

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

PRICILA POL DA SILVA

**TECNOLOGIAS VERDES NA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE HIBISCO (*Hibiscus
sabdariffa* L.): PARÂMETROS DE PROCESSO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.**

MEDIANEIRA-PR

2020

PRICILA POL DA SILVA

**TECNOLOGIAS VERDES NA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE HIBISCO (*Hibiscus
sabdarriffa* L.): PARÂMETROS DE PROCESSO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR - Câmpus Medianeira, como um dos requisitos obrigatórios para a obtenção do grau de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Profa. Ms. Natara Tosoni

Co-orientador: Prof. Dra. Katia Suzana Andrade

MEDIANEIRA-PR

2020



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Coordenação do Curso Superior de Tecnologia
em Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

Título do trabalho:

**TECNOLOGIAS VERDES NA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE HIBISCO (*Hibiscus
sabdariffa* L.): PARÂMETROS DE PROCESSO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.**

Aluna:

PRICILA POL DA SILVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado às 21 horas do dia 25 de novembro de 2020, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Msc. Natara Tosoni
UTFPR - Câmpus Medianeira
(Orientadora)

Prof. Dra. Katia Suzana Andrade
UTFPR - Câmpus Medianeira
(Coorientador)

Profa. Dra. Rosana A. da Silva Buzanello
UTFPR - Câmpus Medianeira
(Convidada)

Profa. Dra. Gláucia Cristina Moreira
UTFPR - Câmpus Medianeira
(Convidada)

Prof. Me. Fábio Avelino Bublitz Ferreira
UTFPR - Câmpus Medianeira
(Responsável pelas atividades de TCC)

O termo de aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, por estar sempre direcionando meus caminhos e dando força e coragem para concluir este trabalho.

A minha família e aos meus amigos, por compreender e apoiar nos momentos de ausência.

As Professoras Ms. Natara Tosoni e Dra. Kátia Suzana Andrade, que acolheram o projeto com carinho, auxiliaram com suas ideias e por dispuseram do seu tempo, auxiliando no que foi necessário para as atividades relacionadas ao trabalho de conclusão.

Ao Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por todo o auxílio e tempo disposto para a realização dos ensaios de extração dos compostos.

O Professor Dr. Leandro Herculano da Silva, do Laboratório de Técnicas Fototérmicas e Espectroscopia Óptica por ter auxiliado e cedido o óleo de chia para a realização da análise do índice de capacidade oxidativa.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer.

RESUMO

A espécie *Hibiscus sabdarifa* L. é apreciada devido ao seu gosto peculiar e também por conta das suas propriedades antioxidantes. Atualmente, é utilizada como alimento humano, aromatizante, para artesanato e ornamentação. Aliado a grande quantidade de antocianinas presentes em sua composição, a sua utilização na indústria alimentícia vem sendo explorada. Este trabalho teve como objetivo obter extratos de hibisco com atividade antioxidante, por meio dos processos de extração em micro-ondas, ultrassom e com líquido pressurizado (PLE). Foi utilizada combinação de etanol e água como solvente. As respostas analisados foram os rendimentos, teor de fenólicos totais, atividade antioxidante, além do índice de atividade oxidativa dos extratos aplicados na maionese caseira com óleo de chia. Dentre as técnicas, a que apresentou melhor rendimento foi a extração por micro-ondas ($78,5\%^a \pm 2,5$ e $82,2\% \text{ }^a \pm 0,5$). A técnica por ultrassom foi a que se mostrou mais eficiente para a obtenção de extratos com alto teor de fenólicos totais e alta capacidade antioxidante, sendo assim a mais adequada para realizar a extração dos compostos.

Palavras-chave: Antocianinas. Antioxidantes. Extração por solventes.

ABSTRACT

The species *Hibiscus sabdarifa* L. is appreciated due to its peculiar taste and also because of its antioxidant properties. Currently, it is used as human food, flavoring, for crafts and ornamentation. Combined with the large amount of anthocyanins present in its composition, its use in the food industry has been explored. This work aimed to obtain hibiscus extracts with antioxidant activity, through the extraction processes in microwave, ultrasound and pressurized liquid (PLE). A combination of ethanol and water was used as the solvent. The responses analyzed were yields, total phenolic content, antioxidant activity, in addition to the oxidative activity index of extracts applied to homemade mayonnaise with chia oil. Among the techniques, the one with the best performance was microwave extraction ($78.5\%^a \pm 2.5$ and $82.2\% ^a \pm 0.5$). The ultrasound technique was the one that proved to be the most efficient for obtaining extracts with a high content of total phenolics and high antioxidant capacity, thus being the most suitable to perform the extraction of the compounds.

Keywords: Anthocyanins. Antioxidant. Solvent extraction.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FORMULAÇÕES DAS MAIONESES UTILIZADAS NO TESTE DE ESTABILIDADE OXIDATIVA.	27
TABELA 2. RESULTADOS DE RENDIMENTO DOS EXTRATOS OBTIDOS POR MEIO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE), ULTRASSOM (US) E MICRO-ONDAS (MAE).	29
TABELA 3. RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS, ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES POR DPPH E ABTS.	30

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PLANTA DO <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i> L.	13
FIGURA 2: EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO	22
FIGURA 3: EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	23
FIGURA 4: EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	24
FIGURA 5: ANÁLISE DE TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.	25
FIGURA 6: ANÁLISE DE DPPH.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 HIBISCO	13
3.2 TECNOLOGIAS VERDES	13
3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	15
3.4 ANTIOXIDANTES	18
3.5 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	19
3.6 ÍNDICES DE ESTABILIDADE OXIDATIVA	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	21
4.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)	21
4.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (US)	22
4.4 EXTRAÇÃO EM MICRO-ONDAS	23
4.5 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	24
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	25
4.7 PREPARO DA MAIONESE	26
4.8 ÍNDICE DE ATIVIDADE OXIDATIVA	27
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

INTRODUÇÃO

A preocupação da população em consumir alimentos naturais e com qualidade tem aumentado gradativamente, pois a maioria dos alimentos consumidos contém conservantes e antioxidantes sintéticos. Com isso a busca por produtos com apelo natural, faz com que a indústria alimentícia aumente sua produção voltada a alimentos frescos, com conservantes naturais e com garantia de qualidade, o que faz com que o mesmo fique mais atrativo para o consumidor (MACIEL et al., 2012).

O *Hibiscus sabdariffa* L., conhecido popularmente como hibisco, rosela, groselha ou azedinha, apresenta em sua composição polifenóis, flavonóides, antocianinas e também é rico em vitaminas. É caracterizado por uma coloração avermelhada e um sabor ácido adstringente, atraindo a atenção da indústria de alimentos (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016).

O consumo dos antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, inibe a formação dos radicais livres e é associado à menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016).

A ação antioxidante dos componentes ativos depende da estrutura química e da concentração dos seus constituintes na planta de origem, tendo em vista que são influenciados por fatores genéticos, adubação e condições ambientais, e também do grau de maturação e variedade da planta (RAMOS et al., 2011).

Com a necessidade de reduzir os resíduos gerados pelas indústrias, juntamente com o grande poder de fornecer compostos com alto valor, o estudo de tecnologias mais sustentáveis se faz necessário e quando introduzido esse conceito, deve-se considerar a eliminação ou redução do uso de substâncias químicas, minimizando a utilização de energia, manejo correto dos subprodutos e também a segurança do operador (GALUSZKA et al., 2013).

As técnicas verdes vêm explorando os processos de extração, sendo incluído também como conceito de extração verde, que é baseado na descoberta e desenho dos processos de extração que irá reduzir o consumo de energia, a utilização de solventes alternativos e renováveis provindos de produtos naturais, e assegurar que o extrato seja seguro e tenha qualidade (CHEMAT et al., 2012; ZUIN; PEREIRA, 2013; ZUIN, 2016).

Sabendo que a busca por alimentos com compostos naturais e com qualidade vem aumentando diariamente, e tendo conhecimento de que os compostos antioxidantes sintéticos tem o seu uso restrito em relação a aplicação e quantidade, busca-se com esse trabalho contribuir para caracterização dos compostos presentes no *Hibiscus sabdariffa* L., com intuito de implementar o seu uso como antioxidante natural.

1. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos com potencial antioxidante a partir de *Hibiscus sabdariffa* L., por meio das extrações em micro-ondas (MAE), ultrassom (US) e com líquido pressurizado (PLE) e caracterizá-los em relação ao potencial antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L., por meio dos processos de extração em micro-ondas, ultrassom e líquido pressurizado (PLE);
- Avaliar a influência dos parâmetros de processo, como pressão e temperatura, em termos de rendimento de extração, para os métodos empregados;
- Determinar a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos dos extratos obtidos a partir de *Hibiscus sabdariffa* L. e verificar a relação com o método de extração empregado.
- Aplicar o extrato em maionese com óleo de chia e avaliar o índice de oxidação lipídica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIBISCO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) é pertencente à classe das *Dicotyledonae*, família Malvaceae e gênero Hibiscus, sendo cultivado em regiões de clima tropical e subtropical (ISMAIL et al., 2008) e popularmente conhecido como, azedinha, groselha, rosella. Veio para o Brasil por meio dos africanos, através do tráfico de escravos (MACIEL et al., 2012).

O hibisco (Figura 1) é uma planta herbácea, de clima subtropical, que pode chegar a até 1,5m de altura, de caule arroxeadado, flores solitárias que duram um dia e produz frutos vermelhos conhecidos por cálices (SÁYAGO-AYERDI et al., 2007). Na sua composição são encontrados minerais, vitaminas, compostos fenólicos e antocianinas, que são responsáveis pela coloração vermelha do cálice. Estudos indicam que o consumo de *H. sabdariffa* L. trazem benefícios à saúde por conta do alto poder antioxidante associado a sua composição (LIN et al., 2007).

Figura 1- Planta do *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: BACKWATER BOTANICS (2014).

3.2 TECNOLOGIAS VERDES

Existe uma preocupação crescente quando se diz respeito ao desenvolvimento científico e a geração de resíduos. À medida que vem sendo

introduzidos processos, também são buscadas medidas que amenizem, reduzam ou até mesmo zerem a geração de subprodutos químicos (TSUKUI; REZENDE, 2014).

O desenvolvimento e o uso de solventes que tenham um baixo potencial de agressão ao meio ambiente é uma das linhas de tecnologias verdes que está sendo mais avançada nos últimos anos. A Química Verde (Quadro 1) teve início nos EUA pela *Environmental Protection Agency* (EPA)- Agência de Proteção Ambiental, em colaboração com a *American Chemical Society* (ACS) - Sociedade Americana de Química e o *Green Chemistry Institute*, que implementaram programas que visavam a prevenção e o controle dos poluentes. Desde então, os demais países vêm incentivando pesquisas na inovação e desenvolvimento que vão de encontro aos princípios da Química Verde (TSUKUI; REZENDE, 2014).

Quadro 1 - Os 12 princípios da Química Verde.

<p>1. Prevenção. Evitar a geração de resíduo é melhor do que tratá-lo após sua produção.</p>	<p>2. Economia de Átomos. Métodos sintéticos devem ser planejados com intuito de maximizar a incorporação de todos os átomos dos materiais de partida no produto final.</p>	<p>3. Síntese de Produtos Menos Perigosos. Quando viável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente.</p>
<p>4. Planejamento de Produtos Seguros. O emprego de produto químico deve ser planejado de modo que realize a função desejada e ao mesmo tempo não seja tóxico.</p>	<p>5. Solventes e Auxiliares mais Seguros. O uso de substâncias auxiliares deve ser descontinuado sempre que possível e quando utilizadas devem ser inócuas.</p>	<p>6. Busca pela Eficiência de Energia. O uso de energia deve ser minimizado. Sempre que possível, nos processos químicos deve-se utilizar temperatura e pressão ambiente.</p>
<p>7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria Prima. A utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis quando aplicar técnica economicamente viável.</p>	<p>8. Evitar a Formação de Derivados. A derivatização desnecessária deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.</p>	<p>9. Catálise. Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.</p>
<p>10. Planejamento para a Degradação. Os produtos químicos precisam ser planejados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.</p>	<p>11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição. É necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que viabilizem o monitoramento do processo, antes que ocorra a formação de substâncias nocivas.</p>	<p>12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes. As substâncias, e seu modo de uso deve ser escolhidos a fim de minimizar potencial acidente químico.</p>

Fonte: Anastas e Warner (1998).

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A qualidade dos extratos obtidos de uma matéria-prima está fortemente relacionada à técnica de extração empregada, e a qualidade dos extratos é medida pelo perfil químico do produto (FRANÇA, 1999; BRUNNER, 1994).

Os processos de extração visam separar determinados compostos de uma matriz, por processos físicos, químicos ou mecânicos. Basicamente existem três tipos de processos de extração: sólido-líquido, líquido-líquido e gás-líquido

(LIADAKIS, GEORGE; TZIA, 2003). Esses processos agem para que a retirada da substância de interesse seja a mais completa e seletiva possível.

3.3.1 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS (*PLE- PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION*)

A PLE consiste em combinar temperatura e pressão elevada a solventes líquidos a fim de obter extrações rápidas e eficientes de compostos ativos, em um curto espaço de tempo e com utilização de uma pequena quantidade de solvente. As altas temperaturas estão relacionadas com a redução da viscosidade do solvente, o que facilita a solubilidade dos compostos de interesse, aumentando o seu rendimento (STALIKAS, 2007).

Sua principal vantagem é a utilização de temperaturas acima do ponto de ebulição (80 a 200 °C) dos solventes, que são pressurizados a 10,4 MPa (1500 psi) o que os mantêm no estado líquido. Esse método permite que a extração seja conduzida em um ambiente livre de luz e de oxigênio, o que favorece a sua utilização para a obtenção de compostos nutracêuticos (STALIKAS, 2007).

3.3.2 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

O ultrassom é um processo que utiliza energia de ondas sonoras imperceptíveis a capacidade auditiva humana. As ondas criam variações na pressão do líquido, gerando cavitação, e as forças de cisalhamento causam o aumento da transferência de massa dos compostos a serem extraídos. Durante o processo as temperaturas chegam a atingir cerca de 5.000 K e pressões de aproximadamente 200 bar (JI et al., 2006).

Este processo está sendo cada vez mais utilizado por gerar maior rendimento de extração, aumento na taxa de extração, redução de tempo e outras vantagens (VILKHU et al., 2008). A gama de aplicações na extração por ultrassom inclui ervas, óleos, proteínas e compostos bioativos de material vegetal e animal, como as antocianinas, por exemplo (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

3.3.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas que atuam com frequência variada entre 0.3 e 300 GHz. Seu aquecimento resulta da rotação das moléculas e a condução iônica. Para que seu mecanismo funcione, as moléculas de interesse e o solvente utilizado devem possuir um momento dipolar. Enquanto ocorre a extração, o solvente é aquecido assim como à água que encontra-se presente no interior das células, o que gera uma pressão na parede celular, causando sua ruptura e com isso a liberação do conteúdo intracelular (TATKE; JAISWAL, 2011).

Existem dois sistemas de extração por micro-ondas: vaso aberto que é mais seguro e possui menor custo, porém demanda um período maior de extração, e vaso fechado, onde as temperaturas são superiores ao ponto de ebulição do solvente, o que proporciona menor tempo de extração e elevada eficiência (DELAZAR et al., 2012).

3.3.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

O Quadro 2 apresenta uma comparação entre as vantagens e desvantagens de cada um dos métodos, segundo a literatura consultada.

Quadro 2- Vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de extração aplicável ao estudo de plantas.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Extração com Líquido Pressurizado (PLE)	Método rápido; requer mínima quantidade de solvente; não requer filtração; totalmente automatizado e fácil de operar	Depende da matriz, tem custo muito elevado.
Extração por Ultrassom	Método rápido, não depende da matriz, tem baixo custo.	Método trabalhoso; requer grande quantidade de amostra; requer grande quantidade de solvente; filtração e exposição aos vapores do solvente.
Extração assistida por Micro-ondas	Método rápido; requer pequena quantidade de solvente; permite o controle completo dos parâmetros de extração; permite o processamento simultâneo de 12 amostras	Requer filtração; usa solventes polares; necessita de limpeza a cada extração e tem custo moderado; requer altas temperaturas.

Fonte: Özcan e Özcan (2004).

3.4 ANTIOXIDANTES

A função dos antioxidantes é retardar e prevenir a oxidação dos substratos, impedindo a formação dos radicais livres (RIBEIRO, 2011). Os antioxidantes podem ser extraídos de várias espécies de plantas, normalmente se extrai daquelas que são usadas como condimentos, por serem excelentes fontes de compostos fenólicos (BENELLI, 2010).

Entre os compostos presentes nos vegetais incluem-se os tocoferóis, carotenoides, ácido ascórbico, compostos fenólicos e antocianinas, que variam de acordo com seu conteúdo e diversidade entre as espécies (PRATA, 2009).

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e ainda enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. O termo antioxidante tem como significado “impedir a oxidação das substâncias químicas” que ocorre nas reações metabólicas. São obtidos pelos alimentos, encontrados na sua maioria nos

vegetais, o que explica parte da ação saudável que as frutas, hortaliças e cereais causam no nosso organismo (BENZAQUEN, 2009).

3.5 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, que além de serem responsáveis por suas funções fisiológicas, também estão relacionados com a atividade antioxidante da planta. Os compostos fenólicos são considerados conservantes naturais, pois são capazes de inibir a oxidação lipídica e também a contaminação microbiana (SILVA, 2016).

Os compostos fenólicos vêm sendo utilizados na indústria alimentícia, por sua eficácia na oxidação lipídica. A utilização desses compostos como antioxidantes nos alimentos pode contribuir para aumentar a vida útil do produto. Os produtos resultantes da ação antioxidante dos compostos fenólicos são estáveis devido ao anel aromático que possui em sua estrutura (ACHKAR et al., 2013).

De acordo com Del-Ré e Jorge (2011) as atividades antioxidantes estão relacionadas com a presença dos compostos fenólicos e a extração desses compostos está altamente influenciada pelos reagentes utilizados, ou seja, quanto maior a polaridade do solvente, maior será a quantidade de compostos fenólicos extraídos. O que pode influenciar também na alta ou baixa solubilidade dos extratos em água.

3.6 ÍNDICES DE ESTABILIDADE OXIDATIVA

A oxidação é uma das principais causas da perda de qualidade dos alimentos durante o seu processamento e armazenamento. Os alimentos podem oxidar devido a vários fatores: reações hidrolíticas, oxidação enzimática, fotoxidação e também por autooxidação, o que é um dos principais mecanismos de deteriorização dos óleos e gorduras (BERGER; HAMILTON, 1995), e ocorrem de acordo com o ambiente em que se encontram e o meio oxidante.

A estabilidade oxidativa é um dos parâmetros globais para a avaliação da qualidade de óleos e gorduras, e não depende somente da composição química,

mas também da qualidade da matéria-prima, e as condições de preparo e estocagem (ANTONIASSI, 2001).

Um dos fatores que é indispensável para o estudo da estabilidade oxidativa, são as condições experimentais, pois a presença de antioxidantes no meio e a temperatura exercem influência considerável na degradação do alimento (FARHOOSH, 2007).

Dentre os métodos acelerados para medir o índice de capacidade oxidativa (OSI) destaca-se o Rancimat (AOCS Official Method 12b-92), que foi desenvolvido para determinação automatizada do período de indução. O teste é baseado na oxidação forçada no qual ocorre a injeção de um fluxo de ar contínuo e uma temperatura elevada (120°C). Os compostos voláteis que são formados durante a oxidação da amostra, são coletados em um frasco contendo água destilada. Muitos compostos são ácidos com baixo peso molecular, que vão alterar o valor da condutividade da água, que é medida continuamente, e o período de indução no ponto de inflexão, onde a condutividade aumenta exponencialmente. Quanto maior o período de indução de uma amostra adicionada de antioxidantes, maior a proteção oferecida (KRISTTOT, 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de extração foram desenvolvidos em parceria com o Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foi utilizado para as extrações hibisco seco, adquirido em Florianópolis, Santa Catarina.

As análises para medida de estabilidade oxidativa dos extratos empregados em maionese caseira foram realizadas em parceria com o Laboratório de Técnicas Fototérmicas e Espectrofotometria Óptica (DAFIS) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira (UTFPR).

4.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

As amostras de hibisco foram adquiridas no comércio local de Florianópolis e foram submetidas ao processo de moagem em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil). A matéria-prima triturada foi então acondicionada em embalagens de polietileno transparente e estocadas em refrigerador a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das extrações.

4.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

O equipamento (Figura 2) assim como o procedimento experimental foram descritos por Andrade, Trivellin e Ferreira (2017). O leito foi preenchido com 3 g de amostra, esferas de vidro e algodão. Uma mistura de etanol e água 70:30 (v:v) acidificada com 1% de ácido cítrico, foi utilizada como solvente e bombeada para o leito a uma vazão de 3 mL min^{-1} por uma bomba de HPLC (Waters, modelo 515, EUA) até que o mesmo atingisse a pressão de 100 bar.

O solvente passou por um banho de aquecimento (Microquímica, Brasil) para que alcançasse a temperatura de trabalho ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $80\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo o leito também encamisado. Após atingir as condições de pressão e temperatura desejadas, a válvula que permite a passagem do solvente foi aberta e teve início a coleta das amostras em frascos âmbar até o tempo total de 30 minutos de extração. O solvente

presente nos extratos foi removido em evaporador rotativo. As extrações foram realizadas em duplicata e os resultados dos rendimentos expressos como média \pm desvio padrão.

Figura 2- Extração com Líquido Pressurizado



Fonte: Autoria própria (2020).

4.3 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM (US)

As extrações assistidas por ultrassom (Figura 3) foram realizadas de acordo com Heleno et al. (2016) com algumas modificações. Para realizar a extração, 5 g de amostra foram pesadas em um béquer de 250 mL, e adicionou-se 100 mL do solvente (mistura de etanol e água 70:30 (v:v) acidificada com 1% de ácido cítrico). A macroponteira do ultrassom foi submersa no líquido em uma altura de 0,5 cm no centro do béquer. As extrações foram realizadas durante 15 minutos em uma potência de 500 W. Após as extrações, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo QUALY (gramatura de 80 g, 15 cm de diâmetro) e o filtrado obtido foi evaporado para a remoção do solvente. Em seguida, os extratos acondicionados em frascos âmbar foram armazenados em *freezer* doméstico, a -18°C . As extrações foram realizadas em duplicata e os resultados dos rendimentos expressos como média \pm desvio padrão.

Figura 3- Extração Assistida por Ultrassom



Fonte: Autoria própria (2020).

4.4 EXTRAÇÃO EM MICRO-ONDAS

As extrações assistidas por micro-ondas foram realizadas baseando-se no trabalho de Mazzutti et al. (2017) com algumas modificações. O equipamento utilizado (Figura 4) foi um micro-ondas (MonowaveTM 300, Anton Paar), que opera até uma pressão de 20 bar, potência máxima de 850 W e pode chegar a uma temperatura máxima de 260 °C. As temperaturas utilizadas foram medidas com a utilização de um sensor de infravermelho. No frasco de reação fabricado em vidro borossilicato foram adicionados 1 g de amostra, juntamente com 20 mL de solução etanol água 70% (v/v) e uma barra magnética.

O frasco foi fechado com uma tampa de silicone revestido de Teflon e então introduzido no aparelho, onde as condições de operação foram definidas. O tempo e a agitação foram fixados em 10 min e 1000 rpm, respectivamente, e as temperaturas escolhidas foram 80 e 130 °C.

As condições previamente estabelecidas foram executadas pelo micro-ondas da seguinte maneira: 1) aquecimento até a temperatura desejada, 2) reação (10 minutos a 1000 rpm) e 3) resfriamento utilizando ar comprimido até a temperatura de 55 °C. Após as extrações, as soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo QUALY (gramatura de 80 g, 15 cm de diâmetro) e o filtrado obtido foi evaporado para a remoção do solvente. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Figura 4- Extração assistida por Micro-ondas

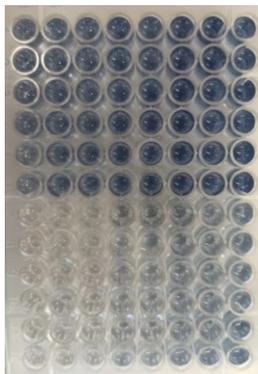


Fonte: Autoria própria (2020).

4.5 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Para a determinação do teor de fenólicos totais, seguiu-se a metodologia descrita por Kosar, Dorman e Hiltunen (2005), com modificações. Os extratos foram diluídos em etanol-água 70 %, os quais foram pipetados para um tubo de Eppendorf de 2 mL que já continha 0,6 mL de água destilada, e 50 μ L de reativo de Folin foram adicionados ao meio e então a solução foi agitada em vortex. Após a agitação foram adicionados a este meio 150 μ L da solução de carbonato de sódio 20 % (m/v) e 190 μ L de água destilada (Figura 5). Os tubos foram agitados, e então incubados durante 2 h, a temperatura ambiente (25°C) e sob ausência de luz. Passado o tempo mediu-se a absorbância das soluções em um espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo, SP, Brasil) a 760 nm. As análises foram realizadas em quadruplicata e os resultados foram expressos em mg de equivalente em ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de extrato).

Figura 5- Análise de Teor de Fenólicos Totais.



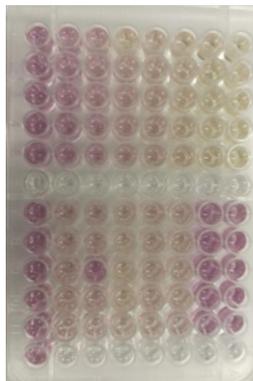
Fonte: Autoria própria (2020).

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada por meio do método de captura do radical DPPH, onde os extratos foram diluídos em etanol-água 70 % até se obter uma concentração de 10 mg mL^{-1} . As soluções ficaram em repouso durante 30 min, sob ausência de luz a temperatura ambiente (25°C) e, em seguida, leu-se as absorbâncias no comprimento de onda de 517 nm (Figura 6). As análises foram realizadas em quadruplicatas e os resultados foram expressos em μmol de equivalente em Trolox por g de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato).

Figura 6- Análise de DPPH.



Fonte: A autoria própria (2020).

4.6.2 ABTS

Os extratos foram também analisados por meio do método ABTS, onde foi preparado em ausência de luz e sob temperatura ambiente (25°C), uma solução de 7mM de ABTS com uma solução de 139,8mM de persulfato de potássio. Os extratos de hibisco, foram diluídos em etanol-água 70%, até obter-se uma concentração de 10 mg mL⁻¹ e então foram diluídas na solução ABTS preparada anteriormente, as diluições ficaram por 45 min na ausência de luz e sob temperatura ambiente (25°), e após, a absorbância foi lida a 734 nm. As análises foram realizadas em quadruplicatas e os resultados foram expressos em μmol de equivalente em Trolox por g de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato).

4.7 PREPARO DA MAIONESE

A maionese utilizada para realizar a análise de estabilidade oxidativa foi preparada com leite cru (adquirido de um produtor rural da cidade de Campo Mourão – Paraná) e óleo de chia prensado a frio (cedido generosamente pelo professor Leandro Herculano – Departamento Acadêmico de Física da UTFPR – MD) e extrato de hibisco obtidos nas extrações de PLE 40°C e 80°C e US que são os extratos com melhor teor de antioxidantes.

Foram preparadas 4 formulações de maionese, a composição de cada amostra está disposta na Tabela 1. A única amostra que não continha extrato de hibisco foi a FC (formulação controle), que foi usada como base de comparação dos resultados.

Tabela 1- Formulações das maioneses utilizadas no teste de estabilidade oxidativa.

Formulações	Composição
FC	50% leite cru + 50% óleo de chia
FPLE40	49,75% leite cru + 49,75% óleo de chia + 0,05% de extrato PLE 40°C
FPLE80	49,75% leite cru + 49,75% óleo de chia + 0,05% de extrato PLE 80°C
FUS	49,75% leite cru + 49,75% óleo de chia + 0,05% de extrato US

FC: Formulação controle; FPLE40: Formulação com extrato de líquido pressurizado a 40°C; FPLE80: Formulação com extrato de líquido pressurizado a 80°C; FUS: formulação com extrato de ultrassom.

Fonte: Autoria própria (2020).

4.8 ÍNDICE DE ATIVIDADE OXIDATIVA

Para medida do índice de estabilidade oxidativa (OSI) foi utilizado o método proposto pela AOCS (1999) com a utilização do equipamento Rancimat (898 Professional Biodiesel Rancimat, Metrohm).

Em tubos de ensaio grande foram pesados 3 g das formulações de maionese, após, os tubos foram colocados no equipamento onde foram aquecidos e mantidos a uma temperatura de 120 °C e fluxo de ar constante de 20L/h. Os compostos gasosos provenientes da oxidação lipídica foram arrastados para uma célula onde continha água ultra-pura, e então a condutividade foi monitorada continuamente até que atingisse um aumento súbito que é revelado na inflexão da curva, o que permite identificar o tempo de indução que corresponde ao índice de estabilidade oxidativa. O OSI é medido em horas (h) (VIEIRA, 2012).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 10.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, Ok, 74104, USA). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.10 RENDIMENTOS

O rendimento das equações foi determinado através da Equação (1):

$$X_0 = \frac{ME \times 100\%}{A} \quad (1)$$

Onde: X_0 é o rendimento de extração expresso em porcentagem; ME é a massa de extrato obtida, expressa em g; e A é a massa da amostra, expressas em g.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 estão dispostos os resultados de rendimento obtidos por meio das extrações com líquido pressurizado (PLE), ultrassom (US) e micro-ondas (MAE).

Tabela 2- Resultados de rendimento dos extratos obtidos por meio de extração com líquido pressurizado (PLE), ultrassom (US) e micro-ondas (MAE).

Método de extração	T (°C)	P (bar)	Rendimento (%)
PLE	40	100	49,0 ^b ± 1,4
	80	100	79,2 ^a ± 10,3
US	Amb	Atm	41,4 ^b ± 1,2
MAE	80	-	78,5 ^a ± 2,5
	130	-	82,2 ^a ± 0,5

T: temperatura; P: pressão; PLE: extração com líquido pressurizado; US: ultrassom; MAE: extração assistida por micro-ondas; Amb: ambiente; Atm: atmosférica.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem ao nível de 5% ($P < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2020).

Os extratos que foram submetidos à extração PLE à 80 °C obtiveram maior rendimento em relação aos que foram submetidos a extração PLE à 40°C, isso se deve a melhor solubilização dos compostos quando a temperatura é elevada, favorecendo através da pressão a penetração do solvente na matriz, facilitando a transferência de massa (CARDENAS-TORO et al., 2015)

O extrato obtido pelo método US foi o que obteve o rendimento estatisticamente igual ao PLE 40°C. Porém devido ao fato de que o ultrassom pode reduzir o tamanho da partícula, tal qual haja perda durante o processo de filtração, o que sugere que esse processo em escala, possa não ser viável (VINATORU; MASON; CALINESCU, 2017).

O rendimento dos extratos submetidos à extração por MAE, se mantiveram com resultados próximos, o que é uma das vantagens do micro-ondas, gerar maior rendimento, com menor tempo e volume de solvente (CIULU et al., 2017; PANJA, 2017; VINATORU; MASON; CALINESCU, 2017).

Os resultados do teor de compostos dos fenólicos totais, DPPH e ABTS estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados obtidos na análise do teor de fenólicos totais, análise de antioxidantes por DPPH e ABTS.

Método de extração	T (°C)	P (bar)	TFT (mg de EAG.g ⁻¹)	DPPH (μmol ET.g ⁻¹)	ABTS (μmol ET.g ⁻¹)
PLE	40	100	27,1 ^a ± 1,1	136,9 ^a ± 10,3	247,7 ^a ± 16,1
	80	100	26,9 ^a ± 0,9	111,1 ^b ± 3,5	236,6 ^a ± 12,7
US	Amb	Atm	27,7 ^a ± 2,1	143,4 ^a ± 6,0	223,3 ^{ab} ± 12,8
MAE	80	-	18,2 ^b ± 2,1	85,4 ^c ± 6,8	212,1 ^b ± 13,9
	130	-	20,5 ^b ± 2,3	99,7 ^b ± 2,4	203,8 ^b ± 12,6

T: temperatura; P: pressão; PLE: extração com líquido pressurizado; US: ultrassom; MAE: extração; TFT: teor de fenólicos totais.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem ao nível de 5% (P<0,05).

Fonte: Autoria própria (2020).

Embora os compostos fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante de produtos naturais, a sua determinação por esse método, expressa em termos de ácido gálico presente na amostra, o que não caracteriza completamente a atividade antioxidante, representando apenas uma boa estimativa desta propriedade (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Das amostras analisadas, as melhores médias da concentração de compostos fenólicos, foram os extrato por US, PLE 40°C e 80°C. Segundo Duarte-Almeida et al. (2006) uma das grandes dificuldades pelo método é a quantidade de cubetas necessárias para que se possa realizar as replicatas e amostras padrão.

O método de Folin-Ciocalteu não fornece valores exatos do teor de fenólicos, tendo em vista que outros compostos redutores, como o ácido ascórbico, também reagem com o ácido fosfotúngstico-fosfomoblídico formando o complexo azul de molibdênio (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

De acordo com a Tabela 3 foi verificado que os extratos que melhor apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH foi o obtido pela extração US (143,4 ± 6,0 μmol ET.g⁻¹), seguido do extrato por PLE 40°C (136,9 ± 10,3 μmol ET.g⁻¹) e PLE 80°C (111,1 ± 3,5 μmol ET.g⁻¹). O extrato que obteve a menor atividade foi o obtido por MAE 80°C (85,4 ± 6,8 μmol ET.g⁻¹). Esse método se baseia na transferência dos elétrons de um composto antioxidante para um radical livre,

DPPH, que ao se reduzir perde a sua coloração púrpura. Deste modo avalia-se apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por esse motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Segundo Re et al. (1999) a técnica do radical ABTS, é recomendada para avaliar a atividade dos compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica. Os extratos de *H. sabdariffa* L. obtidos por meio de PLE 40°C ($247,7 \pm 16,1 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$), PLE 80°C ($236,6 \pm 12,7 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$) e US ($223,3 \pm 12,8 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$) apresentaram os melhores percentuais de inibição do radical ABTS, representando maior potencial antioxidante. Os menores valores foram obtidos por MAE 130°C ($203,8 \pm 12,6 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$) e MAE 80°C ($212,1 \pm 13,9 \mu\text{mol ET.g}^{-1}$).

Para a medida de atividade oxidativa foram escolhidos os extratos que obtiveram os melhores resultados de TFT, DPPH e ABTS, que foram PLE 40 e 80 °C e US.

Tabela 4- Resultados da análise de Índice de capacidade oxidativa.

Tratamentos	OSI (h)
FC	$2,365^b \pm 0,216$
FPLE80	$3,292^{ab} \pm 0,312$
FPLE40	$3,732^a \pm 0,620$
FUS	$3,895^a \pm 0,599$

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem ao nível de 5% ($P < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2020).

As metodologias para determinar a capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de possuir diversos embasamentos. Dessa forma, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante, irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A estabilidade oxidativa é um parâmetro muito utilizado para avaliar os sinais de deterioração do alimento durante o armazenamento, onde simula a vida útil do produto, além de verificar a eficiência da adição de antioxidantes (HIROMOTO, 2018).

Segundo os resultados (Tabela 4) do aumento de estabilidade oxidativa o extrato mais potente foi o obtido através de US, seguido do PLE 40°C e por fim o PLE 80°C. Ao avaliar os resultados de estabilidade oxidativa da maionese, as amostras com extrato de hibisco obtidos por PLE 40°C e US apresentaram o maior tempo de indução quando comparados com a amostra sem extrato e a amostra preparada com extrato de PLE 80°C, mostrando que os extratos se apresentam eficientes se aplicados como antioxidante natural. De acordo com Hiromoto (2018) em seus estudos os extratos de hibisco apresentaram os maiores valores de estabilidade oxidativa, quando comparados aos demais tratamentos.

6. CONCLUSÃO

Os extratos obtidos através dos métodos de PLE, US e MAE, apresentaram resultados satisfatórios em relação aos rendimentos, observou-se que fatores como a pressão e temperatura, influenciaram nos resultados. Nas condições realizadas para esse trabalho, pode-se inferir que foram obtidos resultados significativos, visto que o *Hibiscus sabdariffa* L. apresentou quantidades consideráveis de antioxidantes, devendo dessa forma se manter os estudos, a fim de aumentar a utilização desses extratos pelas indústrias. Devem ser tomadas medidas para o melhoramento da obtenção dos extratos, bem como a sua utilização como antioxidante natural. Mesmo com uma variedade de estudos sobre o assunto, ainda não há preparação padrão referente ao método de preparo de amostras, extração e aplicação nos alimentos. Com a padronização facilitaria a comparação dos resultados bem como os estudos referentes à aplicação em escala industrial.

Avaliando os resultados obtidos referentes as extrações, apesar da utilização do ultrassom ter apresentado o menor rendimento, é o extrato que apresenta os melhores resultados em relação aos compostos de fenólicos totais, atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS e na análise dos índices de capacidade oxidativa, sendo um dos mais indicados para tais aplicações.

A utilização dos antioxidantes naturais tende a aumentar gradativamente, sendo assim necessário outros estudos complementares, como a composição desses extratos, visto que existem vários tipos de compostos que podem estar atuando como antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. CEU Arkos La Universidad Vallartense, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/123439>>. Acesso em: 13 nov.2020.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. 12 Principles of Green Chemistry - American Chemical Society. 1998 Disponível em: <<http://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html>>. Acesso em: 15 out. 2019.
- ANDRADE, K. S.; TRIVELLIN, G.; FERREIRA, S. R. S. Piperinerich extracts obtained by high pressure methods. The Journal of Supercritical Fluids, v. 128, n. April, p. 370–377, 2017.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Boletim CEPPA, v. 19, p. 353-380, 2001.
- AOCS - American Oil Chemists Society; *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5^o ed.,Champaign: AOCS, 1999.
- BACKWATER BOTANICS. Word Press. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). 2014. Disponível em:<<https://backwaterbotanics.wordpress.com/2014/05/12/hibiscus-hibiscus-sabdariffa/>>. Acesso em: 01 dez. 2020.)
- BENELLI, P. Universidade Federal De Santa Catarina – Ufsc Centro Tecnológico – Ctc Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De Agregação De Valor Ao Bagaço De Laranja Extratos Bioativos Através De Diferentes Patrícia Benelli Orientadora : Prof a . Dra . Sandra Regina. 2010.
- BENZAQUEN, T. Os antioxidantes. p. 17–29, 2009.
- BERGER, K. G.; HAMILTON, R. J. Em Developments in Oils and Fats; Hamilton, R. J., ed.; Chapman & Hall: London, 1995, cap. 7.
- CARDENAS-TORO, F.P. et al. Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. Food and bioproducts processing 94, 90–100, 2015.
- CIULU, M.; QUIRANTES-PINÉ, R.; SPANO, N.; SANNA, G.; BORRÁS-LINARES, I.; SEGURA-CARRETERO, A. Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic ompound-rich extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. Industrial Crops & Products, v. 108, n. June, p. 106–112, 2017.
- CHEMAT, F., VIAN, M. A., & CRAVOTTO, G. —Green extraction of natural products:

concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* 13:8615, 2012.

DELAZAR, A. et al. Chapter 5 Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation. In: *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*. [s.l: s.n.]864, 2012.

DELWICHE, J. The impact of perceptual interactions on perceived flavor. *Food Quality and Preference*, v. 15, n. 2, p. 137–146, 1 mar. 2004.

DEL-RÉ, P. V.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano (*Oreganum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 31, n. 4, p. 955-959, 2011.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 2, June 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000200031&lang=pt>. Acesso em: 13/11/2020.

FARHOOSH, R. 2007. The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-life Prediction of Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 205.

FRANÇA, L.F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.A; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region, *Journal of Supercritical Fluids* v. 14, p. 247-256, 1999.

GALUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z., & NAMIEŚNIK, J.. —The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50:78, 2013.

HELENO, S. A.; DIZ, P.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, v. 197, p. 1054–1063, 2016.

HIROMOTO, Patricia Joho. Extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como antioxidante natural aplicado em óleo de soja. *Engenharia e Ciência de alimentos - IBILCE*. 2, dezembro, 2018. 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/180323>>. Acesso em: 13/11/2020

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ISMAIL, A.; KHAIRUL IKRAM, E.; MOHD NAZRI, H. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds - nutritional composition, protein quality and health benefits. *Food*, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2008.

JI, J. et al. Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 13, n. 5, p. 455–462, 1 jul. 2006.

KOŞAR, M.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, v. 91, n. 3, p. 525–533, 2005.

KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.) *The stability and shelf-life of food*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2000. chap.12, p.279-310.

LIADAKIS, GEORGE; TZIA, C. *Extraction Optimization in Food Engineering*. [s.l: s.n.], 2003.

LIN, T.-L. et al. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*, v. 27, n. 3, p. 140–145, 1 mar. 2007.

MACIEL, M.J.; PAIM, M.P.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J. . Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 3, p. 462–470, 2012.

MAZZUTTI, S.; FERREIRA, S. R. S.; HERRERO, M.; IBAÑEZ, E. Intensified aqueous-based processes to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 119, p. 64–71, 2017.

ÖZCAN, A.; ÖZCAN, A. S. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*. *Talanta*, v. 64, n. 2, p. 491–495, 8 out. 2004.

PANJA, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, v. 17, p. 1–10, 2017.

PRATA, G. G. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pétalas de rosas de corte. 2009. está incompleto.

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

RAMOS, D. D. et al. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. *Ciencia Rural*, v. 41, n. 8, p. 1331–1336, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology e Medicine*, v.26, p.1231-1237, 1999.

RIBEIRO, T. P. MATURAÇÃO, QUALIDADE, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE UVAS AMERICANAS E DOS SUCOS ELABORADOS NO SUBMÉDIO DO VALE DO SÃO FRANCISCO. 2011.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235–254, 2005.

SÁYAGO-AYERDI, S. G. et al. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 7886–7890, 17 ago. 2007.

SILVA, Leticia Dangui da. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos microencapsulados de ervas aromáticas. 2016, 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, 2016.

SOBOTA, JOCIANE DE FÁTIMA; PINHO, MARCELA G.; OLIVEIRA, V. B. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. *Revista Fitos*, v. 10(1), n. 1, p. 1–93, 2016.

SORIA, A. C. e VILLAMIEL, M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 323-331.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

TATKE, P.; JAISWAL, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Research Journal of Medicinal Plant*, 2011.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Microwave assisted extraction and green chemistry. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 6, p. 1713–1725, 2014.

VIEIRA, S.F. Desenvolvimento e avaliação de um instrumento para determinação de estabilidade oxidativa baseado em espectroscopia de emissão no infravermelho próximo. UNICAMP, 2012.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, n. 2, p. 161–169, 2008.

VINATORU, M.; MASON, T. J.; CALINESCU, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 97, p. 159–178, 2017.

ZUIN, V. G. e PEREIRA, C. A. M.. —Green sample preparation focusing on organic analytes in complex matrices. In: Mohammad, A.; Inamuddin. (Org.). *Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes*. 1ed. London: Springer, 2013, v. 1, p. 1-52.

ZUIN, V. G. —Green sample preparation of complex matrices: towards sustainable

separations of organic compounds based on the biorefinery conceptll. Pure Appl. Chem. 88:29, 2016.