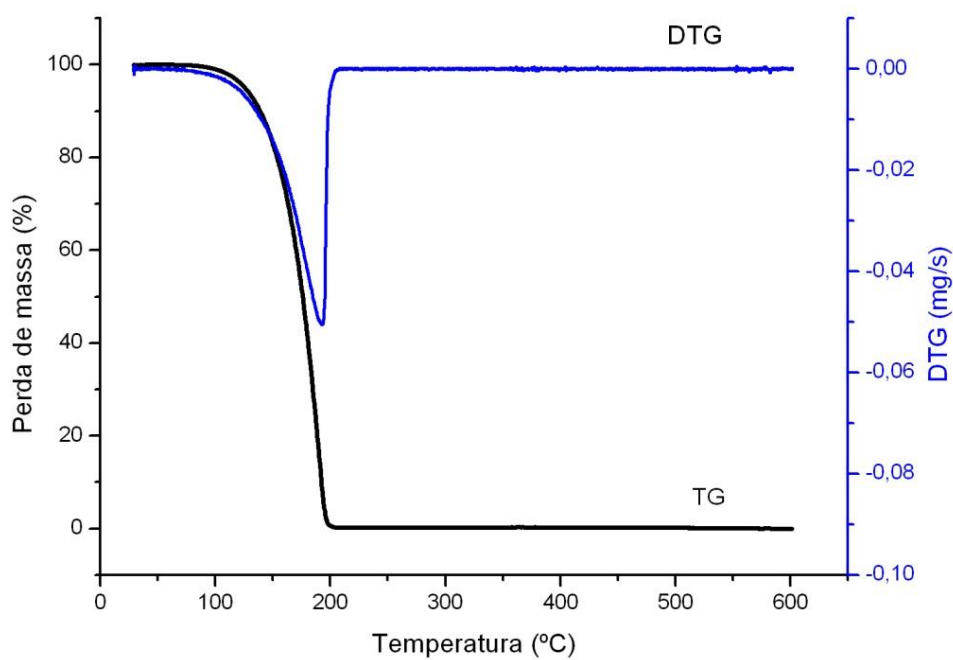
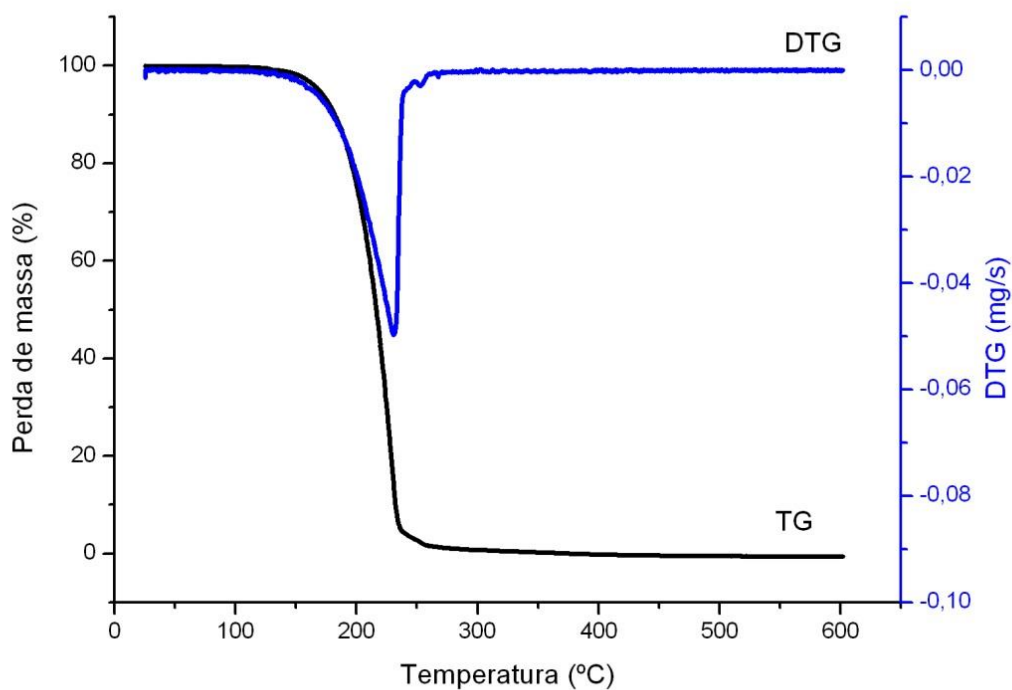
Figura 14 - Curvas TG/DTG para o EEA**Figura 15** – Curvas TG/DTG para o ECA

Figura 15 - Curvas TG/DTG para o BHT**Figura 16** - Curvas TG/DTG para o TBHQ

De acordo com os dados termogravimétricos, o EEA se mostrou mais eficiente do que aos demais antioxidantes, começando sua perda de massa, provavelmente, a partir de 190°C. Os antioxidantes ECA, BHT e TBHQ apresentaram perda de massa em temperaturas menores, o que demonstra menor estabilidade térmica com relação ao EEA. Logo, o extrato etanólico apresenta condições de ser usado como aditivo em biodiesel.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DO BODIESEL METÁLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO - BA

A qualidade do biodiesel é um fator fundamental que condiciona um bom funcionamento e tempo de vida útil de um motor. Nesse sentido, foi imprescindível avaliar o BA, e observar as especificações necessárias para o seu uso. A Tabela 6 apresenta os resultados das características do BA, determinadas seguindo as orientações do regulamento técnico da ANP Nº 4/2012.

Tabela 6 - Características do BA

CARACTERÍSTICAS	BA	Limites ANP
Massa Específica a 20 °C, Kg/m ³	881,60	850-900
Teor de água, mg/Kg	971,68	350
Ponto de Entupimento de Filtro à Frio, °C	-3	19,0
Viscosidade Cinemática a 40 °C (mm ² .s ⁻¹)	4,50	3,0-6,0
Ponto de Névoa, °C	-3	-
Ponto de Fluidez, °C	-2	-
Estabilidade à Oxidação a 110 °C - Rancimat (h)	2.02	6,0
Índice de lodo	82,49	-
Índice de acidez, mg KOH/g	0,32	0,5

De acordo com os dados presentes na Tabela 6 pode-se constatar que o BA produzido atendeu todos os limites especificados pela norma, exceto o teor de água.

Segundo o regulamento técnico da ANP Nº 4/2012, o teor de água no biodiesel, é reduzido a cada ano. Assim, no ano de publicação desta regulamentação o limite era de 350 mg.Kg⁻¹ (2013). Este teor em 2014 é de 200 mg.kg⁻¹.

O perfil dos ácidos graxos do BA é apresentado na Tabela 7. De acordo com o perfil graxo do BA, verifica-se que sua composição é formada principalmente por ésteres de ácidos graxos insaturados, totalizando 70,1%, favorecendo, assim, um biodiesel mais susceptível a reações de oxidação. Com essa composição é possível estimar o percentual de oxibilidade do BA, quando, aplicada à equação (8), formulada a partir de estudos cinéticos e que estima uma previsão da oxibilidade de um óleo ou biodiesel a partir da sua composição de ácidos graxos poli-insaturados (NEFF, 1992).

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos do BA

Símbolo numérico	Nome sistemático	Nome comum	Composição (%)
(C16:0)	Ácido hexadecanóico	Ácido Palmítico	26,1
(C18:0)	Ácido octadecanóico	Ácido Esteárico	3,8
(C18:1)	Ácido 9-octadecanóico	Ácido Oléico	16,1
(C18:2)	Ácido 9,12- octadecadienóico	Ácido Linoléico	54,0
(C18:3)	Ácido 9, 12, 15- octadecatrienóico	Ácido Linolênico	-
Não identificado			
Ácidos graxos saturados			29,9
Ácidos graxos insaturados			70,1

Equação 8 - Percentual de Oxibilidade de Biodiesel

$$OX = [0.02(\%O) + (\%L) + 2(\%Ln)]/100 \quad \text{Eq.8}$$

Onde:

OX = oxibilidade do óleo ou biodiesel (%)

% O = conteúdo de ácido oléico

% L = conteúdo do ácido linoléico

% Ln = conteúdo do ácido linolênico

De acordo com a equação (8) o BA apresentou um potencial de oxibilidade igual a 0,54%.

5.4. ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BA ADITIVADO COM EEA, ECA, BHT E TBHQ

Para avaliar a ação antioxidante dos extratos de alecrim e o sinergismo com o TBHQ, o BA foi aditivado. O efeito protetor dos antioxidantes foi avaliado por meio da determinação da estabilidade oxidativa pelo método acelerado Rancimat.

Os resultados da avaliação da estabilidade oxidativa do BA sem aditivo e aditivado com os extratos vegetais de alecrim (EEA e ECA) e os antioxidantes comerciais TBHQ e BHT, expressos em período de indução (PI), mostraram que os antioxidantes EEA e TBHQ, na menor concentração utilizada (2000 mg.kg^{-1}) atenderam os limites da ANP (PI = 6hs). Porém, o BA quando aditivado com os antioxidantes ECA e BHT, sendo, este último utilizado na indústria na qual foi obtido o biodiesel, não conseguiram atingir o valor estabelecido pela legislação, em todas as concentrações testadas. Os valores do PI estão apresentados na Tabela 8.

Os valores de PI mostram a eficiência dos antioxidantes em retardar o processo oxidativo do BA avaliada pela técnica Rancimat. Nota-se que o extrato etanólico de alecrim foi o que apresentou melhores resultados, seguido do TBHQ, que na concentração de 3000 mg.kg^{-1} apresentou uma proteção maior ao BA que o EEA. No entanto, é importante destacar que este antioxidante, é uma substância de elevada pureza (98%), ao contrário do extrato de alecrim, que é constituído de inúmeras substâncias. As duas formulações, dos antioxidantes natural e sintético, atenderam os limites determinados pela ANP.

Tabela 8 - Rancimat das amostras do BA sem aditivo e aditivado, expresso em período de indução (PI)

Amostras	Rancimat (h)
BA PURO	2,02
BA + 2000 Extrato etanólico de alecrim	7,06
BA + 2500 Extrato etanólico de alecrim	7,61
BA + 3000 Extrato etanólico de alecrim	8,15
BA + 2000 Extrato clorofórmico de alecrim	4,82
BA + 2500 Extrato clorofórmico de alecrim	5,18
BA + 3500 Extrato clorofórmico de alecrim	5,34
BA + 2000 Antioxidante sintético TBHQ	6,01
BA + 2500 Antioxidante sintético TBHQ	6,87
BA + 3000 Antioxidante sintético TBHQ	10,72
BA + 2000 Antioxidante sintético BHT	3,98
BA + 2500 Antioxidante sintético BHT	5,08
BA + 3000 Antioxidante sintético BHT	5,11

Constata-se que a estabilidade oxidativa, de todas as amostras de BA aditivadas com os extratos vegetais e com o antioxidante sintético aumentou, em relação à amostra de BA sem aditivo. Isso confirma a eficácia da aplicação de antioxidantes no biodiesel para garantir sua conservação.

A elevada atividade antioxidante do alecrim também foi verificada por Nogala-Kalucka et al., 2005, através da aplicação do extrato clorofórmico de alecrim no óleo de canola avaliado pelos métodos acelerados Oxidograph e Rancimat.

5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE ALECRIM

A manutenção da qualidade do biodiesel, necessária para difundir seu uso como combustível alternativo depende da sua resistência à oxidação durante longos tempos de estocagem. Muitas tentativas para aumentar a relativa resistência à oxidação de derivados de gordura têm apresentado aplicação para o biodiesel (KNOTHE; DUNN, 2001). O uso de antioxidantes sintéticos, como TBHQ, BHT, palmitato de ascorbila, tocoferóis, BHA e propilgalato são conhecidos por retardarem os efeitos da oxidação do biodiesel (DUNN, 2002; TAN; CHE MAN, 2002).

O uso de extratos vegetais como antioxidante tem sido reportado na literatura como uma alternativa para substituir total ou parcialmente os sintéticos (CAI et al., 2004; WOJDYŁO et al., 2007). Dentre os grupos de substâncias naturais com atividade antioxidante estão os compostos fenólicos, que podem ser encontrados em frutas, ervas e cereais.

Assim, para a utilização do extrato etanólico de alecrim no armazenamento do biodiesel de algodão se fez necessário realizar ensaios para avaliar sua capacidade antioxidante, bem como a quantificação de substâncias antioxidantes presentes no extrato vegetal. Neste contexto, utilizou-se apenas o extrato etanólico de alecrim, visto que o mesmo apresentou, frente ao biodiesel de algodão, melhor efeito protetor com um período de indução de 8,15 h, na concentração de 3000mg.kg⁻¹, enquanto que o outro extrato apresentou período de indução inferior ao exigido pela ANP.

Os valores do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante total, determinada pelos métodos DPPH•, FRAP e Sistema β-caroteno/ácido linoléico (Sist. β-c/ác. L.), do extrato etanólico de alecrim estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Teor de fenólicos totais e da capacidade antioxidante, determinada pelos métodos DPPH•, FRAP e Sist. β-c/ác. L., do extrato etanólico de alecrim

Extrato	FT (mg EAG/g extrato) ^a	Capacidade antioxidante		
		DPPH EC ₅₀ (µg/ml) ^b	FRAP (mg l Fe ₂ SO ₄ /g extrato)	Sist. β-c/ác. L. % Proteção
Alecrim	63,0 ±2,3	19,51	70,8	83,2

^a Média dos valores ± desvio padrão; n=3.

^b Concentração do antioxidante requerida para reduzir em 50% o DPPH•.
Trolox protegeu 76,72

O valor encontrado de fenólicos totais do extrato de alecrim reflete na sua atuação como antioxidante, visto que, quando comparado este valor com os outros extratos naturais, a exemplo do mate (42,45 mg EAG/g extrato) e do chá verde (40,02 mg EAG/g extrato), obtém-se uma superioridade incomparável (SOUZA, 2007).

Em relação aos ensaios de atividade antioxidante, foi determinado o EC₅₀, inferido pelo método DPPH•, indicando que, quanto menor o valor de EC₅₀ maior será a sua atividade antioxidante. Assim, analisando e confrontando o valor encontrado da atividade antioxidante do extrato de alecrim (19,51 µg/mL) com outros extratos vegetais, como a

camomila ($EC_{50} = 47.410 \mu\text{g/mL}$) e a cidreira ($EC_{50} = 27.290 \mu\text{g/mL}$) (MORAIS et al., 2009), verifica-se que o extrato em estudo pode ser considerado como uma fonte de compostos de antioxidantes.

Os métodos DPPH•, FRAP e Sistema β -caroteno/ácido linoléico agem capturando o radical orgânico livre, reduzindo o Fe^{+3} para Fe^{+2} e quantificando os produtos formados durante a peroxidação dos lipídios, respectivamente. Este resultado pode ser atribuído à presença dos diterpenos fenólicos, ácido carnósico, carnosol e do ácido rosmarínico (MAHMOUD et al., 2005; ALMELA et al., 2006).

Erkan et al. (2008) avaliando o extrato metanólico de alecrim encontrou valores superiores ao encontrado nesta pesquisa. Esta diferença pode ser atribuída ao uso do solvente, ao método de extração e a origem da planta, que são fatores que podem influenciar no resultado.

5.6. ARMAZENAMENTO DO BIODIESEL METÁLICO DO ÓLEO DE ALGODÃO

O biodiesel metílico do óleo de algodão foi aditivado e armazenado durante 90 dias com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT e o natural EEA, nas concentrações de 3000 mg.kg^{-1} , além da combinação dos antioxidantes TBHQ e EEA, nas concentrações de 1500 mg.kg^{-1} cada. A Tabela 10 mostra os códigos das amostras sem aditivo e aditivado nas respectivas concentrações para o BA.

Tabela 10 - Código das amostras do BA nas suas concentrações para o armazenamento

Amostras	Códigos
BA sem aditivo	BA100
BA + 3000 BHT	BAHT
BA + 3000 TBHQ	BAT
BA + 3000 Extrato Etanólico de Alecrim	BAEB
BA + 1500 TBHQ + 1500 Extrato Etanólico de Alecrim	BATEB

Os resultados da caracterização e da estabilidade oxidativa do biodiesel metílico do óleo de algodão, sem aditivo e aditivado com os antioxidantes sintético (TBHQ e BHT) e vegetal (EEA), e a combinação destes (TBHQ e EEA), durante o período de armazenamento estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados das características do BA armazenado por 90 dias

CARACTERÍSTICAS	BA100				BAT (TBHQ)				BAHT (BHT)				BAEB (EEA)				BATEB (TBHQ + EEA)			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
ME a 20°C (Kg/m ³)	881,6	882,7	882,6	889,9	-	882,4	882,6	882,2	-	882,6	882,6	882,3	-	882,6	882,3	882,2	-	882,3	882,2	881,9
Teor de água (mg.Kg ⁻¹)	971,68	1012	1007	1112	-	1026	1157	1204	-	1032	1107	1212	-	953	934	1278	-	939	1090	1200
PEFF (°C)	3	2	2	3	-	2	3	3	-	1	2	3	-	2	4	3	-	3	4	4
VC a 40°C (mm ² .s ⁻¹)	4,5	4,7	4,9	4,8	-	4,9	4,7	4,8	-	4,7	4,7	4,9	-	4,8	4,7	4,9	-	4,8	4,7	4,8
Ponto de Névoa (°C)	3	3	3	3	-	3	3	4	-	4	2	4	-	2	3	4	-	3	3	4
Ponto de Fluidez (°C)	2	3	3	3	-	2	2	3	-	3	2	3	-	2	2	3	-	2	2	3
Rancimat (h)	2,018	0,5	0,44	0,44	10,42	11,48	9,27	7,42	5,07	4,012	3,44	3,36	8,09	6,52	6,35	5,44	21,5	9,45	10,1	8,36
IP (meq.1000 ⁻¹)	15,05	21,2	55,7	65,5	9,7	15,4	16	15,4	9,6	23	38,1	42,15	9,49	13,6	16,3	17,06	9,9	13	13,4	12,42
II (g I ₂ .100g ⁻¹)	82,49	111,49	60,73	125,09	111,04	119,65	57,56	118,29	99,71	99,71	87,74	120,1	94,72	108,77	91,55	115,12	103,33	101,52	193,07	113,3
IA (mg KOH.g ⁻¹)	0,32	0,24	0,3	0,34	0,33	0,29	0,31	0,31	0,34	0,26	0,3	0,31	0,62	0,47	0,52	0,01	0,41	0,31	0,37	0,01
Dienos (nm)	0,65	0,79	1,14	1,79	0,65	0,64	0,61	0,71	0,55	0,82	0,95	1,18	0,69	0,66	0,66	0,81	0,63	0,63	0,62	0,69
Trienos (nm)	0,11	0,14	0,15	0,2	0,13	0,14	0,15	0,18	0,12	0,14	0,14	0,17	0,14	0,12	0,13	0,14	0,11	0,12	0,13	0,15
Ponto de Fulgor (°C)	165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: ME= Massa Específica; PEFF= Ponto de Entupimento de Filtro à Frio; VC= Viscosidade Cinemática; Rancimat= Estabilidade à Oxidação a 110 °C; IP= Índice de Peróxido; II=Índice de Iodo e IA= Índice de acidez, T0 = Tempo inicial, T1 = 30 dias, T2 = 60 dias, T3 = 90 dias.

Pelos resultados dos ensaios realizados com o BA100 pode-se verificar que os parâmetros massa específica a 20 °C (ME), ponto de fulgor, viscosidade cinemática a 40 °C (VC), ponto de entupimento do filtro a frio (PEFF), ponto de névoa e fluidez, bem como o índice de acidez (IA) estão dentro das especificações estabelecidas pela ANP para a comercialização do produto.

Entretanto, o teor de água do BA antes mesmo do armazenamento já se apresentou acima dos limites determinados pela ANP. Na presença de água, os ésteres podem sofrer hidrólise, levando à formação de ácidos graxos de cadeia longa e álcoois. O biodiesel, por ser higroscópico, merece maior cuidado, pois no caso de longos períodos de armazenamento, a presença de água pode favorecer a oxidação e assim, o aumento da acidez e o crescimento de micro-organismos provocando sérios problemas, como a corrosão nos motores que o utilizam (KNOTHE et al., 2006).

A baixa estabilidade oxidativa do BA100, evidenciada pelo valor de PI (Tabela 11), determinado pela técnica Rancimat já era esperada, haja vista os elevados teores de ácidos graxos insaturados presentes no BA (70%) (Tabela 7), corroborado com os valores de índice de iodo (II). O valor de PI do BA100 encontrado está fora do limite determinado pela Resolução nº 14/2012 da ANP, mas se assemelha com o resultado encontrado por Rodrigues Filho (2011) que obteve um valor de PI de 2,54 hs para o biodiesel etílico de algodão, através da mesma técnica.

Além das análises exigidas pela ANP, foram feitas a determinação do índice de peróxidos, os dienos e trienos conjugados realizados a cada 30 dias durante o armazenamento do BA sem e com os antioxidantes. Esses resultados estão apresentados na Tabela 11 e na Figura 18 (a, b e c), onde se verifica que, para essas técnicas de análise, a amostra de BA100 é oxidada mais rápido.

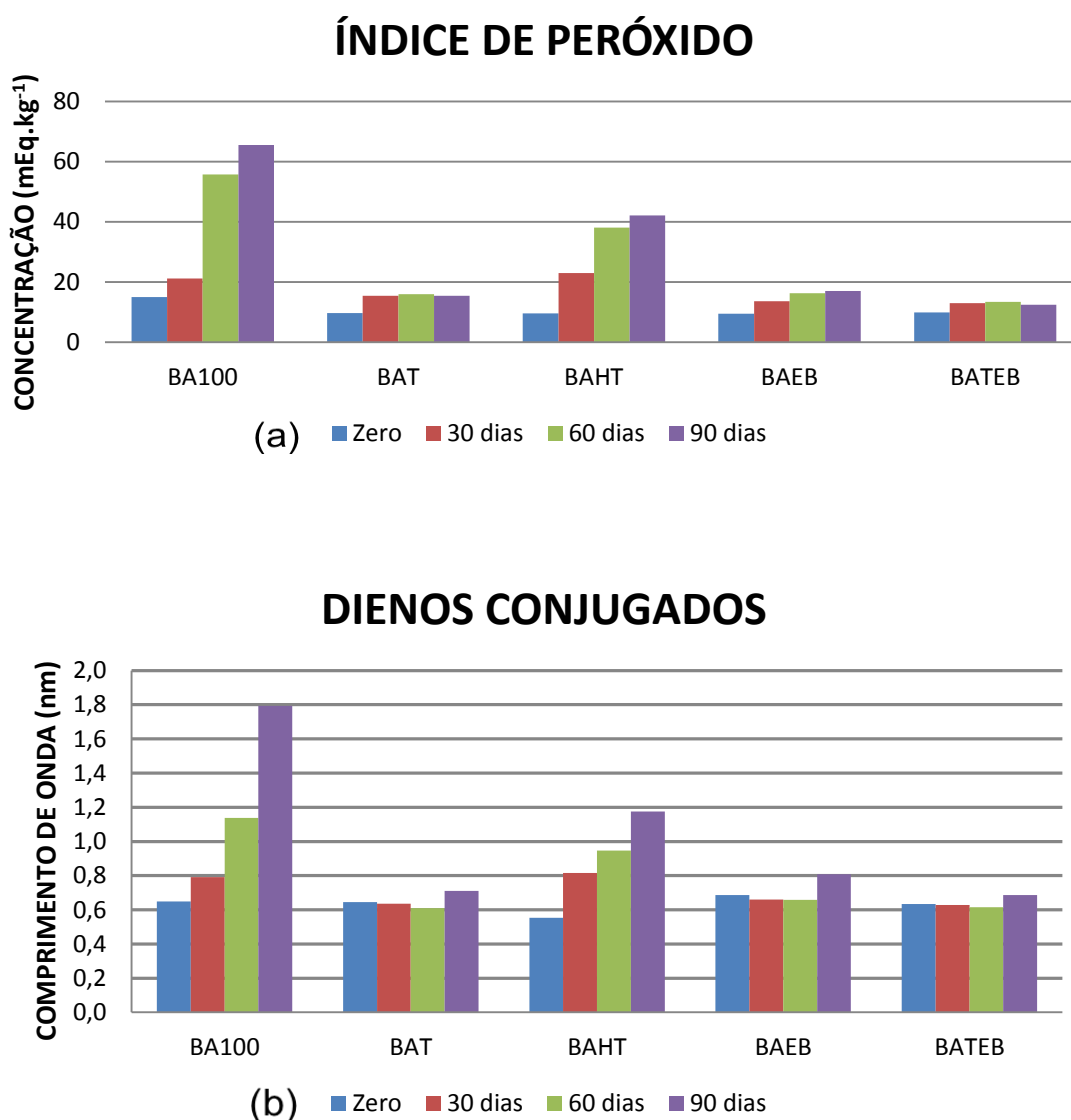
A Figura 18 (a) mostra o aumento progressivo dos valores de peróxido das amostras de BA durante o armazenamento. Os peróxidos são radicais que representam oxidação do biodiesel, etapa onde os antioxidantes doadores de hidrogênios podem retardar o processo oxidativo, restaurando a cadeia dos ésteres alquílicos de ácido graxo. Isto foi confirmado pelas amostras aditivadas com os antioxidantes, onde os valores de peróxidos foram mais baixos, com exceção das amostras aditivadas com o antioxidante sintético BHT, cuja formulação é: BAHT.

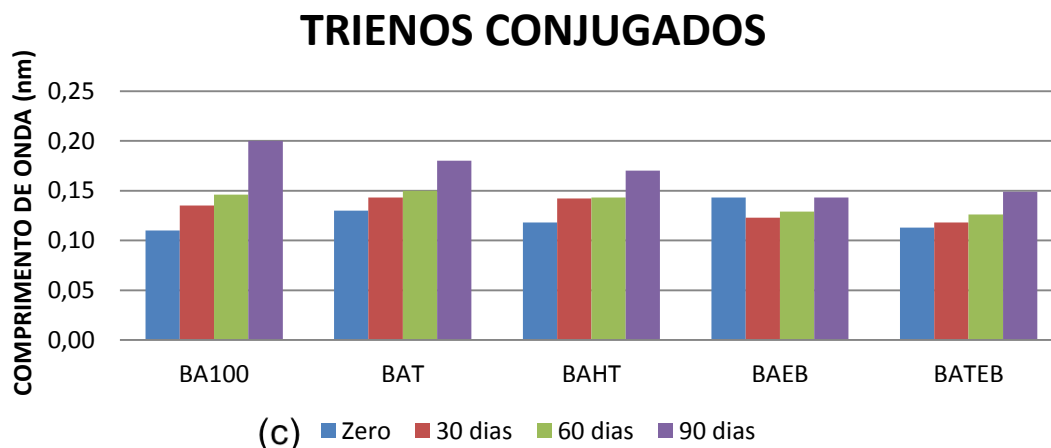
Esses dados correlacionam-se com os resultados obtidos por Santos (2009), que avaliou a o efeito protetor do extrato de alecrim na formação de peróxidos em gordura láctea (manteiga) durante 40 dias, em teste realizado em estufa. Verificando que o extrato

etanólico de alecrim apresentou índices de peróxido menores que o antioxidante sintético BHT durante o período de análise, e o teor de peróxidos formados na amostra aditivada com o antioxidante natural foi praticamente 50% do valor obtido na manteiga durante todo período, evidenciando o efeito protetor do extrato etanólico de alecrim frente a reações oxidativas.

Vale ressaltar que a mistura do TBHQ com o EEA (BATEB) mostrou maior eficiência na proteção do biodiesel no que diz respeito à formação de peróxidos, visto que durante o armazenamento a amostra aditivada com essa formulação apresentou os menores valores de peróxido, sendo que aos 90 dias houve um pequeno decréscimo decorrente das reações paralelas que ocorrem com a decomposição dos hidroperóxidos.

Figura 17 - Índice de Peróxido (a), Dienos (b) e Trienos Conjugados (c), em função dos dias de estocagem para cada amostra.





As Figuras 18 (b e c) mostram a formação de dienos e trienos conjugados, respectivamente, durante o armazenamento do BA. Teores mais elevados foram observados para o BA100, indicando maior intensidade de oxidação.

Segundo Yoon et al., 1991 a determinação dos dienos e trienos é uma boa medida do estado oxidativo dos óleos e, assim, um bom indicador da eficácia do uso de antioxidantes. O conteúdo de dienos conjugados das amostras de BA100 e BAHT continuou aumentando ao longo do tempo de armazenamento. No entanto, as formulações BAT, BAEB e BATEB apresentaram comportamentos semelhantes, ocorrendo uma pequena diminuição na concentração de dienos até aos 60 dias, e um pequeno aumento dos 60 até aos 90 dias, confirmando, assim, a ação dos antioxidantes EEA e TBHQ e o sinergismo entre ambos. Os resultados das análises de dienos estão mostrados na Tabela 11 e Figura 18 (b).

Ramalho (2005) avaliou a atuação do extrato de alecrim comercial em óleo de soja na formação de dienos conjugados durante um período de 10h de aquecimento em ensaio de estufa, verificando que o extrato de alecrim demonstrou efeito antioxidante durante todo o transcorrer da análise.

Resultados semelhantes à proteção do alecrim frente a formação de dienos em meio lipídico foram também obtidos por Frankel et al., (1996), onde o mesmo avaliou a atividade antioxidante do extrato de alecrim em vários tipos de óleo na concentração de 1000 mg. kg⁻¹, verificando que o referido extrato inibiu a formação de dienos, com redução de 70,53% quando comparado com o controle.

Os trienos, segundo dado da Tabela 7, não deveria se fazer presente no BA, porém, é sabido que numa oxidação pode ocorrer uma polimerização, logo, é possível a

presença de trienos conjugados, como é confirmado pelas análises, cujos valores estão na Tabela 11, e mostrados na Figura 18 (c). Ressaltando-se que a amostra aditivada com a mistura de TBHQ e EEA (BATEB), durante os 60 dias houve menor formação de trienos, enquanto que, aos 90 dias foi o EEA (BAEB) a mais eficiente de todas em proteger o biocombustível.

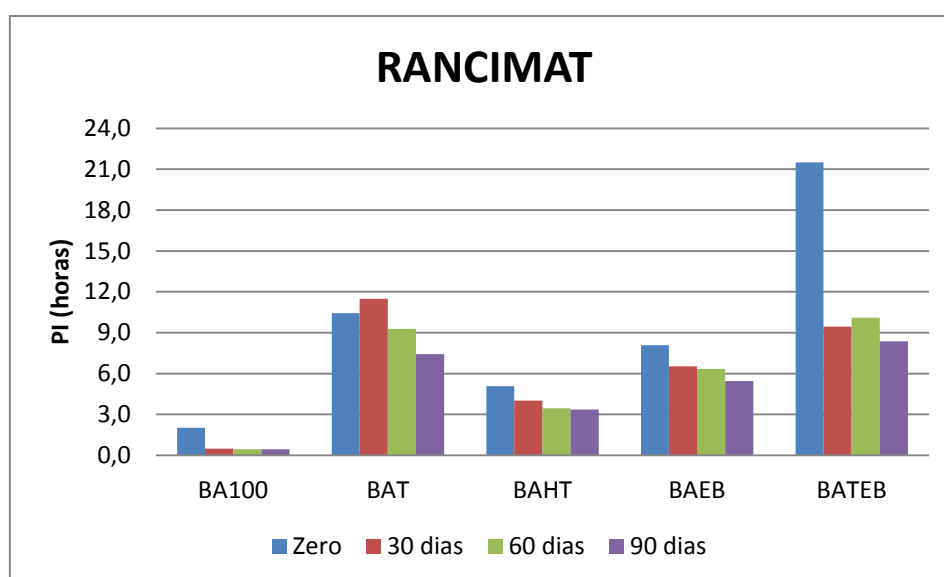
O PI do BA100 de 2,02 h, obtido pelo equipamento Rancimat, foi inferior ao limite mínimo permitido, justificando desta forma, o uso de aditivos antioxidantes para corrigir a baixa estabilidade oxidativa do BA.

Vários estudos têm demonstrado que o extrato de alecrim possui um elevado poder antioxidante e proporciona um melhor fator de proteção na estabilidade oxidativa de matrizes lipídicas (ALMELA et al., 2006; MORENO et al., 2006).

Nesse sentido, aplicou-se o extrato etanólico de alecrim diretamente no BA de forma à avaliar a capacidade antioxidante do extrato natural e a estabilidade oxidativa do BA durante o armazenamento.

O monitoramento da estabilidade oxidativa das amostras do BA sem e com os antioxidantes mostrou a ação de todos os aditivos no início do armazenamento. Contudo, as amostras de BAHT não foram eficientes, pois não atenderam as especificações da norma ANP. A Tabela 11 e a Figura 19 mostram a evolução dos valores de PI obtidos pelo método Rancimat em função do tempo de estocagem para cada amostra.

Figura 18 - Valores de PI obtidos pelo método Rancimat em função dos dias de estocagem para cada amostra.



Durante o período de armazenamento foi verificado um decréscimo nos valores de PI para todas as amostras, dos 30 aos 90 dias, com exceção da formulação BATEB, que aos 60 dias houve um aumento, mas, seguido de um decréscimo.

De acordo com a literatura, os antioxidantes podem perder sua eficiência em função do tempo de estocagem (TANG et al., 2010). Esse comportamento foi observado no primeiro mês nas amostras BAHT, BAEB e BATEB, mostrando que os antioxidantes presentes no BA foram consumidos e/ou perderam a eficiência para interromper a etapa de propagação.

A eficiência antioxidante mais elevada do TBHQ, no início do armazenamento, é atribuída a sua capacidade de doação dos hidrogênios fenólicos e estabilização do radical formado, através da ressonância interna do anel aromático.

Avaliando o comportamento do BAHT (BHT) verificou-se que o mesmo, apresentou frente as formulações aditivadas o menor efeito protetor. E quando compara-se com o BAT (TBHQ), evidencia-se uma enorme discrepância quanto ao efeito protetor. Esse fato corrobora com os estudos de Liang et al., 2006 que utilizou o Rancimat para avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel de palma aditivado com antioxidantes sintéticos, constatando que a eficiência antioxidante do TBHQ é superior ao BHT, por causa de suas estruturas moleculares.

A eficiência do TBHQ como antioxidante para biodiesel de algodão já foi evidenciada em estudos anteriores. Fernandes et al., 2012 reportou a atuação deste antioxidante sintético na estabilidade oxidativa do biodiesel de algodão obtido laboratorialmente, observando que a adição de 300 mg. kg⁻¹ é suficiente para que este biodiesel atenda as normas da ANP.

O extrato etanólico de alecrim mostrou-se eficiente durante 60 dias de armazenamento, atendendo as exigências da ANP. Esta atividade antioxidante é associada à presença de ácidos fenólicos, flavonoides, diterpenóides e triterpenos fenólicos tais como o ácido carnósico, carnosol, rosmanol e ácido rosmarínico (MAHMOUD et al., 2005; ZHANG et al., 2010). Estes compostos agem em diferentes mecanismos podendo doar seus hidrogênios do grupo hidroxila, como também quelar metais. Coimbra et. al., 2007 avaliou a estabilidade oxidativa do óleo de soja com e sem adição de extrato de alecrim, constatando que o extrato vegetal aumentou a estabilidade oxidativa do óleo de soja. Porém, em tempos de aquecimento elevados, maior que 30h, a 180 °C, o extrato não apresentou efeito antioxidante.

Vale ressaltar que o BAEB apresentou menor proteção quando comparado ao BAT, fato que pode ser justificado pela grande quantidade de compostos diferentes presentes no extrato, que atuam de formas distintas frente às reações oxidativas, já existentes no biodiesel. Em contrapartida no BAT se faz presente um composto que apresenta uma pureza de 98% (TBHQ) e que possui atividade antioxidante.

É necessário frisar, que o extrato etanólico de alecrim se mostrou mais eficiente do que o BHT, frente ao processo oxidativo do biodiesel do óleo de algodão. Esse fato foi constatado por Cordeiro et. al., 2013, que obteve alto efeito protetor no óleo de soja, de 10,8 h, obtido em Rancimat, quando aditivado com extrato de alecrim na concentração de 1000 mg.kg⁻¹, sendo este valor 1,7 vezes maior do que o obtido para o óleo de soja aditivado com BHT.

O comportamento antioxidante do extrato etanólico de alecrim foi diferenciado quando associado ao TBHQ, aumentando os valores de PI observado ao longo do armazenamento, indicando que o sinergismo entre o extrato etanólico de alecrim e o antioxidante sintético nas concentrações utilizadas foram eficientes em proteger o BA das reações de oxidação. De acordo com a literatura o extrato de alecrim apresenta efeito sinérgico com antioxidantes naturais. Fröhlich et. al., 2012, avaliou a atuação do extrato de alecrim juntamente com o ácido gálico quando adicionado ao óleo de *camelina sativa* e observou que o efeito protetor da formulação sobre o óleo foi de 86,1% enquanto que o do extrato foi de apenas 53,0%.

6. CONCLUSÃO

- Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante, pelos métodos DPPH•, FRAP e Sistema β -caroteno/ácido linoleico, obtidos neste estudo mostraram que o EEA é uma fonte potencial e promissora de antioxidantes para biodiesel, sendo capaz de protegê-los dos processos oxidativos;
- A estabilidade térmica do EEA, analisado por termogravimetria mostrou-se estável, pois, sua perda de massa teve início em torno de 190°C, comportamento não encontrado nos outros antioxidantes analisados, logo, o EEA apresentou maior resistência térmica quando analisado por TG;
- O EEA mostrou ter um bom potencial antioxidante segundo as determinações de FT, quando comparado a outros extratos naturais encontrados na literatura; podendo assim ser usado para melhorar a estabilidade do biodiesel.
- De acordo com os dados obtidos no armazenamento, todos os antioxidantes estudados corrigiram e retardaram a oxidação do BA;
- Segundo as normas da ANP, o EEA protegeu o BA até 60 dias;
- O TBHQ e a formulação BATEB protegeram o BA durante todo armazenamento, obedecendo às exigências da ANP.
- Os antioxidantes EEA e TBHQ apresentaram efeito sinérgico, contribuindo para a proteção do BA por 90 dias, atendendo às exigências da ANP;
- Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o extrato de alecrim é uma fonte promissora de bioaditivo, com capacidade antioxidante, sendo capaz de proteger as matrizes oleaginosas dos processos oxidativos.

REFERÊNCIAS

ALMELA L, SANCHEZ-MUNOZ B, FERNANDEZ-LOPEZ JA, ROCA M J, RABE V. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**, v. 112, p. 221–29, 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.

ANP – Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustível. Decreto-lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.5.2012 - DOU 18.5.2012

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário estatístico 2011. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=56346>. Acessado em: 23/02/2013.

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

ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K.; ABDUL AZIZ, A.R.; SULAIMAN, N.M.N. The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 3456– 3470, 2012.

BASKAN, S., OZTEKIN, N., ERIM, F. B.: Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1748-1751, 2007.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food Chemistry**. Berlim: Springer Verlag, 2 ed., 1999.

BOLLAND, J. L.;TENHAVE, P. Discuss **Faraday Society**, v. 2, p. 252, 1947.

BONOLI, M.; PELILLO, M.; TOSCHI, T.G.; LERCKER G. Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE. **Food Chemistry**, v. 81, p. 631-638, 2003.

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

BRASIL. Ministério de Minas e Energia, disponível em <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html> acessado em 06/03/2013.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CORDEIRO, A. M. T. M.; MEDEIROS, M. L.; SANTOS, N. A.; SOLEDADE, L. E. B.; PONTES, L. F. B. L.; SOUZA, A. L.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract: Thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. DOI 10.1007/s10973-012-2778-4.

DAVÍDEK J., VELÍŠEK J., POKORNÝ J. **Chemical Changes during Food Processing**, ed. Elsevier, 1990

DCR – Department of Renewable Fuels. Month Bulletin of Renewable Fuels 16 [In Portuguese], 2009.

DEPKEVICIUS, A.; VENSKUTONIS, R.; BEEK, T. A. V.; LINSSEN, JPH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, p. 140-146, 1998.

DIWANI G. EL; RAFIE S. EL; HAWASH S. Protection of biodiesel and oil from degradation by natural antioxidants of Egyptian *Jatropha*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 369-378, 2009.

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

DUNN, R. O. Effect of Oxidation Under Accelerated Conditions on Fuel Properties of Methyl Soyate (Biodiesel). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 915-920, 2002.

ERKAN N, AYRANCI G, AYRANCI E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, p. 76–82, 2008.

FELDMANN, K.A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 162-167, 2001.

FRÖHLICH, A., O'DEA, G., HACKETT, R., O'BEIRNE, D., EIDHIN, D. N., BURKE, J. Stabilization of camelina oil with synthetic and natural antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 837- 847, 2012.

FU, L.; XU, B.T.; XU, X.R.; GAN, R.Y.; ZHANG, Y.; XIA, E.Q.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v.129, p. 345-350, 2011.

JULKUNEN-TIITTO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

KNOTHE, G.; DUNN, R. O.; **Oleochemical Manufacture and Applications**, Academic Press: Sheffield, 2001.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. 1^a ed. Edgar Blücher, São Paulo, 340pp, 2006.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidants properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEHNINGER, A. L. bioquímica. In: **Componentes moleculares das células**, v. 1, p. 190-205, 1976.

LIANG, Y. C.; MAYA, C. Y.; FOONA, C. S.; NGANA, M. A.; HOCKB, C. C.; BASIRONA, Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. **Fuel**, v. 85, n. 5–6, p. 867–870, 2006.

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

LOVE, J. "Factors affecting lipid oxidation". In: MIN, D. B. & SMOUSE, T. H. (eds.) Flavor chemistry of fats and oils. Champaign, AOCS, p. 61-78, 1985.

MAHMOUD, A.A.; AL-SHIHRY, S.S.; SON, B.W. Diterpenoidquinones from (*Rosmarinus officinalis* L.). **Phytochemistry**, v. 66, p. 1685-90, 2005.

MARCO, G. J. A. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.5, n.9, p.594-598, 1968.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

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

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

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S.; VOJNOV, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, n. 2, p. 223–231, 2006.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 29, p. 95-111, 2004.

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

NEFF, W.E.; SELKE, E.; MOUNTS, T.L.; RINSCH, W.; FRANKEL, E.N.; ZEITOUN, M.A.M. Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germplasm. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 111-118, 1992.

NGUYEN, T.; DO, L.; SABATINI, D.A. Biodiesel production via peanut oil extraction using diesel-based reverse-micellar microemulsions. **Fuel**, v. 89, p. 2285–91, 2010.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; & BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Food Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 227–235, 2005.

OBADIAH A, KANNAN R, RAMASUBBU A, KUMAR SV. Studies on the effect of antioxidants on the long-term storage and oxidation stability of Pongamia pinnata (L.) Pierre biodiesel. **Fuel Process Technol**, v. 99, p. 56-63, 2012.

OETTERER, M.; REGITANO-D' ARCE, B. A. M.; SPOTO, F. H. M. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; Manole, Barueri-SP; p. 270, 2006.

PÉREZ-GALVÉS, A.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. A. Degradation, under non-oxygen mediated autooxidation, of carotenoid profile present in paprika oleoresins with lipid substrates of different fatty acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 632-637, 2004.

PESHEV, D.; PEEVA, L.G.; PEEV, G.; BAPTISTA, I.I.R.; BOAM. A.T. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 318–327, 2011.

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

RAMALHO, V. C.; Ação antioxidante de α -tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2005.

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

RODRIGUES FILHO, M. G. Cardanol e Eugenol Modificados – Uso Como Antioxidantes no Controle do Processo Oxidativo do Biodiesel Etilico de Algodão Tese de Doutorado. UFPB/CCEN, 2011.

ROSENHAIM, RAUL. Avaliação das Propriedades Fluído-dinâmicas e Estudo Cinético por Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (PDSC) de Biodiesel Etílico Derivado de óleo de fritura Usado. Tese de doutorado, UFPB/CCEN, 2009.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

ROVELLINI, P.; CORTESI; FEDELI. Ossidazione dei lipidi. Nota I. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 74, n. 5, p. 181-9, 1997.

SANTOS N. A.; CORDEIRO, A. M. T. M.; DAMASCENO, S. S.; AGUIAR, R. T.; ROSENHAIM, R.; CARVALHO FILHO, J. R.; SANTOS, I.M.G.; MAIA, A.S.; SOUZA, A.G. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. **Fuel**, v. 97, p. 638–43, 2012.

SANTOS, R. D. Compostos fenólicos de ervas *Lamiaceae* na estabilidade oxidativa da manteiga e avaliação da toxicidade de extrato de alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.) Tese de doutorado. Universidade Estadual de Londrina, 2009.

SATOH, T; KOSAKA, K; ITOH, K; KOBAYASHI, A; YAMAMOTO, M; SHIMOJO, Y; KITAJIMA, C; CUI, J; KAMINS, J; OKAMOTO, S. Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap 1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, p. 1116–1131, 2008.

SCARPATI, M.L; ORIENTE, G. Isolamento e constituição dell'ácido rosmarinico (dal rosmarinus off.). **La Ricerca Scientifica**, v. 28, p. 2329–2333, 1958.

SCHAICH, K. M. Lipid Oxidation:Theoretical Aspects. **In Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, Edible oil and fat products: chemistry, properties, and health effects. 6 ed, Ed.Fereidoon Shahidi, v. 1, 2005.

SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of Diesel fuels from vegetable oils. **Fuel**, v. 66, p. 1372-8, 1987.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**. v. 44, n. 3, p.158-63, 2000.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 4067-4079, 2010.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200–16, 2010.

SMOUSE, T.H. Factors affecting oil quality and stability. In: WARNER, K.; ESKIN, N.A.M. **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign, IL, AOCS, 1995.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOLOMOS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SOUZA, R. A. M. Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação de mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B. Recent developments in differential scanning calorimetry for assessing oxidative deterioration of vegetable oils. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 9, p. 312-318, 2002.

TANG, H.; GUZMAN, D.E.; NG, R.C.; SALLEY, K.Y.S. O Effect of Antioxidants on the Storage Stability of Soybean-Oil-Based Biodiesel. **Energy Fuels**, v. 24, p. 2028–2033, 2010.

TYSON, K.S.; BOZELL, J.; WALLACE, R.; PETERSEN, E.; AND MOENS, L. Biomass Oil Analysis: Research Needs and Recommendations, National Renewable Energy Laboratory. Technical Report, NREL/TP-510-34796 2004.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p.1802-1812, 1999.

WILLIAMS, C.A.; GRAYER, R.J.; Anthocyanins and other flavonoids. **Natural products Reports**, v.21, p.539-573, 2004.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

ZHANG, Y.; YANG, L.; ZU, Y.; CHEN, X.; WANG, F.; LIU, F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 118, p. 656–662, 2010.