

Extrato de folhas de erva-mate *in natura* como aditivo ao biodiesel

In natura yerba mate leaf extract as an additive to biodiesel

Marilei de Fátima Oliveira¹, Marcos Henrique Cerrutti², Nathalia Sampaio Sant Anna³, André Lazarin Gallina⁴, Giovanna Oleinik⁵, Daniel Tait Vareschini⁶

RESUMO: O biodiesel é uma solução energeticamente renovável ao diesel, entretanto, sua instabilidade química, exige a utilização de antioxidantes sintéticos, para não permitir alterações indesejáveis na qualidade deste biocombustível. A substituição das moléculas sintéticas por antioxidantes naturais pode tornar o biodiesel totalmente renovável. Neste trabalho tem-se o objetivo de avaliar a eficácia do extrato de folhas *in natura* de *Ilex Paraguariensis St. Hill*, sob a estabilidade oxidativa do biodiesel. Foram empregadas técnicas para caracterização do extrato, tais como: cromatografia gasosa, espectroscopia de energia dispersiva, determinação da capacidade antioxidante e fenólicos totais. Obteve-se atividade antioxidante de até 96% e teor de fenólicos totais para o extrato ácido de 32.679,0 mg EAG g⁻¹. Utilizando concentrações de 200 ppm do antioxidante sintético terc-butil-hidroquinona e extrato ácido de folhas nativa de erva-mate, *in natura*, resultou em um efeito sinérgico na atividade antioxidante de 15%, e tempo de indução, superior ao mínimo exigido pela Resolução da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) nº 920/2023. A condição de melhor extração de antioxidantes foi quando se tem 33,33 g de folhas *in natura* em meio ácido por 11,55 h a uma temperatura de 47,22 °C.

Palavras-chave: Antioxidante; Espécie nativa; Estabilidade oxidativa.

ABSTRACT: Biodiesel is an energetically renewable solution to diesel, however, its chemical instability requires the use of synthetic antioxidants, so as not to allow undesirable changes in the quality of this biofuel. Replacing synthetic molecules with natural antioxidants can make biodiesel fully renewable. This work aims to evaluate the effectiveness of the *in nature Ilex Paraguariensis St. Hill* leaf extract under the oxidative stability of biodiesel. Techniques used to characterize the extract were: gas chromatography, dispersive energy spectroscopy, determination of antioxidant capacity and total phenolics. Antioxidant activity of up to 96% and total phenolic content for the acid extract of 32679.0 mg EAG g⁻¹ were obtained. Using concentrations of 200 ppm of the synthetic antioxidant tert-butylhydroquinone and acid extract from the native leaves of yerba mate *in nature*, resulted in a synergistic effect in antioxidant activity of 15% and induction time, higher than the minimum required by Resolution No. 920/2023 of the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels. The condition for the best extraction of antioxidants was when 33.33 g of *in nature* leaves were kept in an acidic medium for 11.55 h at a temperature of 47.22 °C.

Keywords: Antioxidant; Native species; Oxidative stability.

Autor correspondente: Marilei de Fátima Oliveira
E-mail: ofmarilei@gmail.com

Recebido em: 2025-02-07
Aceito em: 2025-11-03

¹ Doutora em Química pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Guarapuava (PR), Brasil.

² Graduando em Engenharia Mecânica pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Guarapuava (PR), Brasil.

³ Graduanda em Engenharia Mecânica pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Guarapuava (PR), Brasil.

⁴ Doutor em Química Aplicada pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Professor Permanente da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) e do Programa em Rede de Pós-Graduação em Bioenergia (PPB). Coordenador Institucional do NAPI Hidrogênio, Guarapuava (PR), Brasil.

⁵ Mestra em Química Aplicada pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava (PR), Brasil.

⁶ Doutor em Ciências Morfológicas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Professor Permanente do Programa em Rede de Pós-Graduação em Bioenergia (PPB) e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PEQ) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil.



1 INTRODUÇÃO

A crescente utilização da erva-mate como matéria-prima, para diversos setores produtivos como nas indústrias de cosméticos e alimentícios, se dá devido sua composição química. Os principais compostos químicos detectados nas folhas e ramos da planta são os polifenóis (ácido clorogênico) e em maior concentração as xantinas (cafeína e teobromina). Esses compostos possuem diversas propriedades, como estimulantes, antioxidantes e anti-inflamatórias. Por esse motivo diversas pesquisas, foram realizadas para determinar o potencial antioxidante do extrato de erva-mate, com o intuito de mostrar as potencialidades desta planta (Cheminet *et al.*, 2021; Contreras-Esquível *et al.*, 2022; Duarte *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022a; Wolff *et al.*, 2019).

A erva-mate apresenta variações em sua qualidade e no conjunto de suas características físico-químicas, devido à influência de alguns fatores como: idade da planta, época de colheita, os tipos de cultivares da erva (nativos ou de origem de reflorestamento), os sistemas de cultivo, a região produtora, a incidência solar ou de sombra na planta, solo e até as formas de beneficiamento e armazenamento (Duarte *et al.*, 2020).

Nos estudos de aplicação da erva-mate como antioxidante natural, múltiplas técnicas têm sido exploradas para realizar a extração dos seus compostos ativos, visando sua aplicabilidade em substituição aos antioxidantes sintéticos, os quais tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade-toxicidade. Atualmente, as pesquisas se direcionam no sentido de encontrar compostos naturais que possam substituir os sintéticos, ou realizar associações com estes, minimizando sua aplicabilidade com visão sustentável dos sistemas estudados (Silva *et al.*, 2022b; Perín *et al.*, 2024; Boschen, 2020).

O uso de antioxidantes no biodiesel é essencial devido sua baixa instabilidade oxidativa. Ao contrário dos combustíveis fósseis, que apresentam características mais estáveis, pouco alteradas ao longo da estocagem e relativamente inertes aos demais tipos de efeitos de degradação, o biodiesel tem seu tempo de oxidação acelerado, devido à ação do ar, da luz, temperatura e umidade (Masetto, 2022). O contato com contaminantes, orgânicos, inorgânicos ou microbianos tendem a introduzir variações significativas na qualidade do produto quanto à resistência a oxidação. A exposição do biodiesel ao ar atmosférico, também é um dos principais fatores de oxidação, permitindo alterações indesejáveis na qualidade deste biocombustível e suas misturas, tais como: elevação da acidez, aumento da corrosividade metálica e a formação de produtos indesejáveis, como polímeros e depósitos que podem ser observados ao longo do tempo de estocagem (Braga *et al.*, 2024; Boschen, 2020).

A instabilidade oxidativa do biodiesel é, portanto, uma grande barreira ao uso do biodiesel, quando utilizado em percentual maior do que o autorizado pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2023) e consequente aumento do mercado para esse biocombustível. O uso de antioxidantes sintéticos na produção do biodiesel não contribui para obtenção de um processo renovável, desta forma a adição de antioxidantes naturais, em biodiesel pode minimizar este impacto (Silva *et al.*, 2022b; Silva *et al.*, 2022c; Molinare *et al.*, 2022).

A atividade antioxidante proveniente de uma fonte natural é influenciada por diversos fatores, tais como, país ou região na qual a planta foi cultivada, o solvente, a técnica de extração empregada, e ainda, a forma em que a amostra se encontrava para

análise, se em pó, em extrato ou como uma fração isolada, bem como outras variáveis como tempo e temperatura de extração são fatores-chave nos processos de extração, pois afetam tanto a cinética de liberação de fenólicos da matriz sólida, quanto à atividade antioxidante do extrato (Canterle, 2005).

Este trabalho tem como finalidade, demonstrar uma rota eficiente de extração de compostos das folhas de erva-mate *in natura*, empregando meios orgânicos e aquosos para aplicação na produção do biodiesel.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas, em uma propriedade rural da cidade de Inácio Martins – PR ($25,44787^{\circ}$ S, $51,12950^{\circ}$ O), onde se produz a erva-mate nativa sombreada. A identificação de uma amostra da planta passou pela curadoria de um especialista botânico e foi registrada a exsicata, de número 3101 e depositada no herbário Araucária da Universidade Estadual do Centro Oeste, Campus Cedeteg, Guarapuava PR. Sendo uma pesquisa que envolve patrimônio genético, esta foi incluída no cadastro Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), número: A91E974.

Foram coletadas somente as folhas da planta. As folhas *in natura* (sem nenhum processamento), eram utilizadas para produção de extrato. A extração foi sempre realizada, no mesmo dia da colheita das folhas, para evitar a oxidação das mesmas. Na erva-mate podem ser encontradas enzimas oxidativas, estas enzimas estão associadas ao escurecimento das folhas, pois promovem a oxidação de compostos fenólicos (Ceni *et al.*, 2009) e estes são importantes compostos com funções antioxidantes.

2.2 PREPARAÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE

As folhas verdes (*in natura*) foram trituradas em um liquidificador, com o solvente do respectivo meio em estudo, sendo o extrato ácido a solução clorídrica $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, extrato neutro o metanol anidro PA (nominado neutro devido pH próximo de 7,00) e extrato básico a solução contendo 1,5 g de hidróxido de potássio em 30 mL de metanol.

O ácido clorídrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizado na etapa de purificação do biodiesel. Desta forma, o ácido enriquecido com os compostos da folha, foi utilizado para lavagem do biodiesel e incorporação de antioxidantes no biocombustível, e o metanol é o álcool mais comumente utilizado na reação de transesterificação, juntamente com o hidróxido de potássio como catalisador (transesterificação básica).

Uma amostra de 50 g de folhas previamente selecionadas foi triturada com 200 mL de solvente, para preparação de cada um dos extratos, que foi deixado por 24 h em banho ultra termostático na temperatura de 50°C . Na sequência a amostra é filtrada para separação da parte sólida, e a solução livre de partículas sólidas foi inserida na síntese do biodiesel.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA CG-EM

Na identificação dos componentes da mistura, para os extratos ácido e neutro, foi realizada a análise por cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas acoplada (CG-EM).

Um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP2020) na central de análises da Universidade de São Paulo (USP) foi utilizado com a fonte de ionização de elétrons (1.18 kV) equipado com coluna capilar DBWAX com 30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura do filme. As condições de análise foram: injetor = 230 °C, detector = 260 °C, programação = 60 a 260 °C com razão de 10 °C min⁻¹, Split 1:5, pressão do gás hélio foi de 16,2 psi e fluxo total de 13,8 mL min⁻¹ e a injeção foi feita manualmente (1 µL). No detector de massas a temperatura da câmara de ionização foi de 230 °C, foi utilizado o sistema de detecção EM (Espectroscopia de Massa) no modo “scan” operando na faixa de razão massa (m)/carga (z) de 35 -350 (*m/z*).

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após os ensaios cromatográficos preliminares, decidiu-se pelo extrato ácido, para realização do planejamento experimental, pois obteve-se uma melhor solubilização de compostos da folha neste meio. Este delineamento experimental teve como objetivo determinar a melhor condição de preparo de um extrato rico em antioxidantes. Utilizou-se o *Software Statistica®* 13.3 licença nº. JKZ801I299309HUB-8, para determinar o potencial antioxidante do sistema quanto as variáveis: (I) temperatura (II), quantidade em gramas de folhas utilizadas e (III) tempo de contato com o ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹. Aplicou-se a análise de variância (ANOVA) para comparar estas três variáveis, ou características do sistema de extração, que influenciam diretamente o potencial antioxidante, utilizado como resposta na análise estatística. Os ensaios foram feitos em triplicata (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis utilizadas no delineamento experimental realizado

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração (g L ⁻¹)	Tempo (h)
1	37,5	35	8
2	25	50	8
3	25	35	16
4	50	35	16
5	50	20	8
6	37,5	35	16
7	50	50	8
8	37,5	35	24
9	25	20	24
10	37,5	50	16
11	37,5	20	16
12	25	50	24
13	25	20	8
14	37,5	35	16
15	50	20	24
16	50	50	24

2.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Todas as soluções descritas na Tabela 1 foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante pelo método do DPPH, o qual consiste na determinação da atividade antioxidante total, pela reação de redução do radical livre difenil-picril-hidrazina (DPPH), que apresenta coloração violeta, formando o composto DPPH de coloração amarela. A captura do DPPH resulta na diminuição da absorbância (A) no comprimento de onda de 515 nm.

Para o desenvolvimento do método, inicialmente a solução etanólica de DPPH 0,1 mmol L⁻¹ foi preparada e posteriormente diluída em etanol por um fator de 10. As determinações foram realizadas com adição de 2,7 mL de DPPH em 0,3 mL do solvente utilizado no extrato para o controle ($A_{controle}$). A absorbância da amostra é obtida, após 30 minutos de reação da mistura: 0,3 mL de amostra de extrato que recebeu 2,7 mL de DPPH ($A_{amostra}$). Como branco das amostras, foram misturados extrato e etanol. Após foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV/VIS, no comprimento de onda de 515 nm.

Todos os ensaios realizados, em triplicata. A percentagem de captura do radical livre DPPH que corresponde a atividade antioxidante (AA_{DPPH}) será calculada com base na Equação 1.

$$\%AA = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

Onde $A_{controle}$ corresponde à absorbância da solução controle de DPPH e $A_{amostra}$ a absorbância do DPPH com a respectiva amostra.

2.6 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TPC)

Foi realizada a quantificação de compostos fenólicos para os três extratos estudados. A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau usando ácido gálico como padrão. A coloração do reativo de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) muda de amarelo para azul na presença de compostos fenólicos e há boa correlação entre a intensidade da cor com a quantidade de fenóis na amostra.

Neste procedimento, uma alíquota de 0,50 mL de cada extrato foi diluída com 2,50 mL de reagente de Folin-Ciocalteu: água 1:10 (v/v) e 2,00 mL de solução de carbonato de sódio 4 % (m/v). Essa mistura permaneceu em repouso por 1 h em temperatura ambiente e a absorbância foi determinada a 785 nm. Para quantificar o teor de fenólicos dos extratos, uma curva de calibração foi construída seguindo o mesmo procedimento, mas substituindo os extratos por diferentes concentrações de ácido gálico: 10, 25, 40, 70, 85 e 100 mg g⁻¹ de ácido gálico. Os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama da amostra (mg EAG g⁻¹). A metodologia empregada foi conforme descrita por Singleton *et al.* (1999).

2.7 MICROANÁLISE QUÍMICA POR MEV/EDS

A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) integrada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi utilizada para identificar os elementos químicos presentes na amostra. A amostra para esta análise foi preparada pela secagem das folhas em estufa, a 105 °C até massa constante. Foi utilizado um equipamento MEV Tescan® modelo veja 3 com detector SE e filamento de tungstênio a 20 keV e WD de 5, 10 e 15 mm.

2.8 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIODIESEL

Para obtenção do biodiesel foi utilizada a reação de transesterificação por rota básica. Neste processo, o óleo de soja comercial foi aquecido a uma temperatura próxima a 80 °C, sob agitação magnética. Em outro recipiente, dissolveu-se hidróxido de potássio (1,5% da quantidade de óleo, ou seja, 1,5 g de catalisador para 100 mL de óleo) em metanol anidro (30 % da quantidade de óleo utilizada), elevando a temperatura do sistema de álcool anidro com catalisador para a 40 °C. Após, transferiu-se a mistura de uma vez só para o sistema de óleo aquecido, mantendo-se uma temperatura de 65 °C, sob agitação magnética por 1 hora (Viomar, 2013). Terminada a reação de transesterificação, os produtos obtidos foram transferidos para um funil de decantação. Deixou-se em repouso por 24 h para separação da mistura de biodiesel e glicerol.

O biodiesel deve passar pelo processo de purificação para remover resíduos de glicerina e álcool, assim como neutralizar o catalisador com uma solução ácida e remover a umidade. Desta forma as etapas de purificação consistiram da adição sobre o biodiesel bruto, primeiramente de uma solução de ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹ para neutralização do pH, após decantação remove-se e segue então a adição da solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), após decantação removeu-a. A última etapa foi a adição da água destilada e após sua remoção fez-se a secagem do biodiesel pela adição de sulfato de magnésio, o qual ficou em agitação por 1 hora e após filtração conclui-se a purificação.

A entrada do extrato na síntese se deu de duas formas: do extrato neutro utilizou-se o metanol enriquecido com o extrato. Quando do extrato ácido, foi utilizado na primeira etapa de purificação com ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹.

2.9 ENSAIO DE ESTABILIDADE OXIDATIVA

O biodiesel obtido enriquecido com extrato de erva-mate foi avaliado quanto à estabilidade oxidativa, também uma amostra sem antioxidante, foi avaliada para o se obter o tempo de indução referência do biodiesel puro.

O método Rancimat, é a análise mais adotada com relação ao estudo de estabilidade oxidativa do biodiesel, de acordo com a ANP, o biodiesel deve ser testado a uma temperatura de 110 °C e obter um período mínimo de 13 horas (ANP, 2023). Neste ensaio, a amostra de biodiesel é mantida em um tubo vedado sob aquecimento constante de 110 °C a um fluxo de ar de 10 L h⁻¹, com o processo de oxidação do biodiesel, são gerados cada vez mais ácidos voláteis, que por sua vez, são direcionados a um compartimento do

aparelho contendo água destilada e, através de um eletrodo, a condutividade elétrica é medida. A partir do momento em que ocorre o aumento intenso na condutividade elétrica, acontece um ponto de inflexão na curva, o tempo para chegar até esse ponto é chamado de período de indução (Pelegrini, 2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Para caracterizar a composição química dos extratos de erva-mate foi realizada a CG-EM. A Tabela 2 apresenta a relação de moléculas identificadas.

Tabela 2. Nome e relação área/massa dos principais compostos químicos encontrados na CG-EM do extrato ácido

Pico	t _{retenção} (min)	Relação (m/z)	Composto químico	Fórmula molecular
1	6,772	6,53	Levoglucosenona	C ₆ H ₆ O ₃
2	8,883	22,76	5-Hidroximetilfurfural	C ₅ H ₆ O ₂
3	14,220	10,65	β-D-Glicopiranose,	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
4	16,793	6,65	Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
5	17,321	18,91	Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
6	17,700	6,88	Biciclo [2.2.1] heptano-2-ol	C ₇ H ₁₂ O
7	18,082	20,79	Ácido Eicosanóico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
8	18,333	15,93	Brasilato de Etileno	C ₁₅ H ₂₆ O ₄
9	19,026	7,88	1-Octadecanol	C ₁₈ H ₃₈ O
10	20,140	11,12	Acetato de Z-10-Tetradeceno 1-ol	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
11	23,827	8,30	2-Methyltetracosano	C ₂₅ H ₅₂
12	24,393	4,02	Ftalato de Bis(2-etyl-hexil)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
13	28,107	8,37	Octacosano	C ₂₈ H ₅₈
14	28,526	7,59	Permetrina	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃
15	29,250	5,37	Ácido 1,3 Benzenodicarboxílico	C ₂₄ H ₃₈ O ₄

A cafeína (1,3,7- trimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina), são substâncias pertencentes a classe dos alcaloides purínicos que se encontram em diversas espécies vegetais, chamadas de metilxantinas. Esses compostos possuem propriedades estimulantes, antioxidantes, anti-inflamatória além de serem utilizados pela indústria de cosméticos (Bracesco *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015).

A cafeína e teobromina estão em maiores concentrações nas folhas e em menores nos ramos. A teofilina é encontrada em pequenas proporções somente nas folhas. A concentração de xantinas nas folhas da erva-mate está associada a fatores genéticos e ambientais, sendo influenciadas pela época de colheita e processo de secagem (Pereira, 2021). As concentrações de cafeína em área cultivadas com elevada luminosidade tendem a ser menores, do que em áreas cultivadas sombreadas e que também provoca mudanças morfológicas nas plantas (Pereira, 2021). É importante ressaltar que a cafeína vem sendo indicada como um composto potencialmente antioxidante (Lima *et al.*, 2010).

Os polifenóis constituem de 20% a 30% da composição da erva-mate, são solúveis em água, incolores e conferem o sabor adstringente ao mate (Barboza, 2006). Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico no grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes. De acordo com a tabela 2 os compostos: β -D-glicopiranose (flavonoide glicosilado), ftalato de Bis(2-etil-hexil) derivado do ácido ftálico, a permetrina, e o composto ácido 1,3-benzenodicarboxílico, que possuem grupamento carboxílico importante, são compostos fenólicos que constituem 15,49% da composição química da amostra.

Foi possível também a identificação das moléculas de metilxantinas no extrato neutro, quando se utilizou o metanol como solvente, porém obteve-se uma menor solubilização dos compostos da folha no meio orgânico, pois se identificou uma quantidade menor de substâncias neste meio, em comparação ao meio ácido. Segundo a literatura Mussatto *et al.* (2011) o metanol é considerado um bom solvente para extração de polifenóis, mas com a metodologia utilizada, não foi esse o resultado encontrado. Devido à formação de precipitado na amostra do extrato básico a análise de cromatografia para esta amostra não foi realizada.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para todas as condições da Tabela 1 das três variáveis estudadas, o valor da atividade antioxidante obtida no extrato foi elevado, acima de 86%. Observou-se que quando o tempo é de 24 horas, não é interessante temperaturas elevadas de 50 °C, pois se tem uma redução da atividade antioxidante. Isso indica uma degradação da folha, e perda dos compostos antioxidantes. Quando diminui a temperatura, mesmo durante 24 horas, aumenta-se a atividade antioxidante. Esses dados serão mais bem discutidos após a aplicação da análise estatística, que será apresentada a seguir.

A avaliação estatística dos dados da Tabela 1, quanto à região de combinação binária entre concentração e tempo pode ser observada por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 1.

Na temperatura de 50 °C tem-se um melhor resultado de atividade antioxidante, quando o tempo e a concentração diminuem para 8 h e 20 g L⁻¹, respectivamente. Porém quando diminui a temperatura para 20 °C (Figura 1B) o tempo deve ser maior que 8 horas, para ter uma atividade antioxidante maior que 94%, ou seja, em temperaturas menores deve-se deixar mais tempo o substrato em contato com o ácido para se obter maior extração do antioxidante.

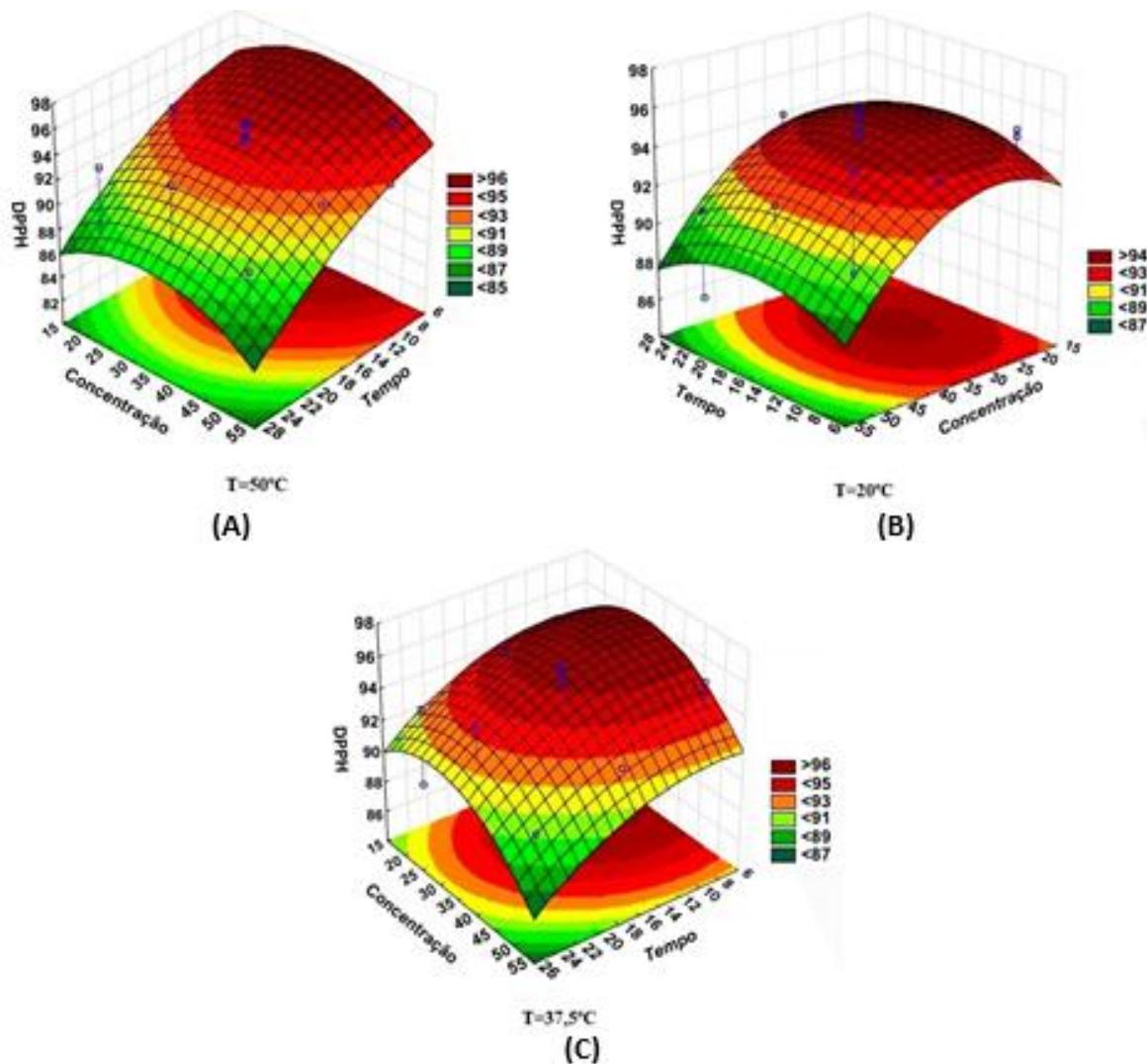


Figura 1. Superfície de resposta para erva-mate in natura (concentração em g L^{-1}) e DPPH (AA%) em diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$)

Na Tabela 3 são apresentadas as informações referentes à ANOVA da superfície de resposta, para o modelo quadrático empregado para o planejamento experimental.

A ANOVA permitiu avaliar os efeitos da concentração, temperatura e tempo sobre a variável resposta em termos de atividade antioxidante da amostra. Para concentração e tempo os valores de *p* foram significativos para o modelo linear. Para a temperatura o valor de *p* foi significativo para o quadrático.

Tabela 3. ANOVA para o tratamento estatístico dos resultados referentes ao planejamento para obtenção da atividade oxidativa das amostras

Fator	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F	p
Regressão (R)	107,29	9	11,921		
Temperatura (linear)	0,2736	1	0,2736	0,6389	0,5079
Temperatura (quadrática)	1,2570	1	1,2570	2,9356	0,2287
Concentração (linear)	11,1387	1	11,1387	26,0140	0,0363
Concentração (quadrática)	7,2629	1	7,2629	16,9622	0,0542
Tempo (linear)	33,2968	1	33,2968	77,7622	0,0126
Tempo (quadrático)	3,0391	1	3,0391	7,0978	0,1167
Interação temperatura*concentração	4,0317	1	4,0317	9,4158	0,0918
Interação temperatura*tempo	25,4391	1	25,4391	59,4122	0,0164
Interação concentração*tempo	0,0561	1	0,0561	0,1311	0,7519
Resíduo (r)	22,729	7	3,247		
Falta de ajuste (faj)	21,8735	5	4,3747	10,2169	0,0915
Erro puro (ep)	0,8564	2	0,4282		
Soma Quadrática Total (SQ _T)	130,0232	16			

O modelo quadrático, contendo as variáveis independentes codificadas, está representado pela Equação 2, contendo os termos lineares, quadráticos e de interação. Sendo T - temperatura, C - concentração e t - tempo.

$$DPPH = 95,27 - 0,3308 T - 1,369 T^2 - 2,1108 C - 3,292 C^2 - 3,6494 t - 2,130 t^2 + 1,419 TC - 3,566 Tt - 0,167 Ct \quad (2)$$

Conforme já avaliado nos gráficos de superfície de resposta, a Equação 2 também deixa evidente a forte interação entre a temperatura e o tempo de imersão.

Segundo o delineamento experimental, foi possível avaliar a melhor condição das variáveis estudadas, a fim maximizar a resposta da atividade antioxidante obtida em termos de %AA, e apresentar o resultado de cada variável envolvida no processo, em que se observa o nível ótimo para cada uma. Também se obteve a configuração de cada fator para a melhor

resposta, onde a temperatura foi de 47,22 °C, a concentração de 33,33 g L⁻¹ e o tempo de 11,55 horas, que de acordo com o modelo tem-se o maior valor de AA de 96,21%.

Uma amostra nestas condições de concentração, temperatura e tempo, para extração do antioxidante em meio ácido foi produzida, para determinar a atividade antioxidante e comprovar o resultado do delineamento experimental. Este resultado foi de 89,39 ± 0,18%, um pouco inferior ao previsto de 96,21%. Esta diferença já era esperada por se tratar de um extrato natural (folhas *in natura* de erva-mate), por mais que sejam da mesma árvore, não apresentam composição exatamente igual, pois está diretamente ligada a fatores genéticos e ambientais. Contudo, através destas condições experimentais utilizadas para extração foi possível obter, um fator antioxidante elevado e a aplicação do procedimento estatístico possibilitou maior confiabilidade pela resposta significativa obtida e principalmente mostra a dependência entre as variáveis e sua influência na resposta.

3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante obtida pelo método do DPPH para os diferentes extratos obtidos, expresso em termos de atividade antioxidante (Equação 1), para a condição de extração utilizada, sendo temperatura de 47,22 °C, concentração de 33,33 g L⁻¹ e o tempo de 11,55 horas foi de 96,21% para o extrato ácido, 86,73% para o extrato neutro e 9,45% para o extrato neutro.

A atividade antioxidante dos sistemas com extrato ácido e neutro apresentaram valores elevados, já no extrato básico obteve-se um valor bem abaixo dos demais. Os extratos de erva-mate produzidos em trabalhos anteriores (Wolff *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020; Bassani *et al.*, 2014), que estudaram extratos hidroalcólicos e aquosos em temperatura ambiente e 80 °C obtiveram percentual de AA pelo mesmo método DPPH entre 40 e 80%. Todos se referem ao uso de folhas que já passaram por processo de secagem ou torra. Portanto quando se compara com esses dados da literatura é possível afirmar que na utilização da folha *in natura* tem-se um ganho na extração de compostos antioxidantes.

Deve-se considerar que a composição química da folha da erva-mate também pode ser influenciada por diversos fatores, dentre estes está a forma de cultivo, se a planta é cultivada a pleno sol ou de forma sombreada, interferindo na produção de compostos fenólicos assim como, na AA. As plantas sombreadas apresentam maiores teores de cafeína, ácido clorogênico e ácido gálico em comparação aos plantios comerciais ao sol (Pereira, 2021).

3.4 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT) E ESTABILIDADE OXIDATIVA

Os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes e estão presentes na erva-mate, desta forma o teor de fenólicos totais, se torna um parâmetro importante na caracterização dos extratos. O TFT dos extratos de erva-mate determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, expresso em mg EGA g⁻¹ de cada extrato, e os ensaios referentes à estabilidade a oxidação, para as amostras de biodiesel, obtidas nas três condições são apresentadas na Figura 2.

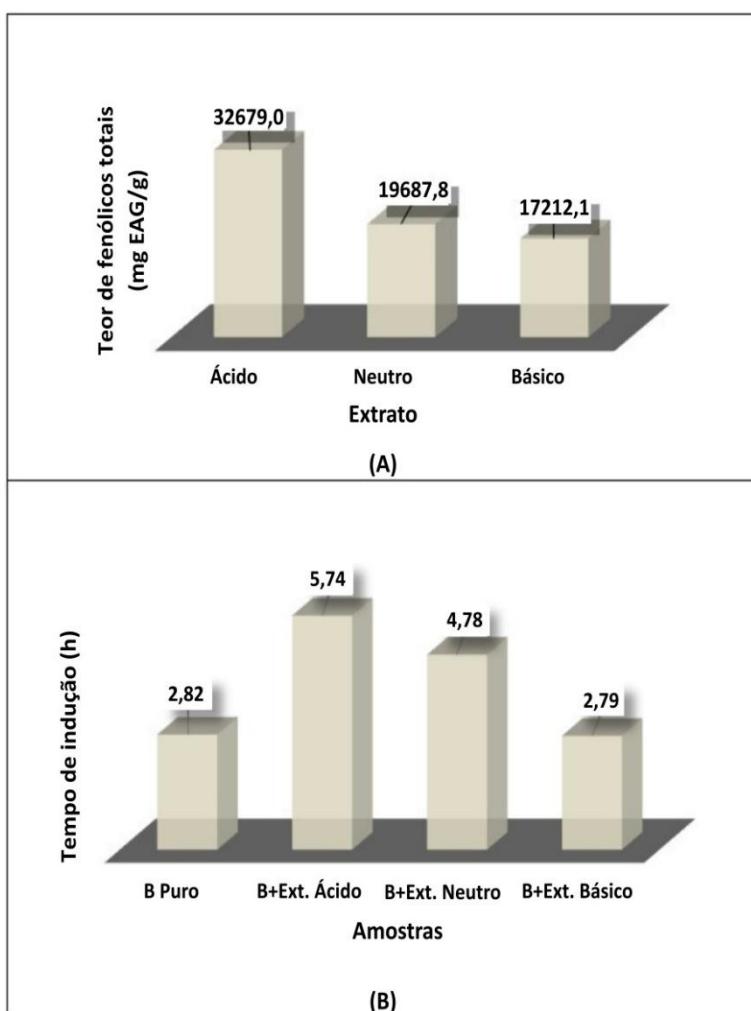


Figura 2. Em (A) Teor de fenólicos totais dos extratos em (mg EAG g⁻¹) e (B) tempo de indução das amostras de biodiesels

Nota: B = biodiesel, Ext. = extrato, B+Ext. = biodiesel mais extrato.

Os teores de fenólicos totais e tempo de indução confirmam os resultados da atividade antioxidante. Ressalta-se que esta atividade antioxidante se trata do extrato *in natura*, inicial, sem considerar a aceleração da oxidação. Na Figura 2B o tempo de indução refere-se aos ensaios de aceleração da oxidação onde o extrato ácido aumentou o tempo de indução em quase 100% enquanto o do extrato orgânico em a.c 70%, coincidente com os resultados dos teores fenólicos que no caso do extrato *in natura* de erva-mate são os principais responsáveis pela atividade antioxidantes. Os compostos fenólicos são antioxidantes de origem natural capazes de retardar processos oxidativos, isso indica que o extrato ácido é uma fonte promissora para extração destas moléculas da folha *in natura* da erva-mate.

O período de indução do biodiesel de soja de 2,82 horas mostra a baixa estabilidade oxidativa, explicada pela presença de ácidos graxos poli-insaturados na composição do óleo. Há uma incorporação do extrato de erva-mate ao biocombustível, principalmente quando foram utilizados os extratos ácido e neutro, na síntese do biodiesel. Mas estes extratos obtidos na condição de temperatura de 47,22 °C, concentração de 33,33 g L⁻¹ e o tempo de 11,55 horas ainda não permitiram, que o valor do tempo de indução do biodiesel atingisse o exigido pela Resolução ANP n° 920/2023 (ANP, 2023).

A amostra de biodiesel obtida quando utilizado o extrato ácido de erva-mate, foi aditivada com diferentes concentrações de terc-butil-hidroquinona (TBHQ), para avaliar o efeito sinérgico entre os compostos (Figura 3).

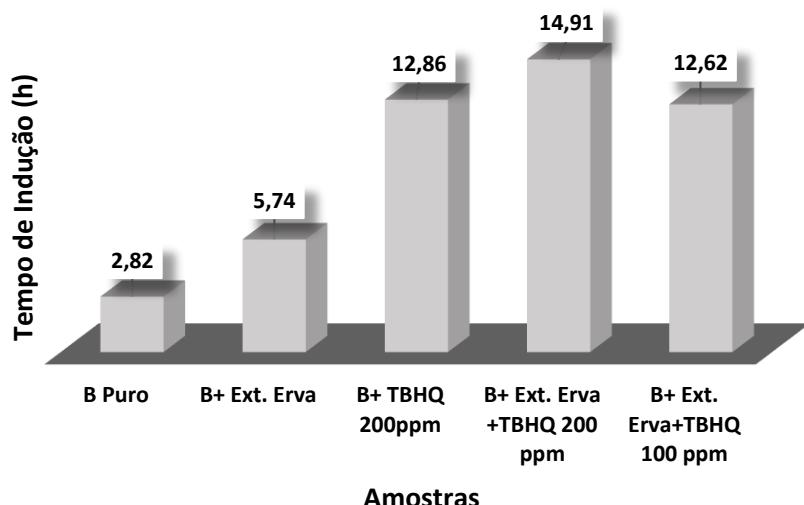


Figura 3. Tempo de indução das amostras estudadas

Nota: B = biodiesel, Ext. = extrato, B+Ext. = biodiesel mais extrato.

Utilizando a concentração de 200 ppm do antioxidante sintético e o extrato ácido de erva como antioxidante natural, foi possível observar um ganho de cerca de 15% no período de indução, indicando um efeito sinergico antioxidante, ou seja uma combinação positiva entre a mistura do extrato natural e o antioxidadente sintético. Este novo valor de tempo de indução obtido é superior ao exigido pela Resolução ANP n° 920/2023 (ANP, 2023), que é de um período de 13 h a temperatura de 110 °C.

A incorporação de antioxidantes naturais no biodiesel pode trazer ganhos ambientais, econômicos e tecnológicos importantes, ajudando a melhorar a estabilidade do combustível e a reduzir impactos ao longo da cadeia de valor. Um impacto positivo também é possível na valorização da erva-mate como fonte de antioxidantes naturais, não somente para aplicação no biodiesel, mas em muitos sistemas em que se utiliza essas moléculas bioativas.

3.5 ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS) DA AMOSTRA

A análise semiquantitativa obtida pela técnica de EDS, que permitiu identificar os elementos químicos presentes na amostra de folhas secas é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Espectroscopia de energia dispersiva do pó das folhas secas

Elemento	C	O	Mg	Al	Si	Cl	K	Ca	Mn	Cu
% (m/m)	63,29	28,84	0,51	0,21	0,51	0,35	4,91	0,63	0,53	0,21

A Tabela 4 corresponde aos valores de porcentagem atômica obtidos em espectroscopia de energia de elétrons. Foram obtidas altas concentrações de carbono e oxigênio, como era de se esperar para componentes de folhas vegetais. Os macronutrientes K, Ca, Mg, estão presentes, sendo maior o teor de potássio, coerente com outras literaturas, que demonstram que na folha de erva-mate a concentração destes elementos se encontram na seguinte ordem K > Ca > Mg (Oliva *et al.*, 2014; Heinrichs *et al.*, 2001). Também os micronutrientes Cu, Mn e Si estão presentes na folha. A concentração destes elementos está relacionada às condições de fertilidade do solo, do ambiente, dentre outros fatores.

A presença do alumínio (Al) pode ser destacada, pois a erva-mate é uma espécie que ocorre naturalmente em solos de elevados teores de Al, um elemento, que normalmente é tóxico para a maioria das espécies, e prejudicial ao seu crescimento. No entanto, há espécies que melhoram seu crescimento na sua presença, um indício de tolerância, pois os compostos fenólicos também presentes na matriz vegetal, minimizam o efeito tóxico do alumínio. Maiores concentrações de compostos fenólicos foram encontradas em algumas espécies tolerantes ao Al e esta classe de compostos secundários tem sido descrita como responsáveis pela alta atividade antioxidante atribuída à espécie (Tatsch *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2014).

4 CONCLUSÃO

A análise da composição química das folhas nativas de erva-mate *Ilex paraguariensis St Hil in natura*, revelou um elevado percentual de cafeína e teobromina, característico de plantas cultivadas em regiões sombreadas. Os compostos fenólicos corresponderam a 15,49% da composição da amostra do extrato ácido, metabólicos responsáveis pelas propriedades antioxidantes da erva-mate.

A utilização dos extratos de folhas *in natura*, de erva-mate promoveram ação antioxidantes do biodiesel, sendo que os extratos ácidos e neutros foram os mais eficientes, apresentando atividade antioxidante da ordem de 96%. O maior teor de fenólicos totais foi obtido para o extrato ácido, promovendo um aumento de cerca de 100% do período de indução das amostras do biodiesel nos ensaios de oxidação acelerada.

Os ensaios que foram realizados da mistura dos antioxidantes, sintético de terc-butil-hidroquinona e o extrato ácido das folhas nativas de erva-mate *Ilex Paraguariensis St Hil in natura*, resultaram em um efeito sinérgico na atividade antioxidante do biodiesel da ordem de 15%, tendo um tempo de indução do biodiesel de 14,95 h, valor superior ao exigido pela Resolução da ANP n° 920/2023.

A condição que proporcionou a melhor extração dos compostos antioxidantes, dentre os métodos de extração utilizados, foi a concentração de 33,33 g L⁻¹ de folhas de erva-mate *in natura* em meio ácido por um período de 11,55 h e temperatura de 47,22 °C.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecimentos pelo fomento à pesquisa ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária (PR), à FINEP (Agência Financiadora de Estudos e Projetos) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Resolução nº 920, de 4 de abril de 2023**. Brasília, DF: ANP, [2023]. Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-920-2023-estabelece-a-especificacao-do-biodiesel-e-as-obrigacoes-quanto-ao-controle-da-qualidade-a-serem-atendidas-pelos-agentes-economicos-que-comercializem-o-produto-em-territorio-nacional?origin=instituicao>. Acesso em: 14 set. 2025.

BARBOZA, L. M. V. **Desenvolvimento de bebida à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis Saint Hilaire*) adicionada de fibra alimentar**. 2006. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BASSANI, D. C.; NUNES, D. S.; GRANATO, D. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis A. St.-Hil., Aquifoliaceae*) using response surface methodology. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 923–935, 2014.

BOSCHEN, N. L. **Estudo do sinergismo de antioxidantes naturais para biodiesel**. 2020. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2020.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.

Braga, E.; Damasceno, L.; Silva, C. b. s.; Silva, L.; Cavalcante, M.; Barreto, C.; Silva, S.; Murilo Tavares de Luna, F.; Bertini, L.; Nascimento, T.; RIOS, M. ¹H NMR and UV-Vis as Analytical Techniques to Evaluate Biodiesel Conversion and Oxidative Stability. **Fuels**, v. 5, n. 1, p. 107–122, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/fuels5010007>.

CAMPOS, B. K.; PRAZERES, J. P.; TORRES, Y. R.; ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. Avaliação da labilidade de alumínio em infusões de erva-mate empregando voltametria adsorptiva de redissolução catódica. **Química Nova**, v. 37, p. 1479–1485, 2014.

CANTERLE, L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

CENI, G. C.; BALDISSERA, E. M.; DOS SANTOS PRIMO, M.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C.; DE OLIVEIRA, J. V. Influence of application of microwave energy on quality parameters of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis St. Hil.*). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 221–226, 2009.

Cheminet, G.; Baroni, M.V.; Wunderlin, D. A.; Naranjo, R. D. P. Antioxidant properties and phenolic composition of “Composed Yerba Mate”. **Association of Food Scientists & Technologists**, 2021.

CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CANO-GONZÁLEZ, C. N.; ASCACIO-VALDES, J.; Aguirre-Joya, J. A.; Aguillón-Gutierrez, D.; Breccia, J.; Espinoza-Perez, J. D.; Aguilar, C. N.; Torres-León, C. Polyphenolic-rich extracts from the leaves of *Ilex paraguariensis* and *Larrea divaricata* and their antioxidant and anti-COVID-19 potential. **Biotecnia**, v. 25, p. 61–69, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1762>.

DUARTE, M. M.; TOMASI, J. C.; HELM, C. V.; Amano, E.; Lazzarotto, M.; Godoy, R. C. B.; Nogueira, A. C.; Wendling, I. Caffeinated and decaffeinated mate tea: Effect of toasting on bioactive compounds and consumer acceptance. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias – Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 15, p. 1–11, 2020.

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis St. Hil.*). **Ciência Rural**, v. 31, p. 781–786, 2001.
Lima, A. R.; Pereira, R. G. F. A.; Abrahão S. A.; Stella Maris da Silveira Duarte S. M. S.; PAULA, F. B. A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, v. 33, p. 20–26, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100004>.

MACHADO, A. A. R.; PEIXOTO, N. C.; HAUTRIVE, T. P.; UCZAY, J.; BEZERRA, A. S. Efeito antioxidante da *Ilex paraguariensis* e condimentos na oxidação lipídica de filés de *Oreochromis niloticus*. **Revista Contexto & Saúde**, v. 20, p. 35–45, 2020.

MASETTO, E.; LAZAROTO, A.; OLEINIK, G.; LIMA, F.; GALLINA, A.; SOARES, L. Salicilatos como inibidores do processo oxidativo mediado por cobre e ferro no biodiesel B100. **Química Nova**, v. 45, p. 1053–1059, 2022.

MOLINARES, M. A.; BOSCH, N. L.; PELEGRIINI, D. Y.; GONGO, C. N.; MAIA, G. A. R.; GALLINA, A. L.; TRACTZ, G. T.; RODRIGUES, P. R. P. The influence of *Annona muricata* L. peel extract as a potent source of natural antioxidant on soybean oxidation stability. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, p. 69709–69724, 2022.

Mussatto S. I.; Ballesteros, L. F.; Martins, S.; Teixeira, J. S. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, v. 83, n. 1, p. 173–179, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>.

OLIVA, E. V.; REISSMANN, C. B.; GAIAD, S.; DE OLIVEIRA, E. B.; STURION, J. A. Composição nutricional de procedências e progêneres de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em Latossolo Vermelho Distrófico. **Ciência Florestal**, v. 24, p. 793–803, 2014.

PELEGRINI, Y. D. **Estudo do efeito antioxidante de resíduo agroindustrial para biodiesel de canola.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2021.

PEREIRA, R. G. **Características morfológicas e teores de cafeína e teobromina entre ervais nativos sombreados e a pleno sol.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2021.

Perín, S. L.; Chendynski, L. T.; Gomes, S. I. A. A.; Giusti, E. D. Antioxidant potential of the sap of the Croton lechleri Müll. Arg. stem (Euphorbiaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 12, n. 1, p. 01–14, 14 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v12n1.17403>.

SANTOS, E. C. S.; BICCA, M. A.; BLUM-SILVA, C. H.; COSTA, A. P. R.; DOS SANTOS, A. A.; SCHENKEL, E. P.; FARINA, M.; REGINATTO, F. H.; DE LIMA, T. C. M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13–25, 2015.

SILVA, N. M.; Campos, T. A. F.; Marins, A. R.; Gomes, E. S.; Matucci, M. A.; Souza, M. L. R.; Beneti, S. C.; Heck, S. C.; Feihrmann, A. C. Avaliação de diferentes solventes combinados a técnica de alta pressão para extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, 2022a. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29163>.

Silva, G. R.; Ribeiro, A. J. S.; Coutinho, J. M. S.; Santos, É. L.; Haragushiku, V. S. Comparação do potencial antioxidante de extratos de Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet & H. Perrier e Kalanchoe laetivirens aplicados em biodiesel. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 3, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n3-100>.

SILVA, R. B.; Araújo, J. L.; Passos, I. n. g.; Lima, j. r. o.; Souza, J. S. N.; Caldas, N. M.; Figueiredo, F. C.; Santos Junior, J. R. Cashel Nut Shell Liquid (CNSL)-based antioxidant synthesis through electrolysis of hydroquinone. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022c. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28636>.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: PACKER, L. (ed.). **Methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, v. 299, p. 152–178, 1999.

TATSCH, F. R. P.; GONÇALVES, V.; MEURER, E. J. Alumínio total e solúvel em amostras de erva-mate comercializadas no Rio Grande do Sul. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 2, p. 83–89, 2010.

VIOMAR, A. **Estudo das variáveis da produção de biodiesel**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

WOLFF, S. M.; SILVEIRA, A. C.; LAZZAROTTO, M. Metodologia para extração de fenólicos totais e antioxidantes da erva-mate. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 21, n. 2, p. 45–50, 2019.