UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

KÁTIA YURI FAUSTA KAWASE

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.)

RIO DE JANEIRO
2013

Kátia Yuri Fausta Kawase

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Profª. Dra.Cheila Gonçalves Mothé
Prof. Dr. Gerson Luiz Vieira Coelho

Rio de Janeiro
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

K22o Kawase, Kátia Yuri Fausta.

Obtenção, caracterização e aplicação do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.). – 2013.

135, f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadores: Cheila Gonçalves Mothé e Gerson Luiz Vieira Coelho.

1. Óleo essencial de orégano. 2. Processos de Separação. 3. Análise Térmica – Teses. I. Mothé, Cheila Gonçalves; Coelho, Gerson Luiz Vieira (Orientadores). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título

CDD: 665.3

Kátia Yuri Fausta Kawase

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE* L.)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2013:

_____

Profª Cheila Gonçalves Mothé D.Sc, UFRJ

_____

Prof. Gerson Luiz Vieira Coelho Dr-Ing, UFRRJ

_____

Profª Ana Lúcia do Amaral Vendramini D.Sc, UFRJ

_____

Profª Carla Reis de Araújo D.Sc, UFRJ

_____

Profª Rosa Helena Luchese PhD, UFRRJ

_____

Profª João Tomaz da Silva Borges D.Sc, IFES

_____

Profª Gláucia Barbosa Candido Alves Slana PhD, FIOCRUZ

Dedico esta tese ao meu pai Maurício Kawase, que um dia acreditou que este seria um dia de grande vitória. Obrigada pela educação inicial no qual o conhecimento, a honestidade e a confiança estiveram presentes e ainda permanecem em minha vida.

Aos meus pais, Maurício e Geni, meus agradecimentos por zelar pela minha educação e saúde e, por prezarem minha felicidade. A minha querida irmã Kelly, pelo apoio e estímulo aos estudos. Aos que formam comigo um lar de muitas bênçãos e amor, meu filho Gabriel, presença do amor incondicional de Deus em minha vida, e meu companheiro Sidclei pela sua cumplicidade e por trazer segurança a este lar.

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através de Bolsa de estudo durante o período desta tese.

“Porque a sabedoria dá-se a conhecer pela língua: e o bom senso, e a ciência, e a doutrina mostram-se na palavra do homem cordato, e sua firmeza consiste nas obras de justiça.”

Eclesiástico 4:29

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais um objetivo alcançado, por uma vida feliz ao lado de meus familiares e amigos.

Agradeço também as pessoas que participaram da realização desta tese:

Aos orientadores, profª Cheila Mothé e prof. Gerson Coelho. Agradeço pelos ensinamentos teóricos e práticos sobre os assuntos nesta tese abordados assim como os também não apresentados. Foram quatro anos de muita paciência e sabedoria de dois grandes pesquisadores ao me orientar, mesmo nas adversidades mostraram-se empenhados e acreditaram em mim para realização deste trabalho. Muito obrigada.

À minha ex-orientadora profª Rosa Luchese. Obrigada pela ajuda desde a graduação, pelo exemplo de perseverança e fidelidade aos objetivos. Muito obrigada querida Rosa.

Aos professores João Tomaz e Juliana Vidigal pela ajuda nas realizações das análises de aplicação do óleo essencial bem como pela orientação sobre os temas envolvidos. Muito obrigada.

Ao Biólogo Geraldo Baeta, por simplesmente ser um grande amigo ausente ou presente.

Aos amigos e colegas de laboratório: Camila, Arantes, Natália, Bárbara, Yasmin, Iara, André, Andrew, Gabriel e Guilherme. A convivência nos laboratórios, em horários e dias mesmo não convencionais, possibilitou a obtenção de todos os resultados necessários, apesar das inúmeras análises que deram erradas. As frustrações eram superadas em equipe e o conhecimento sempre dividido. A caminhada permanece e espero encontrá-los novamente. Muito obrigada.

Aos técnicos e responsáveis pelos laboratórios utilizados para realização de diferentes análises, importantes para finalização desta Tese: Geraldo Baeta (Laboratório de Microscopia/EMBRAPA Agrobiologia); Drª Cristina Pereira, Mariana Paixão e Thais de Paiva (Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros/COPPE/UFRJ); José Montovano (Laboratório de Raios X/IEN/UFRJ); Laís Bernardo Dantas (Laboratório de Análise Térmica professor Ivo Giolito RJ, EQ/UFRJ); Edná Rodrigues (Laboratório de Microbiologia de Alimentos/DTA/UFRRJ); Evelyn Lepre e Saulo Scudini (Laboratório de Análise Físico-Química/IFF-Bom Jesus); Anderson e Belon (Laboratório de Tecnologia de Alimentos/IFES-Venda Nova do Imigrante). Muito obrigada.

Ao Sr. Geraldino da Silva, da Fazenda Rei do Mato, por disponibilizar um local para plantação exclusiva do orégano utilizado neste trabalho. Muito obrigada.

Aqueles que me esqueci de agradecer, muito obrigada e desculpe pelo esquecimento.

Parte desta tese foi apresentada nos seguintes congressos e revistas científicas:

- KAWASE, K. Y. F.; FURTADO, F. A.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Changes in essential oil of *Origanum vulgare* L. affected by different extraction methods. **International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences,** v. 14, p. 238-247**.** 2013.

- KAWASE, K. Y. F.; FURTADO, F. A.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Óleo essencial: alternativa par substituição de aditivos sintéticos em alimentos. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 28, n.2., p.28-29. 2013.

- KAWASE, K. Y. F.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Influencia dos Compostos presentes no óleo essencial do Orégano (*Origanum vulgare* L.) na atividade antioxidante. In: **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química** (COBEQ 2012), 2012, Búzios. Cobeq 2012, 2012. CD-Rom.

- KAWASE, K. Y. F.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Carvacrol e timol: caracterização térmica em óleo essencial de orégano. In: VIII Congresso Brasileiro e III Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria, 1-4 abril 2012. São Paulo. **Anais do VIII Congresso Brasileiro e III Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria.** São Paulo. 2012.

- KAWASE, K. Y. F.; ALVARENGA, C. M.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Extração de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) com CO_2 supercrítico e métodos convencionais. **Revista Analytica**, v. 53, p. 58-67. 2011.

- KAWASE, K. Y. F. ; MOTHÉ, C.G. ; COELHO, G.L.V. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO ORÉGANO (ORIGANUM VULVARE L.) E COMPARAÇÃO COM ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS. In: 9 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011, Campinas. **Anais do 9º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2011.

- MOTHÉ, C.G.; COELHO, G.L.V.; KAWASE, K. Y. F. IDENTIFICAÇÃO POR GC-MS DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO, ORIGANUM VULGARE L., OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA E OUTROS MÉTODOS CONVENCIONAIS. In: **XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010, Salvador. Anais do XXII CBCTA, 2010.

Premiação:

- **Prêmio Leopoldo Hartman** (6º lugar). Identificação por GC-MS de compostos bioativos do óleo essencial de orégano, *Origanum vulgare* L., obtido por extração supercrítica e outros métodos convencionais, XXII CBCTA, Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

RESUMO

KAWASE, Kátia Yuri Fausta. **Obtenção e Caracterização de Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare* L.).** Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Os óleos essenciais apresentam compostos bioativos, como atividade antioxidante e antimicrobiana, inclusive contra bactérias patogênicas em alimentos que podem substituir os aditivos sintéticos amplamente utilizados na indústria de alimentos. A determinação de um método de extração adequado que permite a obtenção do óleo essencial que mantenha suas propriedades funcionais. Sendo assim, o presente trabalho avalia diferentes óleos obtidos através dos métodos de extração, hidrodestilação, Soxhlet e extração com CO_2 supercrítico da matriz orégano. As atividades antioxidante e antimicrobiana destes óleos foram estudadas e sua aplicação em produto alimentício foi realizada na produção de pão de forma contendo farinha mista de trigo e chia. A técnica microextração em fase sólida (SPME) foi utilizada como uma análise da composição de voláteis e semi-voláteis do orégano desidratado, mostrando ser uma técnica rápida e eficiente. Foram encontrados até 58 compostos, com uma elevada área relativa ao pico do timol. O óleo obtido por hidrodestilação com uma concentração de 10 mg/mL apresentou maior atividade que os conservadores ácido benzoico e sórbico para *Escherichia coli*, além disso todos os óleos essenciais extraídos assim como o carvacrol e timol apresentaram atuação contra ambos os fungos avaliados, *Aspergillus niger* e *Penicillium stolonifer*. Em relação à atividade antioxidante dos óleos extraídos, o obtido por Soxhlet com etanol por 6 h apresentou o melhor resultado e, na análise térmica foi verificado que este apresentou a partir de 200 °C um perfil de curva TG semelhante ao do ácido ascórbico. O óleo essencial de orégano a uma concentração de 0,02% p/p apresentou ser uma eficiente forma de substituição de aditivos sintéticos conservadores como o propionato de cálcio para o pão de forma formulado com farinha de chia e trigo, aumentando a vida útil em até 2 dias, comparado com o produto controle. Esses pães aromatizados, com óleo de orégano, apresentaram índice de aceitação sensorial para impressão global de até 88,56%, indicando uma boa aceitação sensorial, requisito importante para comercialização de produtos alimentícios.

ABSTRACT

KAWASE, Kátia Yuri Fausta. **Extraction and Characterization of Oregano Essential Oil (*Origanum vulgare* L.).** Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Essential oils contain bioactive compounds as antimicrobial and antioxidant activity, including the ones with properties against food borne pathogenic bacteria that can replace synthetic additives widely used in the food industry. The determination of a suitable extraction method allowing obtaining essential oils that maintain functional properties is relevant. Therefore, this study evaluated different oils obtained through the hydrodistillation and Soxhlet extraction procedures with supercritical CO_2 oregano methods. The antioxidant and antimicrobial activities in these oils and its application in food product were studied through the production of sliced bread containing wheat and chia flour. Solid phase microextraction (SPME) was used for the analysis of the composition of volatile and semi-volatile dehydrated oregano and deemed as a fast and efficient technique. A total of 58 compounds were identified with a high peak area relative to thymol. The oil obtained by hydrodistillation showed a concentration of 10 mg/mL and higher activity than benzoic and sorbic acid preservatives against *Escherichia coli*. In addition, all the essential oils, carvacrol, and thymol showed activity against the two evaluated fungi, *Aspergillus niger* and *Penicillium stolonifer*. The extracted oil obtained by the Soxhlet procedure with ethanol for 6 h showed the best antioxidant activity. Thermal analysis verified that this oil was introduced at 200 °C in the TG curve profile, which was similar to that of ascorbic acid. Oregano essential oil, at a concentration of 0.02% w/w, showed to be an efficient product to replace synthetic preservatives additive such as calcium propionate when tested in sliced bread formulated with wheat and chia flour. The bread shelf life increased in 2 days when compared with the control product. Moreover, this bread was flavored with oregano oil and showed overall sensory acceptance rate impression of up to 88.56%, indicating good acceptability and relevant use in the commercialization of food products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas química dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) e óleos essenciais.	6
Figura 2	Estruturas químicas dos compostos aromáticos e terpenoides (isoprenos) de óleos essenciais.	7
Figura 3	Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos.	18
Figura 4	Estruturas químicas do L-ácido ascórbico e o D-ácido ascórbico.	20
Figura 5	Foto ilustrativa do *Origanum vulgare* Linneus.	23
Figura 6	Diagrama de blocos da produção do orégano.	24
Figura 7	Estrutura química do carvacrol e timol.	27
Figura 8	Importação brasileira de orégano em Kg e em valores (US$).	28
Figura 9	Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm), (B) posição com a fibra exposta.	30
Figura 10	Diagrama pressão/temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO_2.	39
Figura 11	Diagrama do processo de separação com fluido supercrítico.	40
Figura 12	Dependência da densidade de CO_2 com a pressão e a temperatura.	45
Figura 13	Processamento e armazenamento do orégano (LPS/UFRRJ).	47
Figura 14	Esquema de extração supercrítica.	51
Figura 15	Unidade de Extração Supercrítica (LPS/UFRRJ)	51
Figura 16	Fotografia de amostras de óleo essencial de orégano utilizadas no método de Folin-Ciocalteau.	56
Figura 17	Radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina).	56
Figura 18	Fotografia de amostras de óleo essencial de orégano e BHT utilizados na avaliação antioxidante (DPPH).	57
Figura 19	Ficha sensorial para avaliação do pão de forma com farinha mista de trigo e chia, aromatizado com óleo de orégano.	63

Figura 20	Cabines para provadores em análise sensorial	63
Figura 21	Cabines para provadores em análise sensorial	65
Figura 22	Efeito da fibra utilizada (PDMS, PDMS-DVB, PDMS-CAR, PA) na extração dos principais compostos identificados por HS-SPME da folha de orégano desidratado por SPME (a-b).	70
Figura 23	Efeito da temperatura na extração nos principais compostos identificados no headspace da folha de orégano desidratado por SPME, utilizando a fibra PDMS-DVB por 40 min.	72
Figura 24	Efeito do tempo de extração nos principais compostos identificados no headspace da folha de orégano desidratado por SPME, utilizando a fibra PDMS-DVB a 80 ºC.	74
Figura 25	Áreas do pico relativo dos principais compostos identificados no headspace da folha de orégano desidratado por SPME, utilizando a fibra PDMS-DVB, com a temperatura inicial de 80 °C/20 min e, temperatura final de 40 °C/20 min.	75
Figura 26	Fotomicrografias MEV da glândulas secretoras de óleo essencial das folhas de orégano desidratadas a 40 ºC por 24 h (a-c)	78
Figura 27	Fotomicrografias MEV das glândulas secretoras de óleo essencial das folhas de orégano.	79
Figura 28	Cromatograma de íons totais (obtidos através da análise de CG-EM) de óleo essencial de orégano extraído por hidrodestilação (2h) (a) e EFS (50 ºC/ 120 bar / 2h) (b), considerando similaridade superior a 90%.	80
Figura 29	Cromatograma de íons totais (obtidos por GC-MS). Análise dos padrões de timol e carvacrol (Sigma- Aldrich).	82
Figura 30	Perfil de extração de timol em função do tempo, por EFS da folha de orégano (*O. vulgare* L.) a 50 °C, fluxo de CO_2 de 20-30 L/h em diferentes pressões (120, 140 e 160 bar).	86
Figura 31	Atividade antioxidante (método DPPH) de compostos antioxidantes. IC_{50} (mg/ml) (valores menores indicam	89

	capacidade antioxidante mais poderoso). OE significa óleo essencial de orégano.	
Figura 32	Curvas de TG, DTG e DTA do orégano desidratado.	91
Figura 33	Curvas de TG, DTG e DTA do óleo essencial obtido por extração com Soxhlet com etanol por 4 h.	92
Figura 34	Curvas de TG, DTG e DTA do óleo essencial obtido por extração com Soxhlet com etanol por 6 h.	93
Figura 35	Curvas sobrepostas as TG do orégano tratado termicamente e do óleo essencial obtido por extração com Soxhlet com etanol por 4 e 6 h.	94
Figura 36	Curvas de TG, DTG e DTA do antioxidante sintético BHT.	94
Figura 37	Curvas de TG, DTG e DTA do ácido ascórbico.	95
Figura 38	Sobreposição das curvas de TG do óleo essencial do orégano (obtido por extração com Soxhlet com etanol por 6 h), do BHT e do ácido ascórbico.	96
Figura 39	Curvas de TG, DTG e DTA do timol.	96
Figura 40	Curvas de TG, DTG e DTA do carvacrol.	97
Figura 41	Propriedades antimicrobianas de óleo essencial de orégano obtido por diferentes métodos de extração e seus comparativos (óleo padrão/Sigma-Aldrich, carvacrol, timol, ácido sórbico, ácido benzoico e propionato de cálcio) contra seis diferentes micro-organismos usando o método de difusão em disco.	100
Figura 42	Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica de *A. niger* , inoculado em ABD, a 30 ºC por 96 h.	103
Figura 43	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. niger*, inoculado a 30 ºC por 96 h.	103
Figura 44	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. niger*, inoculado a 30 ºC por 96 h.	104
Figura 45	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. niger*, inoculado a 30 ºC por 96 h.	105
Figura 46	Intenção de compra dos pães com farinha mista de chia e trigo (FMCT) sem e com óleo essencial de orégano (OEO).	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fontes endógenas e exógenas de radicais livres.	13
Tabela 2	Composição química (%) aproximada (peso seco) de orégano.	25
Tabela 3	Classificação dos membros do gênero *Origanum* segundo a quantidade total de óleo essencial produzido por planta.	25
Tabela 4	Caracterização dos membros do gênero *Origanum* segundo os compostos de maior ocorrência na composição de seus óleos essenciais.	26
Tabela 5	Fibras comerciais e especificações	32
Tabela 6	Condições críticas para substâncias mais utilizadas na EFS.	41
Tabela 7	Propriedades físicas associadas aos diferentes estados do fluido.	42
Tabela 8	Especificação dos parâmetros das equações de estado.	46
Tabela 9	Ingredientes utilizados na formulação de pão de forma de farinha mista de trigo e chia	61
Tabela 10	Dados utilizados para cálculo do diâmetro médio das folhas secas de orégano (diâmetro médio de Sauter)	66
Tabela 11	Composição química da folha desidratada de *Origanum vulgare* L. (obtida por HS_SPME/CG-MS)	67
Tabela 12	Rendimento em óleo essencial de orégano dos extratos obtidos por hidrodestilação e por Soxhlet com etanol.	76
Tabela 13	Composição relativa (% FID) de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., obtidos por diferentes métodos de extração.	81
Tabela 14	Concentração de timol, carvacrol e sabineno hidratado nos óleos essenciais de orégano.	85
Tabela 15	Perfil de extração de timol em função do tempo, por EFS da folha de orégano (*O. vulgare* L.) a 50 ºC, fluxo de CO_2 de 20-30L/h; em diferentes pressões (120, 140 e 160 bar).	86
Tabela 16	Concentração de fenólicos nos óleos essenciais obtidos pelos diferentes métodos de extração, expressos em mg	87

	BHT/ g orégano desidratado.	
Tabela 17	Atividade antioxidante (IC_{50}) do óleo essencial de orégano, BHT e ácido ascórbico.	89
Tabela 18	Determinação da composição por EDXRF das cinzas obtidas pela Análise térmica do orégano desidratado e dos óleos essenciais de orégano obtidos por Soxhlet com etanol por 4 e 6 h.	98
Tabela 19	Propriedade antimicrobiana de óleo essencial de orégano obtido por diferentes métodos de extração e seus comparativos (conservadores sintéticos e padrões de óleo, carvacrol e timol) contra seis micro-organismos.	99
Tabela 20	Composição centesimal dos pães de forma,	107
Tabela 21	Avaliação da contaminação visual fúngica nos pães de forma incubados a 30 ºC.	107
Tabela 22	Análise sensorial dos pães de forma.	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IDA	Ingestão Diária Aceitável
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
BHT	Butil Hidroxi Tolueno
BHA	Butil Hidroxi Anisol
SPME	Solid Phase Microextraction
EFS	Extração com Fluido Supercrítico
TG	Termogravimetria
DTG	Termogravimetria Derivada
DTA	Análise Térmica Diferencial
DSC	Calorimentria Exploratória Diferencial
MIC	Concentração Inibitória Mínima
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
TBHQ	Tércio Butil Hidroxiquinona
THBP	Tri Hidroxi Butilfenona
PG	Propil galato
AA	Ácido Ascórbico
DHA	Ácido Deidroascórbico
IC_{50}	Concentração para Inibir 50 % de DPPH
DPPH	2,2, Difenil-1-Picrilhidrazila
ISLA	Importadora de Semente para Lavoura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CEAGESP	Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo
RSD	Desvios padrões
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
CWX	Carbowax
CG	Cromatografia Gasosa
HD	Headspace

DVB	Divinilbenzeno
K	Coeficiente de Partição
K_{fm}	Coeficiente de Partição Fibra/ Matriz
K_{hm}	Coeficiente de Partição Headspace/Matriz
K_{fh}	Coeficiente de Partição Fibra/Headspace
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CO_2	Dióxido de Carbono
T_c	Temperatura Crítica
P_c	Pressão Crítica
ρ_c	Densidade Crítica
RK	Redlich-Kwong
SRK	Soave-Redlich-Kwong
PR	Peng Robson
w	Fator Acêntrico
PTFE	Politetrafluoretileno
FID	Detector de Ionização em Chama
MS	Espectrômetro de Massas
RRF	Relative Response Factor
IK	Índice de Kovats
$t_{(Rz+1)}$	Tempo de Retenção do n-alcano imediatamente após o padrão alcano
t_{Rx}	Tempo de Retenção da amostra
t_{Rz}	Tempo de Retenção do n-alcano localizado antes do padrão avaliado
ABD	Ágar Batata Dextrose
BHI	Infusão Cérebro de Coração
UFC	Unidade Formadora de Colônia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
CAR	Carboxen
OE	Óleo Essencial
LPS	Lipopolissacarídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS 4

3.1.1 **Composição Química** 5

3.1.2 **Fatores que influenciam o rendimento e perfil químico dos óleos essenciais** 7

3.1.3 **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais** 9

3.1.4 **Estudos clínicos com óleo essencial** 12

3.1.5 **Aplicação e comercialização dos óleos essenciais** 14

3.2 ANTIOXIDANTES 16

3.2.1 **Antioxidantes sintéticos** 17

3.2.2 **Antioxidantes naturais** 19

3.2.3 **Compostos fenólicos** 20

3.3 ORÉGANO 22

3.3.1 **Produção e mercado brasileiro** 27

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 28

3.4.1 **Microextração em fase solida (SPME)** 29

3.4.2 **Extração com solventes orgânicos** 33

3.4.3 **Destilação a vapor** 36

3.4.3.1 Hidrodestilação 37

3.4.4 **Fluido supercrítico** 38

3.4.4.1 Extração com fluido supercrítico 42

3.5 ASPECTOS TERMODINÂMICOS 44

4 MATERIAIS E MÉTODOS 47

4.1 MATERIAL 47

4.1.1 **Determinação do diâmetro médio das folhas do orégano seco** 48

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 48

4.2.1 **Microextração em fase sólida (SPME)** 48

4.2.2 **Hidrodestilação** 49
4.2.3 **Destilação com extrator Soxhlet** 50
4.2.4 **Extração com fluido supercrítica** 50
4.2.4.1 Determinação da Densidade do CO_2 Supercrítico 52
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE 52
4.3.1 **Análise das glândulas secretoras do óleo essencial de orégano por MEV** 52
4.3.2 **Análises por cromatografia gasosa** 53
4.3.3 **Análise quantitativa de timol, carvacrol e sabineno hidratado nos óleos essenciais obtidos.** 54
4.3.4 **Cinética de extração de timol por EFS** 55
4.3.5 **Determinação de compostos fenólicos totais** 55
8.3.6 **Determinação da Atividade Antioxidante - Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)** 56
4.3.7 **Análise Térmica** 57
4.3.8 **Análise das Cinzas das Amostras por Fluorescência de Raios X** 58
4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 59
4.3.1 **Atividade antimicrobiana** 59
4.4.2 **Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura (MEV) dos Fungos tratados com óleo essencial e seus comparativos** 60
4.5 APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM ALIMENTO 61
4.5.1 **Seleção de formulação de pães de forma contendo farinha mista de trigo e chia para aplicação de óleo essencial de orégano** 61
4.5.2 **Produção e avaliação do pão de forma à base de farinha mista de trigo e chia e aromatizado com óleo essencial de orégano em panificadora comercial** 62
4.5.3 **Análises físico-químicas do pão de forma - Composição centesimal** 62
4.5.4 **Análises microbiológicas do pão de forma** 62
4.5.5 **Teste de aceitação sensorial e intenção de compra dos pães de forma** 63
4.5.6 **Analises estatísticas** 64

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
5.2 CÁLCULO DO DIÂMETRO MÉDIO DE SAUTER 66
5.2 IDENTIFICAÇÃO POR HS-SPME DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DA FOLHA DE ORÉGANO DESIDRATADA 66
5.2.1 Avaliação das fibras para SPME 67
5.2.2 Otimização da temperatura de extração para o método HS-SPME 71
5.2.3 Otimização do tempo de extração para o método HS-SPME 73
5.2.4 Otimização da temperatura em um mesmo procedimento de extração 74
5.3 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSNCIAL DE ORÉGANO OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 75
5.4 ANÁLISE DAS GLÂNDULAS SECRETORAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO POR MEV. 77
5.5 ANÁLISES CG/FID E GC/MS 80
5.5.1 Composição dos óleos essenciais extraídos por diferentes métodos 80
5.5.2 Análise quantitativa de timol, carvacrol e sabineno hidratado nos óleos essenciais obtidos. 85
5.5.3 Cinética de extração de timol nos óleos essenciais de orégano por EFS. 86
5.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS 87
5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH) 88
5.8 ANÁLISE TÉRMICA 90
5.9 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 98
5.9.1 Avaliação do halo de inibição – difusão em disco. 98
5.9.2 Observações nas mudanças das estruturas dos fungos por MEV 102
5.10 APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM PÃO DE FORMA 106
5.10.1 – Composição Centesimal e avaliação da atividade antifúngica 107
5.10.2 Aceitação sensorial 108

6 CONCLUSÕES 111

TRABALHOS FUTUROS 113

REFERÊNCIAS 114

ANEXO 133

A – PROGRAMA MATLAB 134

1 INTRODUÇÃO

Novas tecnologias para obtenção de compostos bioativos a partir de fontes naturais, tem recebido atenção especial devido à possibilidade de sua aplicação como substitutos de aditivos sintéticos alimentares que são amplamente utilizados na indústria de alimentos. Este fato está relacionado com a crescente consciência dos consumidores com relação à segurança desses aditivos, ao aumento de pesquisas relacionando-os a casos de toxicidade e alergias e, a maior exigência em relação aos níveis permitidos e da ingestão diária aceitável (IDA) por órgãos responsáveis como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO).

Os vegetais apresentam alguns compostos químicos, presentes, em sua maioria, em frutas e hortaliças, que exercem uma elevada atividade biológica, já comprovada por vários pesquisadores. Esses compostos são chamados de compostos bioativos ou fitoquímicos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana, como a diminuição de algumas doenças degenerativas ocasionadas pelo aumento na produção de radicais livres devido ao atual estilo de vida da população (VIJAYA; REDDY, 2010).

Os óleos essenciais apresentam compostos bioativos, como atividade antimicrobiana que vem sendo comprovada, inclusive contra bactérias patogênicas em alimentos como *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (ESPINA et al, 2001).

Esses extratos apresentam em sua composição substâncias com funções antioxidantes, podendo ser aplicadas em substituição dos compostos sintéticos (RIBEIRO; ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL, 2007), como o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroxi-anisol (BHA) amplamente utilizados na indústria de alimentos.

Dentre as diversas espécies de plantas pesquisadas, destaca-se o orégano (*Origanum vulgare L.*). Seu óleo essencial é constituído por uma variedade de componentes químicos, principalmente o carvacrol e o timol, com atividade antimicrobiana comprovada e alta estabilidade (LAMBERT et al, 2001; BAYDAR; SAGDIÇ; OZKAN, 2004).

Geralmente a vida de prateleira de pão é limitada por processos de deterioração, incluindo crescimento de vários fungos, a perda de umidade e endurecimento (NIELSEN; RIOS, 2000). De acordo com Voysey e Legan (1999), em um estudo realizado em produtos de padaria e dos seus ingredientes, 60% de deterioração foi atribuída a fungos (*Penicillium* spp. e *Aspergillus* niger), enquanto que as leveduras foram responsáveis por apenas 15%. Além da visão negativa de crescimento visível, os fungos são responsáveis pelo sabor

estranho, por produção de micotoxinas, bem como compostos alergênicos (NIELSEN; RIOS, 2000). No entanto, embora os fungos sejam destruídos durante o forneamento, pode ocorrer recontaminação durante o resfriamento e empacotamento fazendo com que ocorra a contaminação por fungos após o processamento.

Devido a todas essas características e a necessidade de desenvolver novos produtos naturais usados como fármacos ou na indústria de alimentos, a determinação de um método de extração adequado que permita a obtenção do seu óleo essencial, sem que ocorra alteração de suas propriedades, vem sendo amplamente discutida. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar a matriz orégano e seus diferentes óleos obtidos por diferentes métodos de extração. Também se estudou a atividade antioxidante e antimicrobiana destes óleos e sua aplicação em produto alimentício através da produção de pão de forma contendo farinha mista de trigo e chia. O óleo essencial foi usado como uma alternativa de substituição de conservadores sintéticos especialmente propionato de cálcio, buscando-se um aumento da vida de prateleira deste produto aromatizado.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a identificação e caracterização dos extratos de orégano obtidos por diferentes métodos de extração, bem como a avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana desses extratos e sua aplicação na Indústria de Alimentos.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar as melhores condições de extração de possíveis compostos bioativos presentes no orégano (*Origanum vulgare* L.) desidratado, extraído por microextração em fase sólida (SPME – *solid phase microextraction*);
- Identificar e quantificar os compostos ativos por CG (cromatografia gasosa), extraídos do óleo essencial de orégano obtidos pelos métodos de extração: extração com fluido supercrítico (EFS), hidrodestilação e Soxhlet com solventes orgânicos (etanol e hexano);
- Avaliar a cinética de extração do composto timol, do óleo essencial de orégano obtido, nas pressões de 120, 140 e 160 bar; por EFS por até 2 h;
- Avaliar e comparar a atividade antioxidante dos extratos obtidos por diferentes métodos de extração;
- Comparar as atividades antioxidantes dos compostos bioativos (timol e carvacrol) aos aditivos antioxidantes convencionais e sintéticos (acido ascórbico e BHT) através da avaliação de compostos fenólicos e da atividade sequestrante do radical DPPH;
- Avaliar através da análise térmica (TG/DTG e DTA) a estabilidade dos óleos essenciais;
- Comparar as análises TG dos óleos extraídos e dos antioxidantes sintéticos;
- Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana entre os extratos de orégano obtidos com os conservadores sintéticos (propionato de cálcio, ácido benzoico e ácido sórbico) e padrões de carvacrol, timol, sabineno hidratado e óleo essencial de orégano padrão;
- Aplicar os óleos essenciais em pão de forma para avaliação da atividade antimicrobiana;
- Avaliar a aceitação sensorial e intenção de compra do produto contendo óleo essencial de orégano.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Segundo a Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, os óleos essenciais são considerados um tipo de aromatizante natural.

> "São produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos" (BRASIL, 2007).

A designação de "óleo" é devida a algumas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes, como, por exemplo, soja, mamona e girassol (SIMÕES et al, 2000).

A oleoresina é produzida por extração da mesma planta com um solvente orgânico apropriado (SMITH et al, 2005).

Originam do metabolismo secundário das plantas (GONÇALVES et al, 2003) que constituem os elementos essenciais contidos em muitos órgãos vegetais, normalmente concentrados na casca, caule, flores, folhas, frutos, rizomas e sementes, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (SIQUI et al, 2000).

São normalmente armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular das folhas. Sua biossíntese ocorre normalmente em estruturas chamadas tricomas glandulares (LEVIN, 1973 apud JAKIEMIU, 2008).

Apresentam-se como líquidos viscosos e podem ou não exalar odor (BELL; CHARWOOD, 1980; SARTORATTO et al, 2004). São chamados de essenciais devido ao aroma agradável e intenso de grande parte de seus constituintes.

De acordo com Bakkali e outros (2008), os óleos essenciais são misturas complexas naturais que podem conter cerca de 20-60 componentes em concentrações muito diferentes. São caracterizados por dois ou três grandes componentes em concentrações elevadas (20-70%). Por exemplo, carvacrol (30%) e timol (27%) são os principais componentes do óleo

essencial de *Origanum compactum*; linalol (68%) do óleo essencial de *Coriandrum sativum* (coentro); α e β-tujeno (57%) e cânfora (24%) do óleo essencial de *Artemisia herba-alba* (erva do fogo); 1,8-cineol (50%) do óleo essencial de *Cinnamomum camphora*; limoneno (37%) do óleo essencial das sementes de *Anethum graveolens* (endro); mentol (59%) e mentona (19%) do óleo essencial de *Mentha piperita*. Geralmente, esses principais componentes determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais.

3.1.1 **Composição Química**

Os óleos essenciais possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos, terpenóides (isopropanóides), aromáticos e constituintes alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (GONÇALVES et al, 2003; BAKKALI et al, 2008).

Terpenos formam o maior grupo de produtos vegetais naturais, compreendendo pelo menos 30 mil compostos (CONNOLLY; HILL, 1991) e contém a maior variedade de tipos estruturais. Têm recebido atenção crescente devido às propriedades relacionadas com a prevenção de doenças, atividade como inseticidas naturais e agentes antimicrobianos (CARVALHO; FONSECA, 2006).

Os terpenos são formados por combinações de várias bases de carbono-5 (C5) e formam diferentes classes estruturais e funcionais. Sua biossíntese consiste na síntese de precursores difosfato isopentanil (IPP), com repetitiva adição dos IPPs para formar o precursor fenildifosfato de várias classes de terpenos. A modificação do fenildifosfato alílico pela síntese específica de terpeno ocorre para formar o esqueleto do terpeno e, posteriormente, ocorre à modificação enzimática secundária (reação redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais dos diferentes terpenos (BAKKALI et al, 2008).

Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15); mas hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) completam os terpenos.

Os monoterpenos são formados pelo conjunto de duas unidades de isopreno (C10). Eles são as moléculas mais representativas, constituindo 90% dos óleos essenciais e permitem uma grande variedade de estruturas. Além de apresentar variadas funções (SIMÕES et al, 2003).

Os sesquiterpenos são formados a partir do conjunto de três unidades de isopreno (C15). A extensão da cadeia aumenta o número de ciclisações que permite uma grande

variedade de estruturas. A estrutura e a função dos sesquiterpenos são semelhantes aos dos monoterpenos. As estruturas químicas desses grupos são apresentadas na Figura 1.

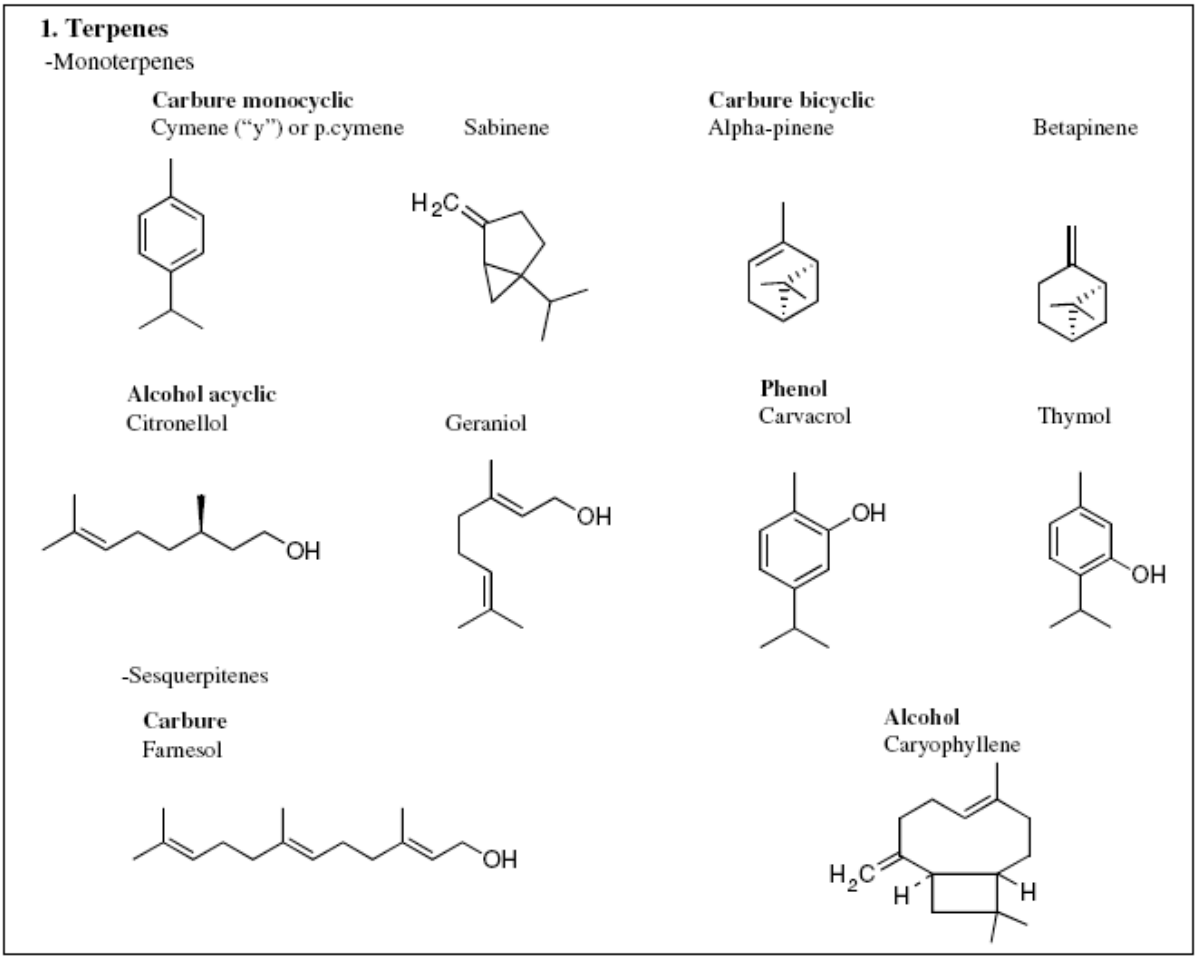


Figura 1 - Estruturas químicas dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) de óleos essenciais. Fonte: BAKKALI e outros (2008).

Compostos aromáticos são derivados de fenilpropano, e ocorrem com menor frequencia do que os terpenos (BAKKALI et al, 2008).

Os terpenóides são os terpenos que contêm oxigênio (OLIVEIRA; RODRIGUES; BERNARDO-GIL, 2003). As estruturas químicas desses grupos são apresentadas na Figura 2.

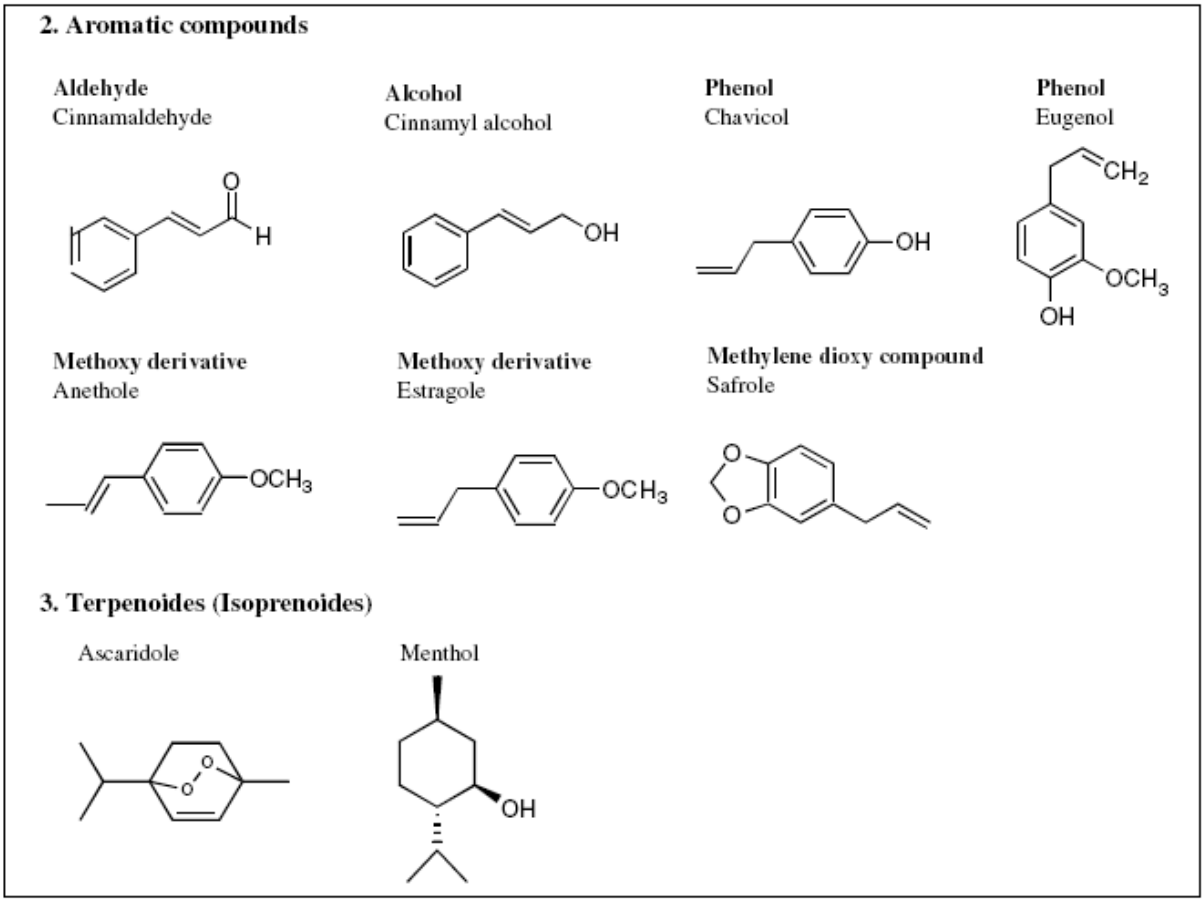


Figura 2 - Estruturas químicas dos compostos aromáticos e terpenóides (isopropenos) de óleos essenciais. Fonte: Bakkali e outros (2008).

As principais fontes vegetais para estes compostos são anis, canela, cravo, erva-doce, noz moscada, salsa, sassafrás, anis estrelado, estragão, e algumas famílias botânicas (*Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae*). Nitrogenados ou componentes sulfurados como glucosinolatos ou derivados de isotiocianato (óleos de alho e mostarda) também são característicos como metabólitos secundários de plantas diversas ou de produtos torrefeitos, grelhado ou assados (BAKKALI et al, 2008).

3.1.2 **Fatores que influenciam o rendimento e perfil químico dos óleos essenciais**

De acordo com Simões e outros (2000), fatores como a localização geográfica, época da coleta, forma de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, período e condições de armazenamento podem influenciar o rendimento em extrato e o perfil químico de óleos essenciais/extratos de plantas.

Rajeswara Rao (1999) relatou que a época do plantio de hortelã brava (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens* Malinvaud *ex* Holmes) influencia no rendimento da biomassa e do óleo essencial desta planta. O total de biomassa e rendimento de óleo essencial do hortelã plantado no mês de agosto (estação chuvosa) foi superior aos meses de dezembro e janeiro (inverno no hemisfério Norte).

Jerković, Mastelić e Miloš (2001), relataram que a extração de óleo essencial de orégano (*O. vulgare* L.) por hidrodestilação apresentou rendimento em óleo variando de 0,31 a 2,33 % p/p de acordo com época de colheita da planta. De acordo com os autores, o rendimento em óleo essencial diminui após a floração devido ao tecido da planta ainda apresentar-se na senescência, ocasionando a decomposição dos compostos fenólicos, podendo impedir danos causados pelo estresse e agindo como antioxidantes naturais (RUSSO et al, 1998).

Em relação à forma de cultivo, Taarit e outros (2010), comprovaram que o cultivo hidropônico de sálvia (*Salvia officinalis* L.) com aplicação de diferentes concentrações de NaCl, pode apresentar diferenças no rendimento no óleo essencial extraído por hidrodestilação, além de influenciar no perfil químico deste extrato. Com a utilização de 75 mM de NaCl, o rendimento teve um aumento máximo de três vezes em relação ao controle sem adição de sal, mas a 100 mM o rendimento diminuiu, mostrando que este efeito é dosedependente. Além disso, os autores relacionam o aumento na concentração de α-tujeno com o aumento na concentração de NaCl utilizada (100 mM) com ao aumento da atividade relacionada com a síntese de enzimas.

Segundo Charles, Joly e Simon (1990), a redução do crescimento induzido pelo estresse osmótico pode ter resultado em um novo padrão de partilha de disponibilização de cadeias de carbono adicionais para a biossíntese de terpenos. Essa hipótese é apoiada por Loomis (1932), sugerindo um espaço competitivo para a fotossíntese entre os processos de crescimento e do metabolismo secundário.

A composição do óleo essencial pode variar também de acordo com a parte utilizada da planta. Por exemplo, o óleo essencial de *Artemisia scoparia* (absinto) a partir dos resíduos (plantas secas que permanecem no campo) apresenta baixa concentração de eugenol e β-mirceno (SINGH et al, 2009), diferentemente do óleo das partes aéreas das plantas, que são ricos em metil eugenol (BASHER et al, 1997) ou β-mirceno (SINGH et al, 2008).

A mudança na composição do óleo essencial comercial de limão comercializado na Inglaterra para aromaterapia foi estudada em quatro diferentes condições de armazenamento por Sawamura e outros (2004). As alterações qualitativas e quantitativas no conteúdo de

hidrocarbonetos monoterpenos foram maiores nas amostras estocadas a 25°C do que a 5°C, ambas com a tampa aberta por 3 min todos os dias. Em ambas as condições, β-pineno, limoneno, γ-terpineno e p-cimeno mudou notavelmente durante o armazenamento. A proporção de hidrocarbonetos na amostra estocada a 5°C com exposição de 3 min por dia sofreu maior mudança do que as amostras estocadas com menor tempo de exposição de 3 min por mês, a 5 e 25 °C. Isso demonstra que mudanças na composição do óleo essencial de limão será acelerada pela temperatura e pelo contato com a atmosfera.

Os mesmos autores relatam que o fator aeróbio apresenta maior efeito sobre a mudança de composição (limoneno, p-cimeno, β-pimeno e γ-terpineno) do óleo essencial de limão do que a temperatura.

O nível de p-cimeno da degradação de α e β-cimeno e, γ-terpineno em óleo essencial de limão (*Citrus aurantifolia*) é usado como um indicador do envelhecimento das amostras pelas empresas que comercializam este produto. Do ponto de vista das propriedades funcionais da planta, há um aumento na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais oxidados de coníferas, que está correlacionado com um aumento da concentração de monoterpenos oxidados, como carvona e carveol (TAMMELA et al, 2003).

A caracterização dos óleos essenciais envolve além de sua composição, uma série de parâmetros físicos incluindo a temperatura de fusão e ebulição entre outros. A determinação desses parâmetros não é sempre fácil e depende da técnica empregada.

A cromatografia gasosa (CG) é usualmente utilizada para determinação da composição dos óleos essenciais e o desenvolvimento desta metodologia tem sido estudado e aplicado em muitas pesquisas na área (KAWASE et al, 2011; SANTOS et al, 2009).

A análise térmica é um conjunto de técnicas (TG – termogravimetria, DTG - termogravimetria derivada, DTA - análise térmica diferencial, DSC – calorimentria exploratória diferencial e outros) que pode ser utilizada para mensurar e caracterizar as propriedades térmicas dos materiais. Permite medir mudanças de uma propriedade química ou física de uma substância, ou de um material em função da temperatura ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura (KAWASE; MOTHÉ, COELHO, 2012; MOTHÉ; AZEVEDO, 2002).

3.1.3 **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais**

A indústria de alimentos exige um planejamento de tratamentos de conservação de alimentos capaz de assegurar a inativação microbiana, sendo o calor ainda o principal método

de conservação de alimentos. Entretanto, a intensidade de calor necessária para garantir a segurança alimentar e aumentar a vida útil causam alterações indesejáveis nas propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (PFLUG; GOULD, 2000 apud ESPINA et al, 2001).

Portanto, pesquisadores estão propondo a utilização de tratamentos térmicos mais suaves, em combinação com outras barreiras naturais, tais como substâncias antimicrobianas, de preferência de origem natural (MAÑAS; PAGÁN, 2005) ou a utilização apenas desses antimicrobianos naturais em alimentos, como também em conjunto com aditivos conservadores (GOVARIS et al, 2010)

Tem sido verificado cientificamente que aproximadamente 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992).

A versátil composição dos óleos essenciais de plantas e o amplo espectro antimicrobiano, associados à sua baixa toxicidade, tornam-os potenciais agentes naturais para aplicação na conservação de alimentos (CONNER, 1993 apud SANDRI et al, 2007).

Em geral, a atividade antimicrobiana dos diferentes óleos essenciais de vegetais é mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas que contra bactérias Gram-negativas, fato já observado com óleos essenciais de outras espécies vegetais (SANDRI et al, 2007; NOSTRO et al, 2000; OUATTARA et al, 1997). Esta elevada resistência entre as bactérias Gram-negativas foi atribuída à presença da membrana fosfolipídica exterior quase impermeável a compostos lipofílicos (NIKAIDO; VAARA, 1985). A ausência dessa barreira nas bactérias Gram-positivas permite o contato direto dos componentes hidrofóbicos do óleo essencial com a bicamada fosfolipídica da membrana celular, onde provocam seus efeitos, seja causando um aumento da permeabilidade do íon e vazamento de constituintes intracelulares ou, afetando os sistemas de enzimas bacterianas (COWAN, 1999; WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

A atividade antimicrobiana de *Salvia officinalis* foi reconhecida a décadas (JALSENJAK; PELJNAJK; KUSTRAK, 1987), e foi atribuída à presença de 1,8-cineol e ao tujeno e cânfora (SUR et al, 1991). O óleo essencial da *Salvia triloba* coletados na Grécia também se caracteriza por elevadas concentrações de 1,8-cineol, tujeno e cânfora, com atividade antimicrobiana comprovada (SIVROPOULOU et al,1997).

De acordo com Tepe e outros (2005), o óleo essencial de *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae) coletadas na Turquia, apresentou atividade contra o patógeno alimentar anaeróbio *Clostridium perfringens*, no método de difusão em disco e nas medidas de MIC (concentração inibitória mínima), com o menor valor de MIC (0,54 mg/ml). *Streptococcus pneumoniae*, outra bactéria gram-positiva, apresentou sensibilidade em relação ao óleo

essencial de *Salvia tomentosa* Miller, com um valor de MIC de 2,25 mg/mL. Nenhuma atividade foi observada contra três micro-organismos patogênicos Gram-negativos (*Escherichia coli, Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais comerciais de frutas cítricas como laranja, limão e tangerina, contra *E. coli* O157: H7 e células de *L. monocytogenes* em pH 7,0; isoladamente e combinado com tratamento térmico, foi avaliada por Espina et al (2001). Os autores verificaram uma maior eficácia quando os óleos foram combinados com tratamento térmico brando, mostrando o sinergismo com elevado efeito letal, inativando mais de 5 ciclos log de *E. coli* O157: H7.

Oussalah e outros (2007) relatam as atividades antimicrobianas de 28 diferentes tipos de óleos essenciais contra *Escherichia coli* 157-H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os autores descrevem os principais compostos relacionados com atividade antimicrobiana dos óleos e comparam a sensibilidade dos patogênicos estudados em relação aos óleos avaliados.

Em relação aos fungos, diferentes autores relatam a variedade de metodologias utilizadas para avaliar a atividade dos óleos essenciais contra esse tipo de micro-organismo (HOLLEY; PATEL, 2005; TULLIO et al, 2007). Os fungos são dificilmente inibidos devido sua complexa estrutura. Eles se reproduzem através de esporos e dessa forma crescem na forma de filamentos multicelulares chamados de hifa. As redes interconectadas das hifas formam o micélio e suporta o conidiosporo fértil que contem os esporos que podem ser propagados (SAMSON et al, 2010).

Um dos fungos mais comuns são do do gênero *Aspergillus*, que é um patógeno de plantas, animais e humanos que produzem aflatoxina, um carcinogênico potente que podem causar intoxicações crônicas após a ingestão de alimentos contaminados (RIBA et al, 2010). *Aspergillus niger*, é considerado o mais importante membro de *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Nigri*, é o fungo patogêncio responsável pela deterioração de alimentos e matérias primas estocadas (SAMSON et al, 2000).

Mudanças celulares desses micro-organismos ocasionados pelo óleo essencial podem ser estudadas com microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV). E, apesar desta técnica não promover a explicação química necessária da forma de atuação para as mudanças ocasionadas nas amostras, é uma forma complementar de se observar claramente a perda da integridade das paredes celulares (OUSSALAH et al, 2007).

Manso e outros (2013) relatam a atividade antimicrobiana de óleo essencial de canela contra *Aspergillus flavus* em embalagens para alimentos.

Tolouee e outros (2010) relatam a atuação de óleo essencial de camomila contra *Aspergillus niger*. Os autores descrevem a deterioração morfológica ocasionada por este óleo essencial nas hifas desse fungo filamentoso.

3.1.4 **Estudos clínicos com óleo essencial**

Estudo clínico é "qualquer investigação em seres humanos, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos de produto(s) e/ou identificar reações adversas ao produto(s) em investigação, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia" (EMEA, 1997 apud ANVISA).

Dentre as fases do estudo clínico está à fase pré-clínica, que é a aplicação de nova molécula em animais, depois de identificada em experimentações in vitro como tendo potencial terapêutico (ANVISA). A maior parte dos estudos relacionados com óleo essencial em estudos clínicos engloba esta fase.

No óleo essencial de lavanda ensaios clínicos demonstraram uma melhoria na qualidade do sono (GRAHAM et al, 2003) e uma redução da ansiedade (DUNN; SLEEP; COLLETT, 1995). Além disso, em estudos com animais, tem sido provado a atividade anticonvulsivante (YAMADA et al, 1994) e atividade anestésica local (GHELARDINI et al, 1999).

Barocelli e outros (2004) avaliaram o óleo essencial de *Lavandula hybrida Reverchon*. Os resultados deste estudo revelam uma notável atividade analgésica e gastroprotetora do óleo de lavanda. A administração oral de óleo de lavanda (100 mg/kg) não prolongou o tempo de latência (teste seletivo para analgésicos) em comparação com os controles em camundongos, utilizando o teste da placa quente. Por outro lado, a inalação de óleo de lavanda produziu uma inibição da resposta a placa proporcional ao tempo de exposição a vapores de óleo, resultando em um atraso significativo no tempo de reação após a inalação de 60 minutos. Isso mostra a eficácia da inalação do óleo no controle a dor térmica, sem evidências de efeitos adversos centrais, evidenciando o interesse pelo potencial de aplicação de óleo essencial de lavanda em aromaterapia.

Os mesmos autores evidenciaram a prevenção da lesão gástrica aguda (induzida por etanol) pelo óleo de lavanda, com administração oral (100 mg/kg). A redução foi de uma área total lesionada de 89% em comparação com controle.

Estudos recentes indicam que o estilo de vida atual da população vem causando um aumento na produção de radicais livres e compostos oxidados. Estes estudos sugerem que um

aumento no consumo de produtos naturais com compostos antioxidantes diminui o risco de algumas doenças degenerativas, desencadeadas muitas vezes pelo estímulo exagerado na produção de radicais livres, que podem suplantar as defesas naturais do organismo (VIJAYA; REDDY, 2010).

As doenças relacionadas com a geração de radicais livres podem ser citadas como: artrite, arterosclerose, diabetes, catarata, esclerose múltipla, disfunção cerebral, cardiopatias, enfisema, envelhecimento e câncer (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contém um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Atualmente, estas moléculas são também conhecidas por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A configuração química destas moléculas as torna altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e são quimicamente muito reativas. Esses radicais são encontrados em todos os sistemas biológicos, podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU; ANDERSON, 1997). A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de óxido-redução, provocando ou resultando essas reações. Podem ceder elétron e serem oxidados; ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (POMPELLA, 1997).

Os radicais livres podem ser gerados por fontes endógenas que normalmente ocorrem no organismo ou por fontes exógenas (Tabela 1).

Tabela 1 – Fontes endógenas e exógenas de radicais livres.

Endógenas	**Exógenas**
Respiração aeróbia	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxissomas	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta
	Cigarro

3.1.5 **Aplicação e comercialização dos óleos essenciais**

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de antissépticos tópicos, sedativos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos e analgésicos (CRAVEIRO, 1981; COX et al, 2000). Para confirmação das propriedades dos óleos essenciais diversas pesquisas científicas vêm sendo realizadas.

Além de suas aplicações na indústria farmacêutica pelas suas propriedades biológicas, os óleos essenciais vêm sendo utilizados para conferir aromas especiais a diversos produtos alimentícios e de perfumaria (fragrâncias e pós-barba) (COWAN, 1999; BURT, 2004).

De acordo com Bakkali e outros (2008), cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importante, especialmente para as indústrias farmacêuticas, indústrias agronômica, alimentação, sanitários, cosméticos e perfumes.

Nos óleos essenciais, complexos aromatizantes naturais são normalmente encontrados. Esses complexos são principalmente misturas de substâncias químicas de baixo peso molecular separados das plantas por meios físicos, como a destilação, extração e prensagem a frio. Estes complexos são preparados de fontes alimentares e não alimentares. Cerca de mais de 100 óleos essenciais utilizados como aromatizantes em alimentos são derivados diretamente dos alimentos (como óleo de limão, azeite de manjericão e óleo de cardamomo); os complexos extraídos de plantas não consumidos habitualmente como alimento (por exemplo, óleo de folha de cedro ou bálsamo) são bem menos empregados.

A famosa utilização destes óleos em aromaterapia compõe pouco mais que 2% do mercado total (INOUYE; TAKIZAWA; YAMAGUSHI, 2003) e a utilização destas substâncias tornam o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos. Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservadores naturais presentes nos condimentos (BARA, 1992).

Com poucas exceções, as plantas são dependentes de seu teor de óleo essencial para o seu perfil aromático e do paladar. Por isso, acetato, cânfora e outros componentes voláteis do óleo de alecrim fornecem um intenso sabor no óleo produzido da massa seca. As poucas exceções (pimenta vermelha, pimenta preta, gengibre, pimentão, sementes de gergelim), compreendem as plantas que contenham os principais componentes de sabor não volátil (por

exemplo, o gingerol no gengibre). Estes compostos não voláteis são muitas vezes maiores em peso molecular, substâncias hidrofílicas contidas no óleo ou na oleoresina (SMITH et al, 2005).

Rodilla e outros (2011) empregaram diferentes métodos para diferenciar os sesquiterpenos do óleo essencial de “palo santo” (*Bulnesia sarmientoi*). Relatam que para a aplicação de misturas naturais, como agroquímicos de baixo risco, é importante que o óleo essencial que se destina a ser registrado, seja definido corretamente e com suficiente flexibilidade para garantir a cobertura de todas as qualidades avaliadas, bem como a prorrogação da validade do registro, tendo em conta a possibilidade de variação natural no futuro. Informações sobre a composição química e da identidade dos componentes do óleo essencial deve ser obtida. Isso por si só significa conhecer não apenas a adequada e coerente coleta e interpretação de dados sobre os componentes ativos, mas também a relevância dos outros componentes e os níveis encontrados no óleo essencial.

A empresa amerciana “Young living”, comercializa óleos essenciais destilados a partir de plantas, flores, árvores e ervas como aromaterapia. Essas matrizes são de diferentes países. Por exemplo, o óleo essencial de copaíba é retirado de árvores do Brasil. Segundo a empresa, os óleos não são diluídos com aditivos químicos e sintéticos sendo cuidadosamente preparados para manter a integridade da planta, com cuidados que vão desde a escolha das sementes como o envase automatizado em vidros ambar. Esses óleos essenciais são terapêuticos e trazem benefícios positivos para o organismo através do cheiro, absorção direta na pele, e pelo processo digestivo normal. Podem equilibrar o humor e reduzir os sintomas de estresse.

Outras aplicações e comercialização de óleos essenciais que são amplamente usados em diferentes produtos comerciais podem ser citadas: como inibidor de brotamento em batatas, fabricado na Holanda (Talent ®) (HARTMANS et al, 1995); uma série de repelentes de insetos (CARSON; RILEY, 1993) e; alguns conservadores para alimentos como por exemplo o “DMC Base Natural” produzido na Espanha pela DOMCA S.A. que inclui 50% de óleos voláteis de alecrim, sálvia e cítricos e 50% de glicerol (MENDONZA-YEPES et al, 1997).

Outra empresa americana, “Kemin”, representa um exemplo de aplicação comercial de antioxidantes naturais em fármacos e alimentos. Esta empresa é especializada em antioxidantes naturais e sintéticos e produz uma linha de antioxidantes naturais em extrato de alecrim desodorizado que pode ser usada em produtos cárneos (ROCHA, 2008).

A utilização de filmes e revestimentos como transportadores de substâncias ativas tem sido sugerida como uma aplicação promissora na área de embalagem de alimentos. Diversos trabalhos relatam a utilização de óleo essencial em filmes e revestimentos para alimentos, com avaliação antimicrobiana e antioxidante, além das caracterizações dos filmes utilizados. Como exemplos podem ser citados a aplicação dos óleos essenciais de alho e alecrim aplicados em filmes comestíveis a base de proteína (SEYDIM; SARIKUS, 2006); de óleo essencial de canela e gengibre em filme comestível de caseinato de sódio (ATARÉS; BONILLA; CHIRAL; 2010); dos óleos essenciais de tomilho ou de orégano do revestimento de soja para aplicação em carne moída (EMIROĞLU et al, 2010); dos óleos essenciais de cravo, erva-doce, lavanda, tomilho, erva-da-cruz, pinho ou alecrim em filmes biodegradáveis de quitosana e gelatina com aplicação em peixes frescos (GÓMEZ-ESTACA et al, 2010).

Na área de panificação, são encontrados trabalhos relacionados com aplicação em embalagens, como aplicação de óleo essencial de cravo e canela, que apresentaram atividade antimicrobiana para os fungos *Penicillium commune*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger* (NIELSEN; RIOS, 2000).

O consumo de alimentos contendo óleos essenciais naturais ou extratos vegetais aromáticos pode evitar o risco de muitas doenças causadas por radicais livres (MILAN, 2006; YOUNG; WOODSIDE, 2001). Entretanto, as plantas em estudo, como as aromaticas, em geral não têm recebido muita atenção como antioxidante e fonte de aromas, pois devido ao seu baixo rendimento apresenta pouco aplicabilidade comercial (SOONG; BARLOW, 2004; ZRIRA; ELAMRANI; BENJILALI, 2003).

3.2 ANTIOXIDANTES

Para se evitar os processos oxidativos podem ser utilizadas modificações em condições ambientais ou uso de substâncias antioxidantes com propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (ALLEN; HAMILTON, 1983).

Os antioxidantes inibem a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biossistemas complexos; podendo envolver a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação ou, abrangendo a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990).

A aplicação de antioxidantes em alimentos é importante para proteção de seus constituintes insaturados, principalmente os óleos, embora outros componentes como as

vitaminas necessitem também de proteção. Assim, odores e sabores indesejáveis resultantes da rancidez oxidativa são evitados, mantendo a aceitação do consumidor bem como o valor nutricional dos alimentos, eliminando perdas ocasionadas pela rancificação.

A eficiência dos antioxidantes depende da qualidade do produto, por isso é importante que sejam obtidos de matéria-prima de boa qualidade, sejam armazenados adequadamentes e que não se encontrem em estado de deterioração. Óleos e gorduras oxidadas não serão revertidos pela adição de antioxidantes. Podem ser citadas como alterações químicas no alimento, provocadas pela oxidação de lipídeos a diminuição do valor nutricional, a oxidação de proteínas, alteração do "flavor", descoloração e produção de compostos tóxicos (ARAÚJO, 1998).

Alimentos vegetais fornecem uma vasta variedade de antioxidantes, como as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides e outros compostos fenólicos. Devido à complexidade da composição de antioxidantes nos alimentos, o estudo desses compostos tem um valor limitado devido à possibilidade das interações sinergísticas desses compostos na matriz alimentar que não é considerada. Isso explica por que a capacidade antioxidante é atrativa e mais interessante no estudo das propriedades antioxidantes dos alimentos e dietas (SERRANO; GOÑI; SAURA-CALIXTO, 2007).

Muitas pesquisas sobre atividade antioxidante de óleos essenciais frequentemente usam termos como: o sinergismo, o antagonismo e a aditivação; que raramente apresentam suporte experimental, mas torna-se útil para explicar a atividade biológica observada (TOMAINO et al, 2005).

3.2.1 **Antioxidantes sintéticos**

Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é inibida por seqüestradores de radicais livres. A oxidação lipídica em produtos alimentícios está correlacionada com sua deterioração e consequentemente com sua qualidade. Essa reação provoca a perda de ácidos graxos essenciais, sendo que alguns produtos resultantes dessas reações são potencialmente tóxicos (ORDÓÑEZ et al, 2005).

A incorporação de compostos antioxidantes nesses produtos aumenta sua vida útil e a qualidade sensorial, além dos valores nutricionais (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; ROJAS; BREWER, 2007). Neste caso, os compostos mais utilizados, entre outros, são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tércio-butil-hidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil galato (PG) (Figura 3).

Estes antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por aumentarem a vida útil de muitos produtos entre 15 e 200% (DURÁN; PADILLA, 1993).

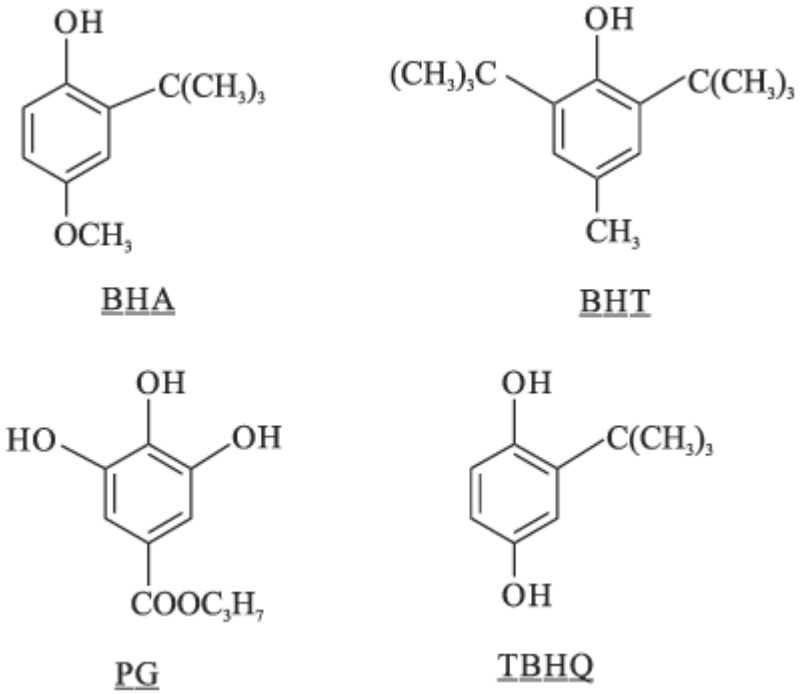


Figura 3 – Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos. Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

O antioxidante BHT é efetivo em gordura animal e pouco eficiente em óleo vegetal, além de resistir menos que o BHA a altas temperaturas. Por isso, utiliza-se nas indústrias alimentícias uma mistura desses dois antioxidantes (ARAÚJO, 1998).

Entretanto, estudos revelam que o BHA e o BHT podem ser tóxicos, e o elevado custo de fabricação junto com a baixa eficiência dos antioxidantes naturais, como os tocoferois, juntamente com a crescente consciência dos consumidores com relação à segurança de aditivos alimentares criou uma necessidade de identificar uma alternativa natural e, provavelmente, fontes mais seguras de antioxidantes alimentares (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998).

De acordo com Saad e outros (2007), o antioxidante sintético TBHQ apesar de ser permitido nos Estados Unidos, é proibido em países da União Européia e, usualmente concentrações entre 100-200 µg/g dos antioxidantes fenólicos sintéticos são permitidas para óleos ou gorduras, puros ou em combinação.

Assim, com os estudos toxicológicos demonstrando a possibilidade destes antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico, o *Joint Expert Committee on Food Additives*

(JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) têm alterado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de algumas pesquisas científicas (WÜRTZEN, 1990).

Esses antioxidantes fenólicos apresentam a capacidade de retardar ou prevenir o desenvolvimento da rancidez oxidativa em alimentos ou a deterioração do "flavor". A estrutura fenólica dos antioxidantes permite a doação de um próton ao radical livre, formado na oxidação de lipídios, regenerando a molécula do triglicerídeo e interrompendo o mecanismo da ação do radical livre na oxidação. O fenol derivativo torna-se um radical, podendo estabilizar-se entre si por meio de formas ressonantes intermediárias, não promovendo oxidações adicionais. Por isso, é importante que o antioxidante fenólico apresente uma eficaz deslocalização do elétron não pareado produzido pela reação com o radical livre; as substituições na posição orto e para são mais eficazes que na posição meta, por apresentar um maior número de formas ressonantes (ARAÚJO, 1998).

Entretanto, do ponto de vista fisiológico, os antioxidantes para exercerem suas propriedades biológicas devem estar disponíveis em certas concentrações no tecido alvo. Assim, as propriedades biológicas dos antioxidantes dependem de sua liberação da matriz alimentar durante o processo de digestão (bioacessibilidade) e pode diferenciar quantitativamente e qualitativamente daqueles produzidos pela extração de produtos químicos empregados na maioria dos estudos (SERRANO; GOÑI; SAURA-CALIXTO, 2007).

3.2.2 **Antioxidantes naturais**

Diversas pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais buscando-se compostos com propriedade antioxidante. O efeito antioxidante de especiarias e ervas foi inicialmente elucidado por Chipault e outros (1952), em 32 especiarias, sendo o alecrim e a sálvia consideradas as mais eficazes.

Os antioxidantes naturais são considerados multifuncionais e sua atividade depende de vários parâmetros como as características da matriz, as condições experimentais e o mecanismo de reação. Em geral o efeito de um antioxidante é realizado na interface dos componentes entre as fases hidrofílicas e lipofílicas, o entendimento dessas propriedades de extratos de plantas deve envolver estudos severos de sua atividade (GIOTI et al, 2009).

A maioria desses antioxidantes além da vitamina C, vitamina E e carotenóides, é encontrada na dieta alimentar. Wang, Cao e Prior (1996) e, Kalt e outros (1999) publicaram trabalhos sobre compostos com elevada atividade antioxidante provenientes de frutas.

A vitamina C das frutas é composta, em sua maior parte, pelo ácido ascórbico (AA) e por sua forma oxidada, o ácido deidroascórbico (DHA) que possui um papel importante sob as reações de estresse oxidativo (HAGEN et al, 1999). Entretanto, uma nova oxidação do ácido deidroascórbico para o ácido dicetogulônico produz uma inativação irreversível da vitamina (ANDERSON et al, 1988). Este composto ocorre naturalmente na forma de dois isômeros, o L-ácido ascórbico (forma ativa) e o D-ácido ascórbico (forma inativa) (ARANHA et al, 2000). Estas estruturas estão apresentadas na Figura 4.

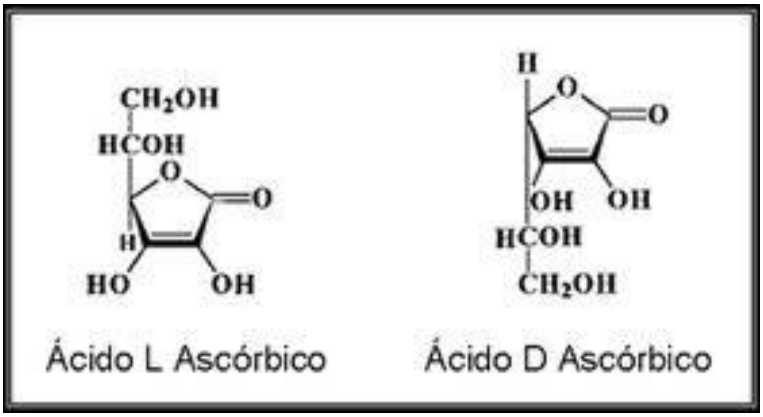


Figura 4 – Estruturas químicas do L-ácido ascórbico e o D- ácido ascórbico.

Esta vitamina foi isolada em 1928 pelo o médico Albert Szentgyorgyi e recebeu o nome de ácido hexurônico (6 carbonos). Em 1932, o isolamento da vitamina C em forma cristalina pura foi conseguido independentemente por dois grupos de pesquisadores. A estrutura química foi identificada e o produto sintetizado sob a forma fisiologicamente ativa pouco depois; em 1938 o ácido ascórbico foi oficialmente aceito como nome químico da vitamina C (ARANHA et al, 2000).

O ácido ascórbico é uma substância cristalina, com sabor ácido. É insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos. Na água, é solúvel na proporção de 1 g em 3 ml. O calor, a exposição ao ar e o meio alcalino aceleram a oxidação desta vitamina, especialmente quando o alimento está em contato com o cobre, o ferro ou enzimas oxidativas (GUILLAND; LEQUEU, 1995).

3.2.3 **Compostos fenólicos**

Muitas ervas e especiarias, utilizadas como condimentos são excelentes fontes de compostos fenólicos. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial antioxidante, podendo ser usadas como conservadores naturais para alimentos (ZHENG; WANG, 2001). Os

compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas (como antialergênica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora), mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

O termo polifenóis ou compostos fenólicos englobam um amplo e numeroso grupo de moléculas encontradas em hortaliças, frutas, cereais, chás, café, cacau, vinho, suco de frutas e soja. Têm função de fotoproteção, defesa contra microorganismos e insetos, além de serem responsáveis pela pigmentação e por algumas características sensoriais dos alimentos. Os polifenóis apresentam uma estrutura química comum, derivada do benzeno, ligada a um grupo hidrofílico. Com base em sua estrutura e na maneira pela qual os anéis polifenólicos ligam-se uns aos outros, eles são classificados em quatro famílias: flavonóides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (MANACH et al, 2004).

Os polifenóis presentes nos alimentos podem atuar como antioxidantes na inibição de processos de peroxidação de lipídios, que podem ocorrer com muita facilidade nas condições presentes no trato gastrointestinal (GI). Para classificação das propriedades antioxidantes de alimentos, a quantidade de radicais livres peroxil eliminado por uma dada quantidade de alimento (capacidade) e a reatividade dos alimentos em capturar estes radicais antes da ocorrência dos danos críticos das moléculas biológicas (eficiência) devem ser considerados (VANZANI et al, 2011).

Os compostos fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas.

Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor freqüência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002). Atuam como antioxidantes primários, interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Dentre estes compostos, os flavonóis em especial, atuam também como antioxidante secundário, retardando a etapa de iniciação da autoxidação através da complexação com metais (MELO; GUERRA, 2002).

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem

nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (SOARES, 2002). Estes ácidos constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (BRAVO, 1998; FERGUSON; HARRIS, 1999).

Normalmente, extratos polares apresentam maior atividade antioxidante do que os extratos não-polares. Por exemplo, estudos com óleo essencial de *Salvia tomentosa* Miller (TEPE et al, 2005), mostraram que o extrato aquoso metanólico foi superior aos outros extratos não polares, com valor de IC_{50} de 18,7l g/mL, que se refere a concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Essa atividade deve estar relacionada com a concentração de fenólicos; pois para este óleo essencial o maior valor foi encontrado na fração polar (15%) e, a menor quantidade de fenóis totais foi encontrado no extrato não-polar do extrato metanólico (1,0%).

3.3 ORÉGANO

O orégano é uma planta perene, originária da Europa, África e Ásia; conhecida cientificamente como *Origanum vulgare Linneus*, pertence à família Lamiaceae (Labiatae) a mesma do hortelã-de-folha-miúda (*Mentha piperita* L), manjericão (*Ocimum basilicum* L), sálvia (*Salvia officinalis* L), entre outras (VON HERTWIG, 1991; MARINOVA YANISHLIEVA, 1997; MARINO; BERSANI; COMI, 2001).

Com duração de 4 a 6 anos, seca no inverno e rebrota no verão. É uma herbácea, de porte baixo, com altura oscilando entre 25 a 80 cm de altura, com caule ereto e de coloração parda avermelhada, com 4 ângulos e ramoso na extremidade superior. As hastes são consideradas anuais e se não forem colhidas, secam. As folhas são inteiras, pecioladas, verde escuras ou ligeiramente acinzentadas, ovais, com bordos serrilhados e quase sem pelos, com comprimento de 1 a 5 cm (Figura 5). As flores, dependendo da espécie, apresentam variadas cores como rosadas, púrpuras, vermelhas (VON HERTWIG, 1991; VAZ; JORGE, 2006; PRELA-PANTANO; TERAMOTO; FABRI, 2009).

Figura 5 - Foto ilustrativa do *Origanum vulgare* Linneus. Fonte: Vaz e Jorge (2006).

A semeadura pode ser feita o ano todo, seu ciclo é de 80 dias no verão e 100 dias no inverno, segundo a Importadora de Semente para Lavoura (ISLA, 2006). A forma de propagação é feita por sementes ou mudas produzidas por estaquia a partir de ramos ou divisão de touceiras. Já o cultivo deve ser feito com espaçamento de 20 x 30 cm entre plantas, em regiões de clima temperado brando. Tem preferência por solos férteis e bem drenados (VAZ; JORGE, 2006).

O esquema a seguir, representa as etapas de produção da cultura do orégano (Figura 6).

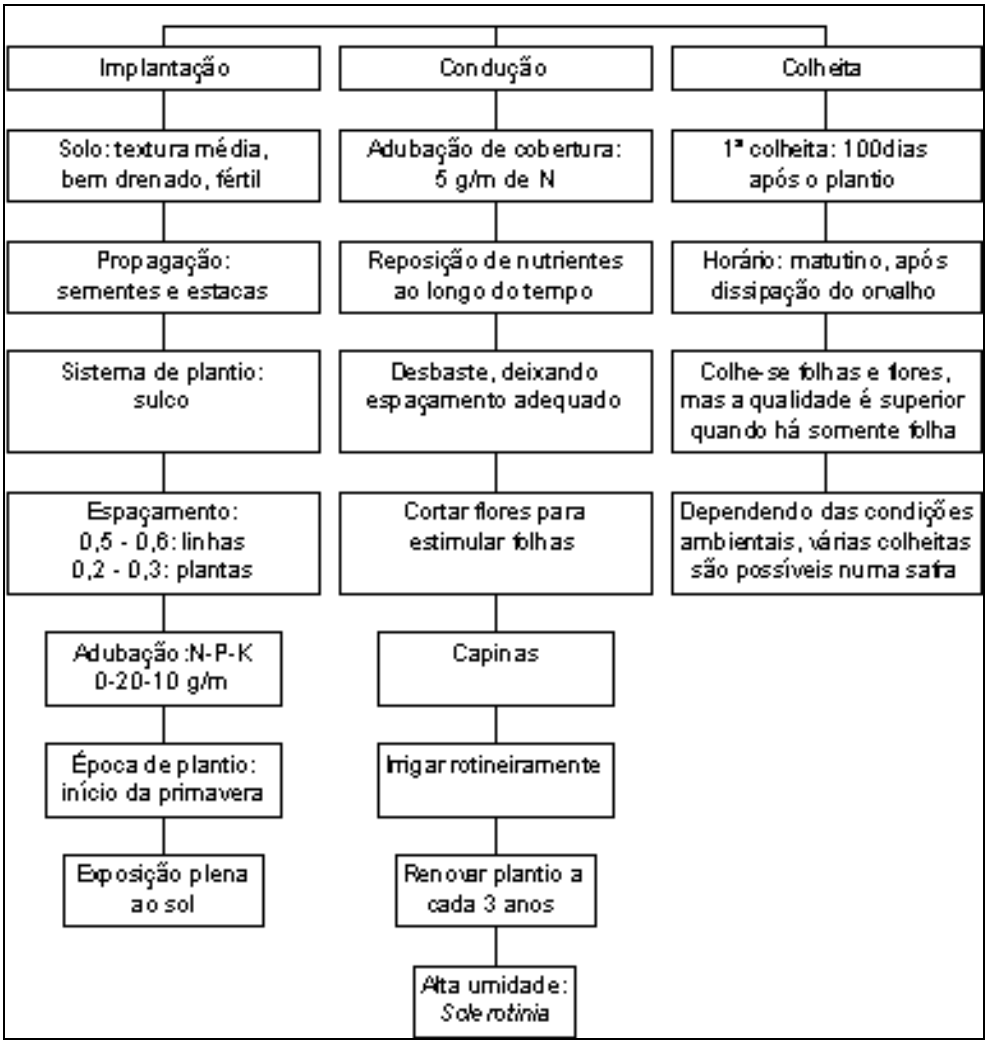


Figura 6 – Diagrama de blocos da produção do orégano. Fonte: Reis e outros (2000).

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma erva de intenso aroma e gosto levemente amargo, é um dos condimentos mais populares do mundo. É utilizado diariamente na culinária em carnes, molhos de tomate e outros tipos de massas. Pertence ao gênero *Origanum* (família Labiatae / Laminaceae) e é caracterizada por uma larga diversidade morfológica e química. Apresenta quarenta e duas espécies ou quarenta e nove tipos (espécie, subespécie e variedades) divididos em 10 seções (*Amaracus, Anatolicon, Brevifilamentum; Longitubus; Chilocalyx; Majorana; Campanulaticalyx; Elongatispica; Origanum; Prolaticorolla*) pertencem a este gênero, sendo que a maioria é originária das regiões do Mediterrâneo (Grécia, Irã, Turquia), sendo também cultivadas por toda a Europa, ao leste e centro da Ásia, até Taiwan e na América do Norte, onde foi introduzida pelo homem como planta para culinária (IETSWAART, 2007).

A composição química do orégano (*Origanum vulgare*) (%) está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química (%) aproximada (peso seco) de orégano.

Constituinte do orégano	**(%) em peso seco**
Proteína	14,3
Óleo fixo	5,6
Óleo volátil	1,6
Fibra	22,1
Cinza	9,7
Amido	-
Açúcar	-
Outros	46,4

Fonte: Winton e Winton, 1939 apud Bernardes, 1996.

A quantidade total de óleo essencial produzido pelas variedades do gênero *Origanum*, variam de acordo com a planta, bem como em sua composição qualitativa (Tabela 3). O conteúdo total de fenóis (cristalizável e não cristalizável) de seu óleo essencial varia de traços até 95%, mesmo entre plantas de mesma espécie (VOKOU; KOKKINI; BESSIERE, 1998) (Tabela 4).

Tabela 3 – Classificação dos membros do gênero *Origanum* segundo a quantidade total de óleo essencial produzido por planta

Classificação	**Produção de óleo (ml/ 100g de peso seco)**	**Exemplo**
"Pobres" em óleo essencial	Menor que 0,5%	*Origanum calcaratum*
Intermediário	Entre 0,5 e 2,0%	*Origanum microphyllum*
"Ricos" em óleo essencial	Maior que 2,0%	*Origanum vulgare* subsp *hirtum*; *Origanum onites*

FONTE: Kokkini, Vokou e Karousou (1991); Vokou, Kokkini e Bessiere, (1998).

Tabela 4 – Caracterização dos membros do gênero *Origanum* segundo os compostos de maior ocorrência na composição de seus óleos essenciais.

Principais compostos	**Exemplo**
Linalol, terpeno-4-ol, sabineno hidratado	*Origanum majorana*
Compostos fenólicos, carvacrol e/ou timol	*Origanum vulgare* subsp *hirtum*
Sesquiterpenos	*Origanum vulgare* subsp *vulgare*

Fonte: Kokkini, Vokou e Karousou (1991); Ruberto, Baratta (1993); Vokou, Kokkini e Bessiere (1998).

Para classificação comercial, a preponderância de carvacrol (fenol não cristalizável) classifica o óleo essencial como de orégano e, com preponderância em timol (fenol cristalizável) como de tomilho. De acordo com Sivropoulou e outros (1996), a variação na composição química dos óleos essenciais de orégano provavelmente tem uma ligação com suas propriedades antimicrobianas.

O orégano possui propriedades antioxidantes devido à sua constituição química: óleo essencial (0,15%-0,90%) na planta seca, sendo seus principais constituintes os fenóis: carvacrol, timol, γ-terpeno e p-ameno, podendo variar de acordo com a localização onde foi cultivada. Possui também outros constituintes como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, resinas, princípio amargo. Além de serem bactericidas e terem efeito estimulante, eles também são antiespasmódico, antiinfeccioso, antiséptico, vasoconstritor (PRELA-PANTANO; TERAMOTO; FABRI, 2009).

O seu óleo essencial tem alta estabilidade, atividade antioxidante, ausência de contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos, principalmente o carvacrol e o timol, cujas estruturas químicas podem ser observadas na Figura 7, com atividade antimicrobiana comprovada (LAMBER et al, 2001; BAYDAR; SAGDIÇ; OZKAN, 2004). Este óleo essencial assim como outros óleos, apresentam ser uma interessante alternativa como antioxidante natural, se tiverem a eficiência e estabilidade térmica próxima aos dos sintéticos (KAWASE, MOTHÉ, COELHO, 2012; KAWASE et al, 2013).

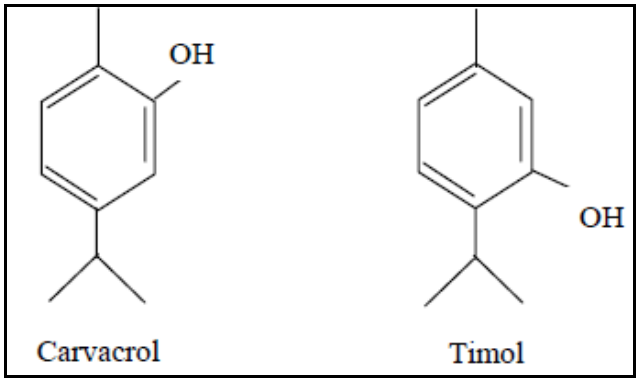


Figura 7 - Estrutura química do carvacrol e timol.

O *Origanum vulgare* é uma planta conhecida também pelo seu valor medicinal, suas folhas e flores são amplamente usadas em homeopatia. Seu óleo essencial é usado na tradicional medicina indiana como um aroma fortificante e estimulador. Contudo, tem uso restrito em perfumaria e cosméticos.

3.3.1 PRODUÇÃO E MERCADO BRASILEIRO

A espécie *Origanum vulgare* L. é cultivada no Brasil principalmente nas regiões sul e sudeste, onde foi aclimatada há muito tempo, sendo bastante popular (GIACOMETTI, 1989).

O produto depois de embalado deve ser mantido em ambiente seco, escuro e bem arejado, com baixa oscilação de temperatura. O material deve ser armazenado no menor tempo possível para não perder suas características.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Censo Agropecuário de 2006 relatou que a produção de orégano no Brasil neste ano foi de 67 toneladas, com média de venda no Brasil de R$ 1,92/ Kg (BRAINE; SENA, 2010).

Em São Paulo, o preço do orégano no ano de 2010 foi de R$ 12,18 /Kg, segundo a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP).

Entretanto, o mercado brasileiro de orégano forma-se basicamente pela importação da matéria-prima. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (Sistema Alice MDIC, 2006), podem auxiliar na análise (Figura 8).

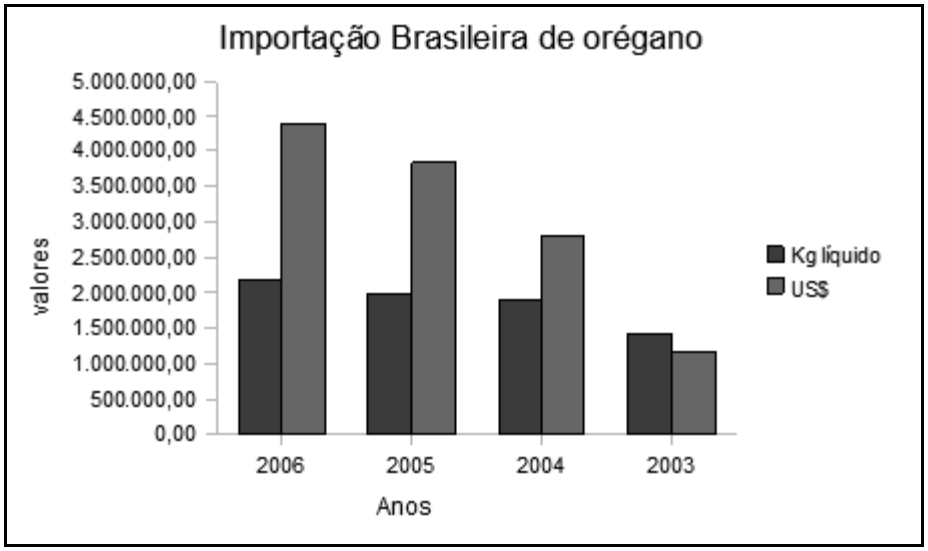


Figura 8 - Importação brasileira de orégano em Kg Líquido e em Valores (US$). Fonte: Sistema Alice MDIC (2006).

O valor importado em kg foi de 1.410.968 (2003) para 2.189.084 (2006), crescimento de 150%. Os principais países exportadores para o Brasil foram o Chile, seguido do Peru, respondendo juntos por aproximadamente 90% da importação brasileira (Sistema Alice MDIC, 2006).

Empresas do setor de alimentos importam praticamente todo o orégano comercializado no país, sendo o produto seco embalado para o comércio em várias formas: embalagens plásticas, bandejas e ainda em embalagens de vidro ou plástico, práticas para o manuseio.

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Para a identificação e isolamento de compostos antioxidantes em fontes naturais (frutas, sementes e especiarias) é necessária a realização da extração com solventes de polaridades diferentes. A extração desses compostos é realizada por destilação, extração por solventes e mais recentemente com fluido supercrítico.

Antes do processo de extração, algumas etapas devem ser realizadas para facilitá-lo e conservar os compostos antioxidantes, que são sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor (AZIZAH; RUSLAWATTI; TEE, 1998). Os vegetais normalmente são desidratados, liofilizados ou congelados, e ainda peneirados ou moídos antes do processo de extração. Assim, os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente de extração e as enzimas lipoxigenase tornam-se inativas. Tais enzimas, naturalmente presentes em vegetais, são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática (JUNTACHOTE; BERGHOFER, 2005).

As características do extrato como as do óleo, podem mudar conforme o procedimento empregado, tendo em vista que as suas propriedades químicas poderão ser modificadas a depender das condições a qual ele é submetido quando determinada técnica é utilizada (SILVA et al, 2006).

Segundo Shaidi e Naczk (1995), não existe sistema de extração com solventes que seja satisfatório para o isolamento de todos ou de classe específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores. A natureza química desses compostos varia do simples ao altamente polarizado, há grande variedade de compostos bioativos nos vegetais e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido. Estágios adicionais podem ser necessários para purificar o isolado e remover substâncias fenólicas e não fenólicas indesejáveis.

Além disso, os principais solventes apresentam as desvantagens de serem pouco seletivos, seus extratos apresentam muitas vezes cor escura e, são de difícil remoção completa.

3.4.1 Microextração em fase sólida SPME

Foi desenvolvida no início de 1990 por Pawliszyn e co-autores (Arthur e Pawliszyn, 1990) como uma técnica de preparo da amostra incorporado à extração, que apresenta concentração e introdução da amostra uma única etapa, usando fibra de sílica fundida que é recoberta com uma fase estacionária apropriada. Baseia-se na separação em equilíbrio dos analitos alvos entre a matriz da amostra e a fase estacionária. A repetibilidade deste método de extração é importante para sua validação, deve-se para isso realizar sua otimização, onde desvios padrões (*SRD*) de cerca de 10-15% podem ser obtido (DEMEESTERE et al, 2007).

Este método diminui o tempo de preparo da amostra e dispensa o uso de solventes, além disso, permite a análise de pequenas quantidades de amostra evitando, por exemplo uma grande coleta de plantas necessárias para extração. É uma ferramenta poderosa quando combinada com análise utilizando cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (CG-MS), que apresenta elevada acurácia e precisão na determinação de espécies voláteis, sem comprometer a amostra (MAGGI et al, 2010).

De acordo com Valente e Augusto (2000), SPME é uma microtécnica em que os processos de extração e pré-concentração de analitos ocorrem numa escala dimensional não muito usual, por permitir determinações em níveis de detecção da ordem de ng/L. O dispositivo básico de SPME consiste de um fino bastão de fibra ótica, contendo uma das extremidades recoberta com um polímero adsorvente (fase estacionária) de diferentes espessuras e tipos, como por exemplo, o polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), carbowax (CWX) ou outro sólido adsorvente, como o carvão ativado. O detalhe da Figura 9 representa uma fibra comercial em que o recobrimento, ou filme extrator, tem espessura de 100 mm.

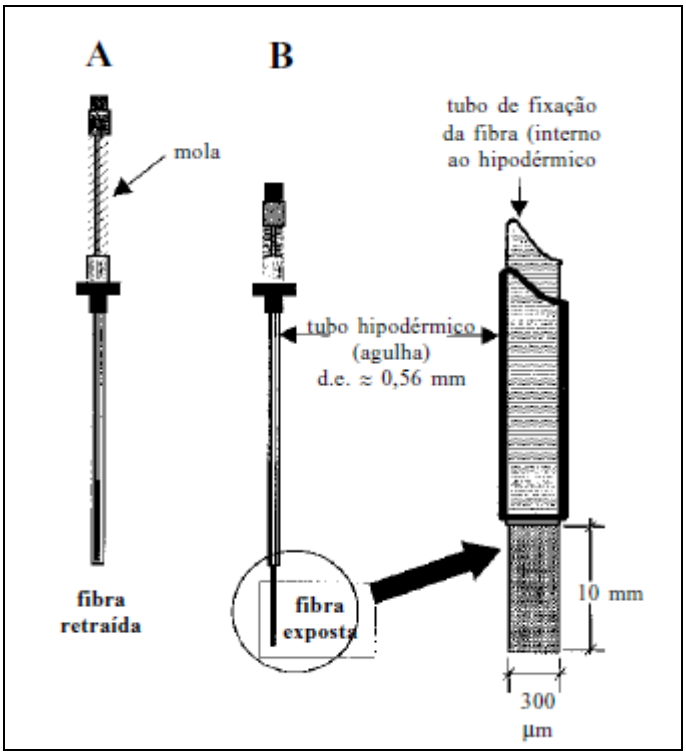


Figura 9 - Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm), (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 mm de espessura. Fonte: Valente e Augusto (2000).

A técnica SPME possui duas etapas básicas: a partição dos analitos entre a fibra e a amostra (matriz), seguida pela dessorção do extrato concentrado no instrumento analítico, o cromatógrafo (CG). Na primeira etapa, a fibra é exposta diretamente à amostra ou ao *headspace* (HD), onde ocorre a partição dos analitos de interesse entre a amostra e o gasoso

para a dessorção térmica, e consequentemente, para a separação e a quantificação dos mesmos (PAWLISZYN, 1997).

Mais de 3000 artigos científicos sobre SPME tem sido publicado desde a introdução sobre o assunto por Pawliszyn. O grande número de publicações sobre SPME é devido à interação harmônica das diversas etapas do processo analítico. Nos métodos convencionais, a perda de analitos pode ocorrer durante as etapas de extração e concentração, diferentemente do que proporciona a SPME, que além de ser uma técnica simples, apresenta baixo custo, seletividade e sensibilidade. Existem diversas publicações com aplicações nas diversas áreas, como para alimentos, polímeros e explosivos.

Recentemente Furtado e Coelho (2012) propuseram dois modelos que amplia a aplicação da SPME para a determinação do coeficiente de atividade na diluição infinita para solutos em solventes orgânicos.

Dificuldades na agitação da amostra, controle de temperatura e ação da fibra tem sido reportado pelos usuários de SPME. Outros obstáculos podem ser citados com o limite de vida da fibra, competitividade na adsorção e relativo custo elevado das fibras (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2007).

A natureza do recobrimento da fibra influencia fortemente na efetividade da técnica de SPME e a fibra pode ser escolhida em função do analito a ser determinado. Alguns autores compararam o desempenho de algumas fibras comercialmente avaliadas para aplicações específicas, como Muller e outros (1999). Que compararam diferentes tipos de recobrimento de fibras, polidimetilsiloxano 7 μm (PDMS 7), polidimetilsiloxano 100 μm (PDMS 100) e poliacrilato 85 μm (PA 85), em um estudo para classificar a origem botânica de canela. Algumas fibras disponíveis comercialmente são apresentadas na Tabela 5 (VALENTE; AUGUSTO, 1999).

Tabela 5 – Fibras comerciais e especificações

Tipo	Composição química	Lf/µm	ΔT ºC	Aplicação sugerida
Não polares	Polidimetilsiloxano (PDMS)	100;	200-270	Basicamente para compostos apolares. É possível usar com polares.
		30;		
		7	220-320	
Polares	Poliacrilato (PA)	85	220-310	Medianamente a altamente polares, como fenóis, pesticidas organofosforados. Cetonas, álcoois. Voláteis de média a alta polaridade.
	Carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB)	65	200-270	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade
Bi-polares	PDMS-DVB	65	200-270	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade
	Carboxen-PDMS	75	-	Voláteis.

Fonte: Valente e Augusto (1999).

Zhang e Pawliszyn (1995) demostraram que a concentração de analitos obtidos por headspace-SPME na fibra é o resultado de dois equilíbrios distintos: o primeiro é o equilíbrio entre a matriz e o headspace responsável pela composição do headspace; o segundo é o equilíbrio entre headspace e o recobrimento da fibra polimérica, que está relacionado com a difusão do analito da fase vapor para a fase do recobrimento da fibra. Assim o total de analito recuperado da matriz sólida é relacionado com o coeficiente de partição (*K*), do analito entre a fase estacionária da fibra de SPME e a matriz (K_{fm}).

Aspectos práticos prendem-se aos coeficientes de difusão e às constantes de equilíbrio de partição. Problemas com coeficientes de difusão desfavoráveis podem ser contornados com agitação e/ou aquecimento do sistema. A extração é favorecida para analitos que tenham, simultaneamente, K_{hm} (coeficiente entre headspace de matriz) elevado e baixo K_{fh} (coeficiente fibra headspace), porque a concentração de analito na fibra é pequena em relação à sua concentração na amostra o que ocorre na prática, pois os volumes dos recobrimentos das fibras são muito menores do que os da amostra e do headspace (VALENTE; AUGUSTO, 1999).

3.4.2 Extração com solventes orgânicos

A extração com solventes orgânicos foi aplicada pela primeira vez em 1835 por Robiquet para extração de compostos de flores (HUI; JOHN, 2007); esta técnica é uma das mais antigas operações unitárias da indústria química.

É frequentemente utilizada para o isolamento dos compostos bioativos. O rendimento da extração e a determinação da atividade antioxidante dos extratos dependem do tipo de solvente, devido às diferenças nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997). Este extrato proveniente da extração com solventes orgânicos é denominado de oleoresina, normalmente de extratos de plantas aromáticas, condimentos ou plantas medicinais.

O processo de extração com solvente ou sólido-líquido ocorre com a dissolução seletiva de um ou mais solutos de uma matriz sólida por um solvente líquido. Esta operação unitária é também designada de lixiviação, decocção ou eluição. A terminologia pode ser especificamente para um determinado tipo de extração. Por exemplo, a lixiviação é usada quando o objetivo é a obtenção de compostos alcalinos, decocção é utilizada quando o solvente está em sua temperatura de ebulição, e eluição é utilizada quando os sólidos solúveis estão na superfície da matriz sólida (TAKEUCHI et al, 2009).

A solução obtida é retirada do extrator e deslocada para um evaporador a fim de obter um extrato concentrado. Geralmente, o solvente não é removido por completo e o extrato se encontra contaminado, além disso, estes solventes extraem compostos indesejados de difícil controle que diminuem o valor comercial dos óleos (TEMELLI et al, 2007), como resina e pigmentos.

Sendo assim, é necessário selecionar cuidadosamente a unidade extratora e o solvente para garantir a eficácia do processo. A escolha do solvente deve ser cuidadosamente considerada, devido à capacidade físico-química em dissolver os compostos alvos e sua toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente (TAKEUCHI et al, 2009).

Para indústria, existem alguns fatores que devem ser avaliados antes de se iniciar um processo, devido a influência da taxa de extração, como a preparação da matriz.

Na preparação da matriz, a estrutura celular é um importante fator que precisa ser considerada, pois na maioria dos casos o soluto (óleo) é armazenado nos espaços intracelulares, capilares ou estruturas celulares. Desta forma, o sucesso da extração com solvente depende fortemente do estado sólido. Uma das etapas de pré-tratamento que deve ser considerado é a trituração ou moagem da matéria-prima. Moagem antes da extração com

solvente promove um aumento da área de contato entre o solvente e a matriz sólida. Além disso, na maioria dos casos esta etapa aumenta o contato entre solvente e soluto por quebrar as estruturas celulares. Entretanto, há casos em que a manutenção da estrutura da célula é necessária, como na extração de açúcar a partir de beterraba. Neste caso, a beterraba é cortada em pedaços finos, mas a estrutura da célula é preservada para evitar a extração de compostos indesejáveis (TREYBAL, 1981).

Devido à complexidade da estrutura celular e da existência de poros e diferentes compartimentos na célula, a difusividade do material biológico tem uma especificidade e denominação: difusividade efetiva. A difusividade efetiva também depende da composição e da posição do soluto no material sólido.

Em relação à temperatura, seu uso elevado é atraente em termos de extração de melhoria de processos. As temperaturas mais elevadas promovem um aumento do soluto de solubilidade no solvente, aumentando a taxa de difusão do soluto na maior parte do solvente, levando a uma maior taxa de transferência de massa. No entanto, na indústria de alimentos, o uso de temperaturas elevadas pode gerar indesejáveis reações como a degradação de compostos termolábeis.

A escolha do solvente para extração é baseada em vários fatores, tais como suas propriedades físico-químicas, custo e toxicidade. A escolha do solvente deve considerar características como a seletividade e capacidade de dissolver o soluto, bem como a sua tensão superficial, viscosidade, estabilidade, reatividade, toxicidade e custo. Devido à toxicidade de alguns solventes orgânicos, existem algumas restrições à sua utilização na indústria alimentícia (TAKEUCHI et al, 2009).

Atualmente, o solvente deve ser selecionado de acordo com a legislação que governa uso do extrato, se para fins alimentícios, cosmético ou perfumaria, e também conforme as especificações do cliente, que podem ser bem mais restritivas do que a própria legislação. O solvente escolhido influencia na composição do extrato, sua qualidade sensorial e no rendimento da extração.

Em termos de consumo humano, a presença de alguns solventes, como acetona, etanol, acetato de etila, 1-propanol, 2-propanol e acetato de propila são aceitáveis em pequenas percentagens residuais, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Estes solventes são classificados como classe 3 por Food and Drug Administration (FDA). Outros (Classe 2), tais como acetona, clorofórmio, hexano, metanol, tolueno, etilmetilcetona e diclorometano, pode ser usado em condições e especificações e limitações presentes quanto produtos farmacêuticos e de alimentos devido à sua toxicidade inerente. A exposição diária admissível

dos solventes na Classe 2 são dadas a de 0,1 mg / dia, e limites de concentração variam de 50-3880 ppm, dependendo do solvente orgânico usado (FDA, 2003). Os solventes agrupados em classes 1 não devem ser empregados na fabricação devido à sua inaceitável toxicidade ou seus efeitos deletérios do ambiente. Esta categoria inclui benzeno, tetracloreto de carbono, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetano e 1,1,1-tricloroetano.

A umidade da matriz deve ser baixa, pois a água do material sólido pode competir com a extração de solvente para o soluto de dissolução, que afetam a transferência de massa. Por outro lado, esta umidade é necessária para permitir o transporte do soluto, como por exemplo, na extração de café. No entanto, na maioria dos casos o material é desidratado em condições que não causam a degradação dos compostos (TAKEUCHI et al, 2009).

O solvente orgânico favorito nesta metodologia é o hexano, por ser o mais seletivo, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água, o que evita misturas azeotrópicas (MORETTO; FETT, 1998). Todavia, sua inflamabilidade, custo e potencial poluidor, justificam a sua substituição e o estudo de novas alternativas. Durante o século XIX, diversos solventes foram estudados, tais como o éter de petróleo ou diclorometano, ambos muito utilizados na extração de óleos voláteis.

Para utilização dos aparatos de Soxhlet, são utilizadas temperaturas de ebulição dos solventes. Esses são utilizados de acordo com o tipo de compostos a serem obtidos. De acordo com a literatura, a extração por Soxhlet de ervas como orégano (*O. vulgare* L.) e salsa (*Salvia fruticosa*) apresenta um maior rendimento com etanol por 6 h para ambas as plantas avaliadas, entretanto com menor composição em fenólicos (EXARCHOU; NENADIS; TSIMIDOU, 2002).

Da mesma forma, uma quantidade considerável de vitaminas liposolúveis e outros componentes importantes, tais como fosfolipídeos, são removidos durante a extração com hexano (ZHANG, 1995). Tem sido demonstrado que os fosfolípideos polares desempenham um papel importante na estabilidade lipídica. Extração com solvente orgânico também deixa indesejáveis resíduos de solventes nos produtos finais (ZHANG, 1995; CROWE; WHITE, 2003).

3.4.3 **Destilação a vapor**

Destilação é um processo de separação de misturas líquidas, com base na diferença de composição dos constituintes nas fases líquida e vapor em equilíbrio, devido à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido (BERNARDO-GIL; RIBEIRO; ESQUÍVEL, 2002).

Destilação a vapor é um processo de destilação para a recuperação de compostos voláteis com ponto de ebulição próximo a partir de uma matriz complexa e inerte (sólido ou líquido), utilizando o vapor (saturado ou superaquecido) como um agente de separação e de energia.

O uso de água fervente reduz a temperatura do processo, diminuindo a pressão parcial dos componentes desejados na fase vapor. O processo também é às vezes combinado com o uso de vácuo para permitir a redução de temperatura e evitar a decomposição do componente, quando os materiais com baixa volatilidade são processados.

Este método de extração ocasiona a hidrólise de certos componentes do óleo essencial bem como sua decomposição pelo calor. Diferentemente, o processo de extração com solventes voláteis, dissolve as folhas, caules ou outro tipo de matéria-prima, dissolvendo o princípio ativo juntamente como algumas graxas, compostos albuminosos e pigmentos (WATANABE et al, 2006).

No final do processo de destilação de óleo essencial, o aumento observado na produção de óleo é muito baixa, se comparada com o início da extração, acarretando em um maior consumo de energia. Com períodos mais curtos de destilação, a composição química do óleo pode ser representativa, embora geralmente não for exatamente à mesma que a do tratamento exaustivo.

Destilação tem sido o método mais comumente utilizado para a recuperação de óleos essenciais, porque apresenta como vantagem sua volatilidade. Os componentes de óleos voláteis, no entanto, tem ponto de ebulição muito mais elevado do que os pontos de ebulição da água e, portanto, eles são realmente destilado com vapor. O vapor atua como um transportador e remove os vapores de óleo, o qual foram evaporados bem abaixo do seu ponto de ebulição. Isto é especialmente importante porque muitos dos componentes dos óleos voláteis têm pontos de ebulição elevados e seriam termicamente degradados muito abaixo de seus pontos de ebulição normais. Após a condensação, os óleos e água são imiscíveis e assim são facilmente separados (MASANGO, 2005).

À medida que a difusão na água é sempre um processo lento, se as plantas são deixadas intactas, a taxa de recuperação do extrato será inteiramente determinada pela taxa de difusão de óleos voláteis e água quente através das membranas celulares das plantas.

Considerando todos os fatos apresentados, a observação dos seguintes princípios leva a melhores rendimentos com uma elevada qualidade desses extrativos: (1) manter a temperatura mais baixa possível, não esquecendo, contudo, que a taxa de produção é determinado pela temperatura, (2) a utilização de vapor o mínimo em contacto direto com matéria-prima, mas levar em conta que um pouco de água deve estar presente para promover a difusão (MANZAN et al, 2003).

Em relação ao tipo de compostos extraídos em plantas aromáticas de acordo com o tempo na destilação a vapor, nas teorias de difusão em água de Von Rechenberg's, os componentes oxigenados, em particular terpinen- 4-ol e 1,8-cineol, são extraídos mais rapidamente, apesar dos seus pontos de ebulição ser mais elevados. Os autores sugerem que os componentes extraídos posteriormente (monoterpenos e sesquiterpenos), a transferência de massa é controlada pela difusão, assim o aumento da resistência destes compostos para a difusão é atribuído às propriedades hidrófobas dos monoterpenos e ao maior tamanho das moléculas dos sesquiterpenos (BAKER; LOWE; SOUTHWELL, 2000).

Existem três tipos deste processo: destilação a vapor direta, destilação a vapor e seco e, hidrodestilação.

Na destilação a vapor direta (destilação a vapor), a matéria-prima não é imersa na água. A baixa pressão, o fluxo de vapor saturado passa pela matéria-prima e, os óleos voláteis são arrastados por este vapor d'água por apresentarem tensão de vapor mais elevada que a água, saindo no alto do destilador. Ao contrário, na destilação a vapor seco, a matéria sólida é aquecida utilizando-se elevadas temperaturas a pressões moderadas.

Na hidrodestilação a matéria-prima entra em contato direto com água fervente. Em alguns casos, é necessário misturar a matéria-prima com a água, porque a matéria se aglutina e forma pedaços grandes compactados, impedindo um bom contato com o vapor (CERPA et al, 2009).

3.4.3.1 Hidrodestilação

Na hidrodestilação, destilação por arraste de vapor de água, o material vegetal moído ou triturado é colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão. O vapor arrasta os compostos voláteis, a mistura de vapores é

transportada a um condensador, onde volta ao estado líquido e sé recolhido em um separador. O óleo essencial, que é uma mistura de substâncias orgânicas imiscíveis em água, separa-se constituindo um sistema de duas fases. A operação seguinte se resume na retirada do óleo pelo processo de decantação, que depois deve ser seco com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob nitrogênio, estando, portanto pronto para uso (CRAVEIRO, 1981).

Na Hidrodestilação de *Clevenger* a planta permanece imersa em água, o vapor da mistura à temperatura da ebulição arrasta os compostos voláteis, seguida pela condensação dos mesmos (RIBEIRO; ESQUÍVEL; BERNARDO-GIL, 2007).

A extração de compostos de fontes naturais emprega a hidrodestilação de *Clevenger*, que ainda é a técnica mais utilizada. Inúmeras publicações fazem referência ao uso desse método, apesar de muitos alegarem que o contato direto do material com a água quente pode ocasionar a hidrólise de determinados componentes e causar degradação de substâncias pelo calor danificando o aroma do óleo. Por conseguinte, a temperatura usada deve ser a mais baixa possível, e o contato entre o material e a água, minimizado (BAYRAMOGLU; SAHIN; SUMNU, 2008)**.**

Em escala laboratorial, o método mais utilizado de destilação para a obtenção de óleos voláteis é a hidrodestilação. Vários trabalhos de pesquisa utilizam a hidrodestilação para identificação da composição química dos produtos, bem como a atividade biológica desses óleos. No entanto, em uma escala industrial, a técnica de destilação mais utilizada é a destilação a vapor (CERPA et al, 2009).

3.4.4 **Fluido supercrítico**

Um fluido supercrítico (FS) pode ser definido como aquele que se encontra acima de sua temperatura e pressão críticas, apresentando propriedades físico-químicas intermediárias entre um estado líquido e o estado gasoso (Figura 10). A condução de um processo de separação usando uma planta de extração supercrítica requer a exploração das propriedades do solvente que o fluido possui no estado supercrítico (COELHO, 1994).

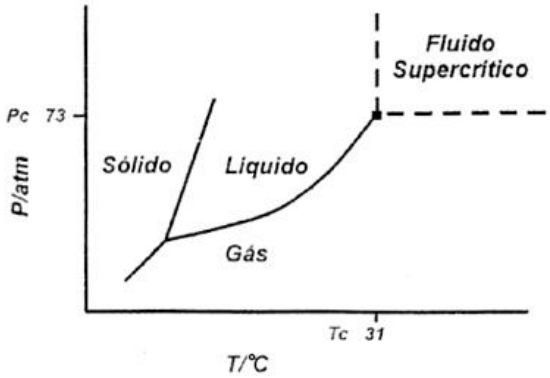


Figura 10 - Diagrama pressão/temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO_2; T_c: temperatura crítica; P_c: pressão crítica.

No ponto crítico existe apenas uma fase com propriedades típicas de líquidos (densidade) e de gases (viscosidade, compressibilidade e coeficiente de difusão mássica). Sendo assim, um FS pode ter o poder de solvência, a difusividade e propriedades de transporte aumentadas (BRUNNER, 1994).

Fluidos supercríticos apresentam características únicas que permitem ser utilizado como solventes. A densidade do fluido é relativamente alta e, conseqüentemente, têm poder de solvatação alta. Além disso, a densidade pode ser facilmente alterada por uma pequena variação na pressão e na temperatura do sistema, principalmente na região próxima do ponto crítico. Esse efeito oferece certo grau de seletividade para estes fluidos e também permite um processo de separação mais fácil do solvente-soluto. A separação pode ser alcançada pela diminuição da pressão ou aumento da temperatura da mistura que sai do extrator. Outra característica importante é a viscosidade relativamente baixa e alto coeficiente de difusão, que permite altas taxas de extração, quando esses fluidos são utilizados (ROSA et al, 2009).

Na Figura 11 é representado o processo de extração com fluido supercrítico.

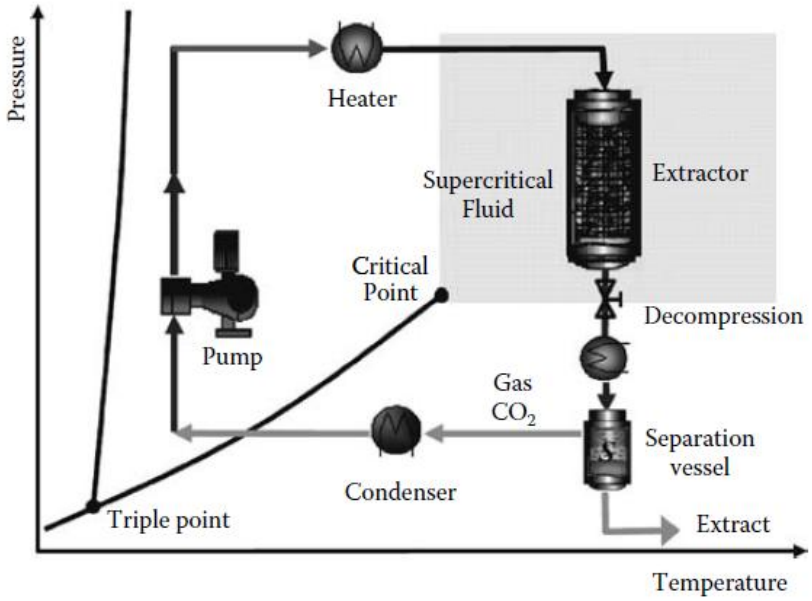


Figura 11 – Diagrama do processo de separação com fluido supercrítico. Fonte: Rosa e outros (2009).

A tecnologia de fluidos supercríticos está gradativamente tornando-se importante para aplicações industriais, principalmente na extração de materiais sólidos para produção de alimentos (café e chá), ingredientes alimentícios (aromas, agentes de cor, vitaminas e ácidos insaturados) e nutracêuticos/fitofarmacêuticos (PERRUT; JUNG; LEBOEUR, 2005; PASQUALI; BETTINI; GIORDANO, 2006).

Outras aplicações importantes são: transformação em pó, prevenção da poluição, métodos para tinta spray e revestimentos, processos de cristalização, polimerizações, reações químicas, limpeza de semicondutores e de máquinas de precisão, máquinas e limpeza a seco de têxteis (SANTOS; KAWASE; COELHO, 2011; GUPTA; SHIN, 2007; COELHO; AUGUSTO; PAWLISZYN, 2001).

As propriedades críticas são características peculiares de cada substância. A Tabela 6 oferece um quadro conciso dos solventes mais empregados em extrações com fluidos supercríticos, junto com seus parâmetros críticos Pc, Tc, ρ_c (densidade crítica).

Tabela 6 - Condições críticas para substâncias mais utilizadas na EFS.

Solvente	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (atm)	Densidade crítica ($g.cm^{-3}$)
Acetona	235	46,39	0,279
Água	374	217,17	0,323
Amônia	133	111,54	0,236
Benzeno	289	48,27	0,302
Dióxido de carbono	31,1	72,85	0,469
Etano	32	48,17	0,203
Etanol	241	60,61	0,276
Éter etílico	194	35,93	0,265
Etileno	9	49,65	0,218
Metanol	240	79,86	0,272
Óxido nitroso	36,5	71,5	0,452
Piridina	347	55,57	0,312
Propano	97	41,85	0,217
Tolueno	319	40,57	0,293

O dióxido de carbono é o solvente supercrítico mais vastamente empregado em processos de EFS por não ser tóxico, permitir que se opere em condições supercríticas com pressões relativamente baixas e próximas da temperatura ambiente, baixo custo, não é inflamável, é inodoro, quimicamente inerte e não causa risco ambiental (HAWTHORNE, 1990). Além disso, comporta-se como um solvente lipofílico, mas quando comparado com um solvente líquido ele tem a vantagem de ser seletivo, ou seja, é possível ajustar a sua capacidade de solubilização com valores entre o líquido e o gás.

A Tabela 7 mostra as propriedades físicas e de transporte associadas aos diferentes estados do fluido.

Tabela 7 - Propriedades físicas associadas aos diferentes estados do fluido.

Estados	Densidade (g/cm^3)	Difusividade (cm^2/s)	Viscosidade (g/m.s)
Gás			
P = 1 atm	(0,6 - 2,0) x 10^{-3}	0,1 - 0,4	(1,0 - 3,0) x 10^{-4}
T = 15 - 30°C			
Líquido			
P = 1 atm	0,6 - 1,6	(0,2 - 2,0) x 10^{-5}	(0,2 - 3,0) x 10^{-2}
T = 15 - 30°C			
Supercrítico			
P = Pc, T = Tc	0,2 - 0,5	0,7 x 10^{-3}	(1,0 - 3,0) x 10^{-4}
P = 4Pc, T = Tc	0,4 - 0,9	0,2 x 10^{-3}	(3,0 - 9,0) x 10^{-4}

3.4.4.1 Extração com fluido supercrítico

Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem se difundir facilmente através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações. O dióxido de carbono (CO_2) é o fluido mais utilizado devido a sua moderada temperatura (31,3ºC) e pressão crítica (72,9 atm), é gasoso em temperatura ambiente. No entanto, o CO_2 supercrítico é menos efetivo para a extração de compostos com maior polaridade em fontes naturais. Tal fato é superado com a adição de co-solventes (RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002).

Durante a década de 1960 a extração de produtos naturais com fluidos supercríticos constituiu o objeto de desenvolvimento deste método de extração, por vários grupos de investigadores na Rússia, EUA e Alemanha. Logo após vários aromas e lipídeos extraídos por esse processo foram patenteados, sendo a aplicação comercial iniciada em 1978 com a cafeína e a extração do lúpulo (BERNARDO-GIL et al, 2007).

A obtenção de compostos antioxidantes mediante extração com gases, como o dióxido de carbono, sob condições críticas de pressão e temperatura constitui método moderno e eficiente. Algumas substâncias como o metanol e o etanol, podem ser utilizadas como co-solventes, melhorando o rendimento e a seletividade dos extratos (POKORNY; KORCZAK, 2001).

A extração supercrítica produz extratos livres de resíduos e pode ser conduzida em baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termo-sensíveis (ZANCAN et al,

2002). É geralmente mais rápida que a extração líquida, e mais ecológica quando feita com dióxido de carbono como solvente, pois não deixa resíduo no extrato obtido. A EFS tornou-se uma alternativa importante na extração de materiais de plantas em escala industrial, devido à necessidade de substituir os solventes orgânicos (MAUL, 1999).

O grande inconveniente da extração supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação que requer equipamentos mais robustos, elevando o custo inicial da instalação. Outras vantagens como, por exemplo, a alta pureza dos extratos e a grande eficiência do processo podem torná-la viável para aplicação em alimentos (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

A aplicação das tecnologias de precipitação por EFS requer previsíveis e consistentes características do produto. Um entendimento detalhado da influência de todos os parâmetros relevantes do processo é necessário. Muitos parâmetros apresentam simultâneas influências nos diferentes passos, como o mecanismo do fluido, transferência de massa, formação e crescimento das partículas.

Nos últimos anos a sua utilização tem sido mais relevante no setor de tecnologia de alimentos, principalmente na manufatura de produtos descafeinados (café e chá), ingredientes alimentícios (aromas, agentes de cor, vitaminas e ácidos insaturados) e nutracêuticos/fitofarmacêuticos (KAWASE; LUCHESE, COELHO, 2009; PERRUT; JUNG; LEBOEUR, 2005; PASQUALI; BETTINI; GIORDANO, 2006).

Esquivel, Ribeiro e Bernardo-Gil (1999), relatam que é possível isolar o principal constituinte do óleo essencial da seriguela, o carvacrol, por extração com CO_2 supercrítico, sendo as melhores condições de 12 MPa e 313K.

Oliveira, Rodrigues e Bernardo-Gil (2002) obtiveram melhores resultados em relação à extração de tocoferóis de óleo de noz por CO_2 supercrítico (405,7 µg/g de óleo) que em n-hexano (303,2 µg/g de óleo); utilizando 22 MPa, 308 K e uma velocidade superficial de $6{,}8 \times 10^{-4}$ ms^{-1}.

Grigonis e outros (2005) estudaram a ação antioxidante de extratos de erva-doce americana, mediante três tipos de extração. Na primeira utilizaram aparelho Soxhlet, na segunda, microondas e na terceira com dióxido de carbono supercrítico. Esse último foi considerado o método de extração mais eficiente com relação ao rendimento dos extratos e concentração de compostos bioativos, além dos aspectos ambientais.

Bernardo-Gil e outros (2007) obtiveram melhores resultados com extração lipídica de avelã, obtendo 458,7 µg de tocoferol /g de óleo com extração supercrítica e 382,8 µg de

tocoferol/g de óleo por n-hexano, sendo este óleo extraído por fluido supercrítico com razoável proteção oxidativa.

Li, Zhang e Zheng (2009) extraíram óleo de germe de lótus com CO_2 supercrítico, com 9,06% de compostos fenólicos totais e 485,1 mg/ 100 g de tocoferol; utilizando como condições de extração, pressão de 32 MPa, temperatura de 50 ºC, taxa de 0,5 L/min, tempo de 2 horas.

Ocaña-Fuentes e outros (2010) sugerem que óleo essencial de folhas secas de orégano (*O.* vulgare L.) trituradas e mantidas no criogênico e extraídas com CO_2 supercrítico (40 ºC e 30 MPa) pode ser usado como opção para o tratamento de doenças crônicas a partir de processos inflamatórios.

Fornari e outros (2012), relataram uma notável redução da extração de carvacrol e timol na extração com orégano e sálvia durante o intervalo de 0 a 1,5 h. Relataram ainda que seu óleos foram completamente extraídos, com um tempo ótimo de 1,76 h, nas condições de extração em EFS com CO_2 a 30 MPa e 313 K.

3.5 ASPECTOS TERMODINÂMICOS

As propriedades dos fluidos supercríticos são modificadas por pequenas alterações de temperatura e/ou pressão. A escolha das condições de operação varia de acordo com a especificidade dos componentes da matriz sólida a serem extraídos. Diversos fatores tais como tamanho da partícula, umidade, porosidade e área superficial podem afetar a extração.

A Figura 12 apresenta a dependência da densidade do CO_2 com a temperatura e a pressão. Verifica-se que um aumento na pressão, a uma dada temperatura, implica em um acréscimo na densidade do fluido. O aumento na temperatura, a pressão constante, diminui a densidade do CO_2, reduzindo assim seu poder de solvência (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

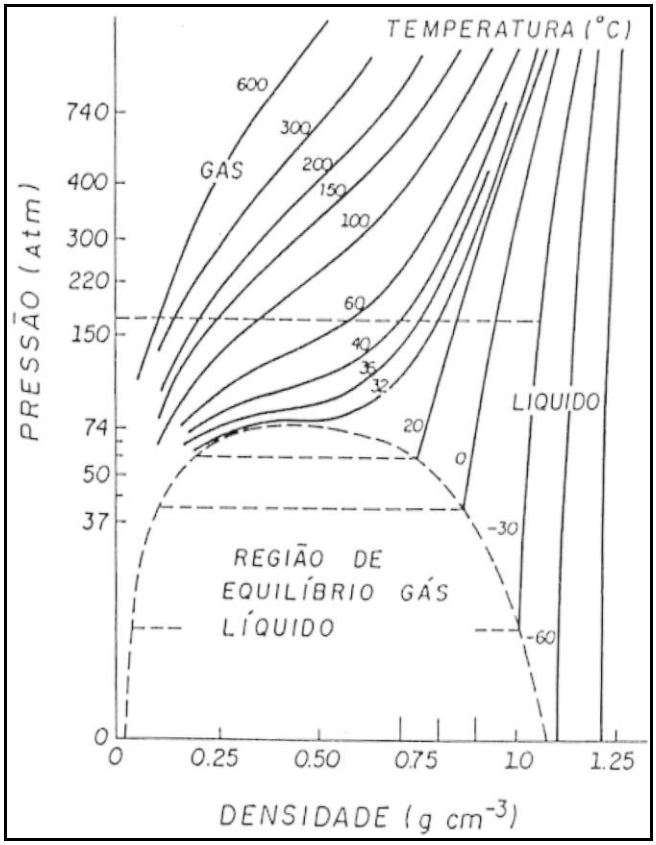


Figura 12 - Dependência da densidade de CO_2 com a pressão e a temperatura.

A densidade e outras propriedades termodinâmicas como a energia interna e a entalpia são freqüentemente avaliadas a partir de medidas de volume molar como uma função da temperatura e pressão, fornecendo relações pressão/volume/temperatura (PVT), as quais podem ser expressas matematicamente como equações de estado.

As equações de estado cúbicas abrangem uma larga faixa de temperatura e pressão e são, na realidade, as equações mais simples capazes de representar o comportamento tanto de líquido quanto de vapores. A maioria destas equações pode ser escrita de uma forma generalizada (SMITH; VAN NESS; ABBOT, 2007):

$$P = \frac{RT}{V - b} - \frac{a}{(V + \varepsilon b)(V + \sigma b)}$$

Para uma dada equação, σ e ε são números, os mesmos para todas as substâncias, ao passo que os parâmetros a e b são dependentes da substância e específicos para cada equação de estado. A partir da equação geral é possível escrever quatro equações cúbicas bem conhecidas: Van der Waals, Redlich-Kwong (RK), Soave-Redlich-Kwong (SRK) e Peng

Robinson (PR). A especificação dos valores numéricos para os parâmetros σ, ε, b, a dessas equações é dada na Tabela 8.

Tabela 8 - Especificação dos parâmetros das equações de estado.

Equação	Σ	ε	b	a
Van der Waals (1873)	0	0	$\frac{RT_c}{8P_c}$	$\frac{27}{64}\frac{R^2T_c^2}{P_c}$
Redlich-Kwong (1949)	1	0	$\frac{0.08664\,RT_c}{P_c}$	$\frac{0.42748\,R^2T_c^{2.5}}{P_c\sqrt{T}}$
Soave-Redlich-Kwong (1972)	1	0	$\frac{0.08664\,RT_c}{P_c}$	$\frac{0.42748\,R^2T_c^2\alpha(T)}{P_c}$
Peng-Robinson (1976)	$1-\sqrt{2}$	$1-\sqrt{2}$	$\frac{0.07780\,RT_c}{P_c}$	$\frac{0.45724\,R^2T_c^2\alpha(T)}{P_c}$

αSRK(Tr; w)= [1+ (0,480+ 1,574 w- 0,176 w2).(1- Tr1/2)]2
αPR(Tr; w)= [1+ (0,37464 + 1,54226 w- 0,26992 w2).(1- Tr1/2)]2

Fonte: Smith, Van Ness e Abbot (2007).

O intuito das expressões com α(T) na equação de estado, é melhorar a previsão da pressão de vapor para componentes puros. Estas expressões dependem de um terceiro parâmetro, o fator acêntrico (*w*) dos estados correspondentes, em adição a T_C e P_C, característico da estrutura molecular (SMITH; VAN NESS; ABBOT, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

A amostra a ser extraído o óleo essencial foi o orégano (*Origanum vulgare L.*), obtido da Fazenda Rei do Mato (Seropédica - RJ). As coletas foram efetuadas durante o inverno, no período de agosto a setembro de 2011.

O material vegetal foi separado em folhas e galhos, peneirado para retirada de sujidade, seco em estufa a 40 °C por um período de 24 horas e armazenados em sacos plásticos hermeticamente fechados. Os experimentos foram conduzidos com apenas folhas secas.

A Figura 13 ilustra as etapas de processamento e armazenamento do material coletado.

Figura 13 - Processamento e armazenamento do orégano (LPS/UFRRJ).

Os reagentes foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich Chemical (BHT, timol, carvacrol, etanol PA 99,9% pureza, óleo essencial de orégano, padrão de hidrocarbonetos, propionato de cálcio, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), reagente Folin-Ciocalteu), e a VETEC Química (ácido ascórbico). O dióxido de carbono foi obtido junto a AGA Gases Ltda.

4.1.1 Determinação do diâmetro médio das folhas do orégano seco

Um conjunto adequado de peneiras da série Tyler (W.S. Tyler, USA) foi escolhido, pesado e montado sobre o shaker. Uma massa de 40 g da amostra foi colocada sobre a primeira peneira e o equipamento ligado operando por 20 minutos. As peneiras foram pesadas novamente para a determinação da quantidade de amostra retida em cada peneira. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante.

O diâmetro médio de Sauter das folhas secas foi calculado utilizando-se a seguinte equação (2):

$$\overline{D} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{n} \frac{x_i}{\overline{d}_i}}$$

Onde n é o número de repetições, x_i é a fração de massa em uma dada repetição e di é o diâmetro médio da partícula considerando a média aritmética das aberturas de duas telas consecutivas.

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Todos os métodos de extração utilizados foram realizados no Laboratório de Processos de Separação, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

4.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

Para fins de otimização das condições experimentais, foi utilizada amostra de orégano desidratado e triturado, para homogeneização dos tamanhos das partículas. Uma porção de 0,5 mg da amostra foi colocada em um frasco de vidro âmbar de 60 mL, que foram fechados com uma tampa contendo septo de silicone PTFE (politetrafluoretileno) branco e armazenadas a -10 °C.

Para executar as extrações, os frascos contendo as amostras foram colocados antes das extrações, em banho termostático por 20 min para pré-equilíbrio e estabilização da temperatura.

A microextração em fase sólida dos compostos voláteis foi realizada no headspace dos frascos contendo as amostras, utilizando-se quatro fibras diferentes: 100 µm polidimetil siloxano (PMDS), 65 µm polidimetil siloxano/divinil benzeno (PDMS/DVB), 75 µm carboxen poli dimetil siloxano (CAR/PDMS) e 85 µm poliacrilato (PA), todas obtidas da Supelco.

Para otimização das condições de extração, foi adaptada a metodologia descrita por Shen e outros (2005). Após o condicionamento das fibras (1 hora a 250 ºC), estas foram expostas no headspace durante 40 min a 40ºC, logo após foi retraída e dessorvida no injetor de GC-MS a 250 ºC por 4 min.

Após escolha da melhor fibra, foi utilizado um planejamento experimental para otimização do processo a fim de encontrar as condições de extração máxima dos compostos voláteis e semi voláteis, sendo as variáveis tempo e temperatura de extração de 20 min a 80 ºC e 20 min a 40 ºC.

As eficiências do procedimento usando duas temperaturas (melhor extração para os voláteis e para os semivoláteis) durante o mesmo processo de extração e o procedimento convencional com uma temperatura foram determinadas.

4.2.2 Hidrodestilação

A hidrodestilação convencional foi realizada em aparelho tipo *Clevenger* utilizando-se água e folhas secas de orégano. O processo de extração foi realizado em triplicata, variando-se o tempo de 2 horas e 4 horas mediante aquecimento. Para separação do óleo, foi utilizado diclorometano. Foi adicionada a fase contendo óleo e diclorometano, o sal sulfato de sódio, para garantir a retirada da água. Posteriormente, foi realizada a filtração e a retirada do

diclorometano utilizando-se um rotavapor. O óleo de orégano livre de solvente foi então coletado em frascos âmbar ou em frascos envoltos por papel alumínio e mantido sob refrigeração para posterior análise.

4.2.3 Destilação com extrator Soxhlet

Nas extrações realizadas por Soxhlet foram utilizados os solventes etanol e hexano, utilizando-se os tempos de 4 e 6 h; todas em triplicata. A amostra seca foi acondicionada em cartuchos de celulose. Os balões contendo o solvente foram aquecidos em uma manta, permanecendo em refluxo contínuo.

Posteriormente, o solvente foi retirado em um rotavapor equipado com uma bomba de vácuo e os produtos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração. Para análise por Cromatografia Gasosa o produto, após a etapa de evaporação do solvente, foi recolhido em hexano e filtrado em papel filtro.

4.2.4 Extração supercrítica

O processo de extração supercrítica foi conduzido a 50 ºC, variando-se as pressões que foram de 120, 140 e 160 bar. Nessas condições o dióxido de carbono (CO_2) está acima do seu ponto crítico (31 ºC e 73 bar).

As extrações com fluido supercrítico foram realizadas em extrator tubular de aproximadamente 18,1 mL com 3,0 g de amostra de folhas secas de orégano, com serpentina acoplada a um banho termostático Falc. A unidade de extração pode ser vista nas Figuras 14 e 15. Para obtenção de pressões superiores à do cilindro de CO_2, foi utilizada uma bomba pneumática PALM/MAXIMATOR (modelo UTP 3500).

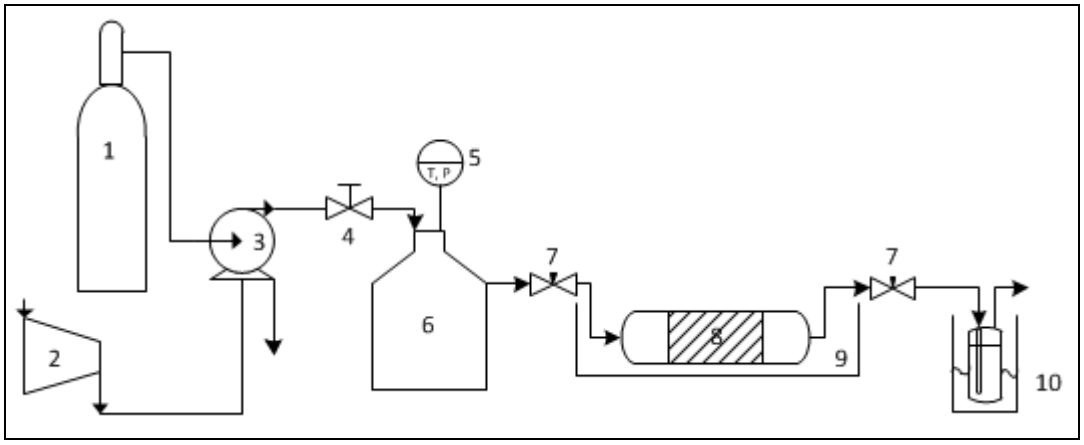


Figura 14 - Esquema de extração supercrítica, que consiste em tanque de CO_2 (1), compressor (2), bomba pneumática (3), válvula de agulha (4), medidores de temperatura e pressão (5), tanque pulmão (6), válvula micrométrica (7), extrator de leito fixo (8), banho termostático (9) e frasco de coleta (10).

Figura 15 - Unidade de Extração Supercrítica (LPS/UFRRJ).

Durante o processo de extração, tem-se o modo estático até alcançar o equilíbrio. Em seguida o experimento foi realizado em modo contínuo com a passagem de dióxido de carbono através da matriz sólida, na vazão de CO_2 de 20 a 30 L/h. A coleta de amostra foi realizada em vials âmbar, contendo 20 mL de álcool isopropílico resfriado em banho termostático a 10 ºC, no tempo total de 120 min. Os vials contendo os extratos foram mantidos a 10 ºC para posteriores análises.

4.2.4.1 Determinação da Densidade do CO_2 Supercrítico

A densidade do dióxido de carbono supercrítico foi determinada através da equação de estado cúbica de Peng-Robinson (1976) em termos do fator de compressibilidade, Z (Equação 3), devido a sua simplicidade e comprovada validade a altas pressões.

$$Z=PV/RT \quad (3)$$

Os valores de pressão crítica (Pc), temperatura crítica (Tc) e fator acêntrico (ω) do CO_2 foram obtidos de Reid, Prausnitz e Poling (1987).

Após calcular o volume molar do CO_2 supercrítico nas condições utilizadas usando o *software* MatLab® (Anexo A), foi calculado o valor da densidade.

4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

4.3.1 Análise das glândulas secretoras do óleo essencial de orégano por MEV

As folhas de orégano desidratadas não tratadas e as folhas que foram utilizadas para extração do óleo por diferentes métodos de extração, foram utilizadas para esta análise. As amostras foram preparadas de acordo com Gavahian e outros (2012), com modificações.

As folhas foram colocadas em microtubo com identificação, que foi fechado com algodão. As amostras nos microtubos foram liofilizadas utilizando um liofilizador Edwards, modelo L5KR, que foi realizada em duas etapas. A primeira etapa, ou secagem primária, foi a de centrifugação, sendo as condições de temperatura mínima de -40 ºC e pressão abaixo de 10^{-1} mbar, por 8 horas. Antes da segunda etapa, secagem secundária, as microampolas foram estranguladas com maçarico para criar uma área onde a largura do microtubo fosse menor. Esta etapa foi realizada no suporte de microampolas, com condições de -40 ºC e pressão abaixo de 10^{-2} mbar por 8 horas.

As amostras liofilizadas foram colocadas em adesivos de carbono fixados nos suportes de alumínio (stubs) e metalizadas com ouro. As imagens de MEV foram obtidas com microscópio eletrônico de varredura FEI, modelo Quanta 200, trabalhando sob alto vácuo, voltagem de aceleração de 20 kV, distância de 10 mm e abertura final (spot size) de 4 mm.

O preparo das amostras foi realizado na EMBRAPA AGROBIOLOGIA – Seropédica/RJ e; as análises microscópicas no Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

4.3.2 Análises por cromatografia gasosa

A determinação da composição do óleo essencial de orégano das amostras obtidas dos diferentes métodos de extração foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás GC-2010 Shimadzu equipado com uma coluna capilar Rtx-5ms (30 m x 0,25 mm e 0,25 µm) e um detector de ionização em chama (FID). As amostras, previamente diluídas com etanol a concentração de 1,0 mg/mL, foram injetadas no modo splitless. Com exceção da amostra obtida por extração supercrítica; pois esta foi diluída com isopropanol. A temperatura do forno foi a 60 ºC por 5 minutos, em seguida a temperatura foi elevada a 250 ºC com uma taxa de aquecimento de 5 ºC/min e permaneceu nesta temperatura por 17 minutos. O injetor foi mantido a 260 ºC e o detector a 280 ºC.

O Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,1mL/min. O percentual dos constituintes foi calculada através das áreas dos picos, sendo desconsiderado o pico referente ao solvente, utilizando-se apenas o percentual dos componentes identificados para comparação entre os métodos de extração utilizados.

A identificação dos componentes voláteis e semivoláteis dos óleos obtidos por diferentes métodos de extração e, da folha do orégano por SPME, foi realizada no cromatógrafo a gás e um espectrômetro de massas (GC-MS). A temperatura do injetor e a programação de temperatura do forno para a identificação dos componentes foi a mesma utilizada nas análises de composição por cromatografia. A ionização foi do tipo impacto de elétrons a 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi 240°C e da interface de transferência 230°C. A faixa de massas analisada foi entre 35 e 450 m/z. A identificação dos compostos foi feita pela comparação das massas de cada substância com as massas da biblioteca utilizada (NIST 05). Foram considerados apenas os componentes que apresentaram similaridade superior a 90% em relação aos fragmentogramas das bibliotecas utilizadas.

A composição do óleo foi obtida pela normalização das áreas abaixo dos picos cromatográficos, considerando o fator relativo de resposta (RRF – Relative Response Factor) do detector FID igual ao valor um para todos os componentes, procedimento comum para análises por cromatografia gasosa, como apresentado em Benkaci-Ali e outros (2007) e Cietti, Merle e Chaintreau (2008).

A determinação do Índice de Retenção de Kovats foi realizada nas mesmas condições utilizadas para as análises cromatográficas em CG-MS, utilizando-se solução padrão de alcanos saturados C7 - C30 (1000 mg/mL cada componente em Hexano), Sigma-Aldrich. Todos ao analitos eluiram durante o gradiente de temperatura. A equação utilizada foi:

$$I = 100n + 100n \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \right)$$

Onde:

I é o índice de Kovats; n é o número de carbonos do n-alcano com o tempo de retenção e; $t_{(Rz+1)}$ é o tempo de retenção do n-alcano localizado imediatamente após o padrão avaliado; t_{Rx} é o tempo de retenção da amostra; t_{Rz} é o tempo de retenção do n-alcano localizado antes do padrão avaliado

Foram utilizados 2 padrões como monoterpenos oxigenados (carvacrol e timol) além de 1 hidrocarboneto monoterpênico (sabineno hidratado), todos da Sigma-Aldrich, para confirmação desses compostos nas análises cromatográficas CG-MS, buscando-se a confirmação pelo tempo de retenção.

Essas análises cromatográficas assim como as análises de composição em fenólicos e atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Processos de Separação, Departamento de Engenharia Química, UFRRJ.

4.3.3 Análise quantitativa de timol, carvacrol e sabineno hidratado nos óleos essenciais obtidos.

Para análise quantitativa do timol, carvacrol e sabineno hidratado, foram realizadas análises por CG-FID com os referidos padrões obtidos da Sigma-Aldrich variando-se as concentrações (no total de 6 para cada padrão), para obtenção da curva de calibração relacionando a concentração com as áreas obtidas nas análises cromatográficas. As análises foram realizadas todas em triplicata e, a metodologia segue a descrita anteriormente.

4.3.4 Cinética de extração de timol por EFS

O procedimento de extração utilizado foi similar ao descrito no item 4.2.4, fixando-se a temperatura a 50ºC e variando-se a pressão, que foram de 120, 140 e 160 bar.

A coleta de amostra foi realizada em vials âmbar, contendo 20 mL de álcool isopropílico resfriado em banho termostático a 10 ºC, em intervalos de 5 a 120 minutos. Para cada pressão foram obtidos 9 tipos de amostragem do óleo extraído. Os vials contendo os extratos foram mantidos a 10 ºC para posteriores análises.

As análises foram realizadas em triplicata e, a metodologia segue a descrita anteriormente.

4.3.5 Determinação de compostos fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais das amostras foi determinada como descrito por Woisk e Salatino (1998), com adaptações. A cada 1,5 mL de amostras do extrato de orégano diluídas em etanol (0,02 a 0,5 mg/mL) foram adicionadas a 1,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10). Após 8 min, foram adicionados 1,2 mL de solução de carbonato de sódio a 4% (m/v) mantendo-se os tubos no escuro à temperatura ambiente por 2 h. Após esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância a 740 nm, utilizando-se um espectrofotômetro (Bell 1105). A concentração de fenólicos foi calculada utilizando-se um antioxidante sintético butil hidroxi tolueno (BHT) como referência.

A avaliação dos compostos fenólicos em alimentos é frequentemente realizada através do método de Folin-Ciocalteau. Este método é fundamentado na reação de oxidação-redução entre os polifenóis e o reagente de Folin da qual resulta um complexo de cor azul que ao absorver radiação a 740 nm permite a quantificação dos compostos fenólicos (MEDA et al, 2005). Quando as amostras apresentam baixa concentração de fenólicos, o complexo torna-se verde. Em concentrações mais baixas, torna-se amarelo, conforme a Figuras 16. Esta análise foi realizada ao abrigo de luz.

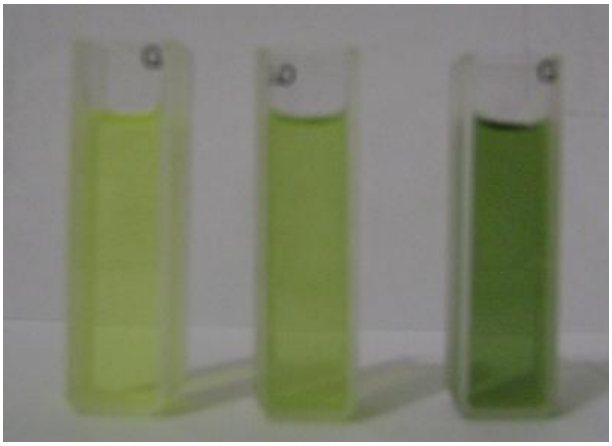


Figura 16 – Fotografia de amostras de óleo essencial de orégano utilizadas no método de Folin-Ciocalteau. Amostras amarelas apresentam menor concentração de fenólicos. Amostras verdes apresentam maior concentração de fenólicos.

4.3.6 Determinação da Atividade Antioxidante - Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A ação antioxidante pode ser determinada pela capacidade dos antioxidantes presentes na amostra captarem o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) (Figura 17), conforme as metodologias descritas por Meda e outros (2005), formando assim um composto de cor violeta (Figura 18).

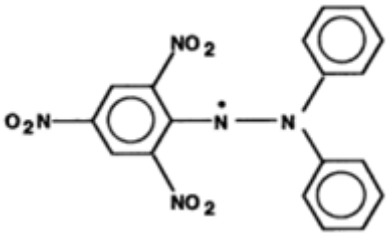


Figura 17 - Radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) (MOLYNEUX, 2004).

Figura 18 – Fotografia de amostras de óleo essencial de orégano e BHT utilizados na avaliação antioxidante (DPPH). Quanto mais intensa a cor violeta da amostra, menor será sua atividade antioxidante.

Para a avaliação da atividade captadora do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), alíquotas dos óleos essenciais diluídas em etanol e dos padrões ácido ascórbico e BHT foram diluídas com etanol para se obter as concentrações de 0,04 a 1,00 g/mL. A cada 3,0 mL de cada amostra foi acrescentado 0,1 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 1 mM. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 517 nm, contra um branco específico em cada avaliação, formado somente pelas amostras nas suas respectivas diluições. Como controle, foi utilizado 0,1 mL de solução etanólica de DPPH 1 mM e 3,0 mL de etanol.

Para avaliar a atividade captadora de radical, foi obtido o percentual de inibição, conforme a equação:

% de Inibição = [(Absorbância do controle - absorbância da amostra)/absorbância do controle] x 100.

Foi calculado o valor EC_{50}, que se refere à concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical livre.

4.3.7 Análise Térmica

A caracterização térmica das amostras foi realizada em analisador simultâneo termogravimétrico TA Instruments, modelo SDT 2960, que realizou as análises de TG

(termogravimetria), DTG (termogravimetria derivada) e DTA (análise térmica diferencial) simultaneamente. Uma massa de aproximadamente 10 mg de amostra foi analisada em atmosfera de nitrogênio, com razão de aquecimento de 10 ºC/ min, na faixa de temperatura entre 25 a 800 ºC.

A TG fornece informações acerca da composição e estabilidade térmica e é uma técnica considerada basicamente quantitativa, que é utilizada para medir variações de massa sofridas pela amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação), em função da temperatura e do tempo.

A DTG fornece a derivada primeira da curva termogravimétrica, em função do tempo ou da temperatura; $dm/dt = f$ (T ou t). Esta técnica permite uma melhor avaliação e visualização das curvas de TG.

A DTA registra os efeitos das transformações com ou sem variação de massa, pela diferença de temperatura entre a amostra que está sendo analisada e a amostra de referência, quando ambas são submetidas ao aquecimento ou ao resfriamento. As curvas apresentam as transições térmicas, reações exotérmicas ou endotérmicas, provocadas por mudanças de fase (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002).

A análise térmica TG, DTG e DTA foi realizada no Departamento de Processos Orgânicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.3.8 Análise das Cinzas das Amostras por Fluorescência de Raios X

As cinzas das amostras analisadas por analisador termogravimétrico foram irradiadas, utilizando-se a técnica de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF). As irradiações foram realizadas em um Espectrômetro de Fluorescência de Raios X, marca Shimadzu, modelo EDX-800 HS, equipado com tubo de raios X de Rh e Detector Si (Li). As seguintes condições de operação do equipamento foram selecionadas: automática para análise semi-quantitativa do Ti ao U e Na ao Sc; os valores usados para tensão e corrente do tubo foram de 50 kV e 1000 µA respectivamente e; os colimadores usados foram de 1mm, 3mm e 10 mm.

Essa análise foi realizada no Laboratório de Raios X no IEN, Ilha do Fundão, RJ.

4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.4.1 Atividade antimicrobiana

Para a pesquisa da atividade antibacteriana e antifúngica foram avaliados os óleos essenciais obtidos por diferentes métodos e os comparativos, óleo essencial de orégano padrão (Sigma-Aldrich), carvacrol, timol, sabineno, ácido benzoico, ácido sórbico e propionato de cálcio. As Cepas selecionadas foram: *Escherichia coli, Salmonella Tiphymurium, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Aspergillus niger, Penicilliun stolonifer,* todas obtidas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ.

A suspensão do inóculo foi preparada a partir de 3 transferências da cultura estoque congelada, nos caldos (BHI e Dextrose Batata) por 24 h a temperatura de 36 ºC para as bactérias e a 30 ºC para o fungo. A padronização dos inóculos foi feita pelo método de turbidimetria, correlacionando a suspensão preparada nas diluições de 1:10, 1:25, 1:50 e 1:100 em tampão fosfato com suas respectivas absorvâncias obtidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 580 nm.

A metodologia empregada foi a de difusão em Ágar, com a técnica de poços (Khosravi *et al*, 2011), com modificações. Após o endurecimento do Ágar, poços de 6 mm foram furados usando um furador de aço-inox estéril. Um volume de 50 µL de cada amostra, na concentração de 10 mg/mL em etanol, foi colocado separadamente em cada poço do Ágar (Soja Tripticaseína e BHI) inoculado com uma suspensão do inóculo de *ca* de 10^6 UFC/mL (UFC - unidade formadora de colônia). As placas foram então incubadas a 10 ºC por 24 horas para permitir que a amostra permeasse pelo Ágar. Logo após, foram incubadas em estufa com temperatura de 36 °C por 48 horas para as bactérias.

Para análise em relação aos fungos, as placas de petri contendo Agar Batata Dextrose (ABD) foram inoculadas com 0,1 mL em superfície com *ca* 10^6 UFC/mL de suspensão usando uma alça de Drigalsky esterilizada. As placas foram então incubadas a 10 ºC por 24 horas para permitir que a amostra permeasse pelo Ágar. Logo após, foram incubadas a 30 ºC por 96 h.

Em seguida, a atividade antimicrobiana foi medida como o diâmetro (mm) de zona clara de inibição do crescimento. Realizou-se a leitura dos halos de inibição para todos os micro-organismos avaliados com auxílio de um paquímetro. Esse procedimento foi realizado com 4 repetições e foi utilizado etanol absoluto como controle.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ.

4.4.2 Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura (MEV) dos Fungos tratados com óleo essencial e seus comparativos

A microscopia óptica dos fungos foi realizada para caracterização morfológica inicial. Pedaços do Ágar contendo os fungos desenvolvidos foram corados com azul de algodão e visualizados em Microscópio óptico AXIOCAM.

Mudanças morfológicas no fungo resultante do óleo essencial de orégano, carvacrol, timol, sabineno hidratado e propionato de cálcio, foram estudas por MEV. As amostras foram preparadas de acordo com Manzo e outros (2013), com modificações.

Das placas contendo ABD, inoculadas e incubadas, descrito previamente; foram obtidos por corte, pedaços de 1 cm^2 do ágar de áreas próximas da área de inibição. Esses cortes foram retirados da placa e colocados em um tubo teste contendo 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio com sacarose em pH 7,2; deixados por 24 h a temperatura ambiente para fixação. No dia seguinte, o tampão cacodilato foi removido de cada tubo e as amostras foram lavadas com 2 mL de água destilada por 10 min. por 3 vezes. As amostras foram então desidratadas em séries etanólicas de 15 a 100% de etanol com intervalos de 10 min. As amostras foram armazenadas a 10 ºC até a realização das análises microscópicas. No momento do estudo, os pedaços de Ágar desidratados foram colocados em adesivos de carbono fixados nos stubs e cobertos com ouro. As imagens de MEV foram obtidas com microscópio eletrônico de varredura FEI, modelo Quanta 200, trabalhando sob condições de alto vácuo, a 20 kV de tensão de aceleração de elétrons, distância de 10 mm e abertura final (spot size) de 4 mm; sendo as imagens formadas pelo detector de elétrons secundários (ETD - Everhart-Thornley Detector).

O preparo das amostras assim como a microscopia óptica foi realizado na EMBRAPA AGROBIOLOGIA – Seropédica/RJ; as análises por MEV no Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ).

4.5 APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM ALIMENTO

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), campus Venda Nova do Imigrante.

A adição de farinha de chia na elaboração de farinha mista para uso em produtos de panificação, justifica-se pelo aumento nutritivo do produto, pois a chia (*Salvia hispanica* L.) é uma semente rica em ácidos graxos altamente insaturados, sendo o linoleico (17-26%) e o α-linolênico (50-57%) os principais (RODEA-GONZÁLEZ et al, 2012).

4.5.1 Seleção de formulação de pães de forma contendo farinha mista de trigo e chia para aplicação de óleo essencial de orégano

Foram utilizadas como matérias-primas farinha de trigo especial (FT) e farinha de chia (FC) adquiridas no comércio de Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo. As farinhas mistas foram preparadas pela substituição parcial da FT pela FC nas proporções de 100:00 (Controle, F0), 95:05 (F5) e 90:10 (F10) e 85:15 (F15).

As formulações dos pães são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Ingredientes utilizados na formulação de pão de forma de farinha mista de trigo e chia.

Ingredientes (%)	Formulações*			
	F0	F5	F10	F15
	padrão	*5% farinha de chia*	*10% farinha de chia*	*15% farinha de chia*
Farinha de trigo	100	95	90	85
Farinha de chia	0	5	10	15
Sal refinado	1,5	1,5	1,5	1,5
Açúcar refinado	6	6	6	6
Fermento biológico	2	2	2	2
Margarina	6	6	6	6
Leite em pó	3	3	3	3
Água	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.

* Porcentagem dos ingredientes em relação a 100 % do peso total da farinha mista.

q.s.p. - Quantidade suficiente para.

Os ingredientes foram misturados em misturadora de massas, com batedor tipo gancho em duas etapas: na primeira, foram misturados os ingredientes secos durante dois minutos e em seguida a água foi adicionada. Após um minuto de mistura foi acrescentada a margarina, prosseguindo a mistura por mais cinco minutos. Após a formação de uma massa lisa e homogênea, foram retiradas três amostras de cada formulação, boleadas, cilindradas, modeladas, enformadas, submetidas à fermentação e assamento por 175 ºC por 18 min (forno a gás, G. Paniz, modelo FTG 120).

4.5.2 Produção e avaliação do pão de forma à base de farinha mista de trigo e chia e aromatizado com óleo essencial de orégano em panificadora comercial

A partir dos resultados obtidos no item 4.5.1, de teste de panificação experimental e seleção de formulação contendo farinha mista de trigo e chia; foi selecionada uma formulação contendo FC para produção comercial na cidade de Venda Nova do Imigrante-Espírito Santo, seguido de realização de teste de aceitação sensorial e intenção de compra. Uma amostragem desses pães foi retirada para análises físico-químicas e microbiológicas.

O critério de seleção da formulação foi o de maior teor de farinha de chia com possível aplicação nos equipamentos utilizados em escala comercial.

4.5.3 Análises físico-químicas do pão de forma - Composição centesimal

A composição centesimal foi realizada segundo a metodologia da AOAC, sendo umidade (Método 925-10, AOAC 1996); lipídios (Método 920-85, AOAC 1996) proteína (Método 960-52, AOAC 1996), cinzas (Método 923-03, AOAC 1996) e carboidratos determinado por diferença [100 - (umidade + lipídios + proteína bruta + cinzas)].

Essas análises foram realizadas no laboratório de físico-química, no Instituto Federal Fluminense (IFF) campus Bom Jesus, RJ.

4.5.4 Análises microbiológicas do pão de forma

A primeira observação a ser feita foi a de fungos visíveis, ou seja, crescimento de fungos sobre a superfície do pão, que ocorreu quando as contagens de fungos foram *ca* de 10^4 UFC/g.

4.5.5 Teste de aceitação sensorial e intenção de compra dos pães de forma

A formulação selecionada de pão de forma com farinha mista de trigo e chia, foi utilizada para produção de 3 diferentes tipos de pães para análise sensorial: pão de forma sem adição de óleo essencial, pão de forma aromatizado com 0,02% de óleo essencial de orégano na massa e pão de forma aromatizado com 0,02% de óleo essencial aspergido no pão após assado.

O teste com as amostras foi conduzido no Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Venda Nova do Imigrante – ES, fornecendo-se aleatoriamente, de forma monádica uma fatia de pão para 60 provadores não treinados por formulação avaliada, habituados ao consumo de pão de forma, com faixa etária de 18 a 60 anos (Figuras 19-20).

Figura 19 – Cabines para provadores em análise sensorial.

Figura 20 – Cabines para provadores em análise sensorial.

Para a aceitação sensorial foram considerados os atributos aroma, cor, aparência, sabor, textura e impressão global, utilizando-se de escala hedônica estruturada de nove pontos (ANZALDÚA-MORALES, 1994) e intenção de compra (Figura 21).

O cálculo do índice de aceitabilidade (IA), foi realizado a partir da expressão: IA (%) = A x 100/B, onde A representa a nota média obtida para o produto, e B é a nota máxima dada ao produto. Para que o produto seja aceito quanto as características sensoriais, seu índice de aceitabilidade deve ser igual ou superior a 70% (TEIXEIRA et al, 1987).

4.5.6 Analises estatísticas

A separação significativa dos valores foram avaliados pelo teste de Tukey, usando o programa estatístico XLSTAT 2010, para determinação da diferença significativa a 5%. Com exceção da avaliação da composição centesimal dos pães de forma aromatizados, onde foi verificada a diferença significativa a 5% pelo teste de Dunnett.

TESTE DE ACEITAÇÃO SENSORIAL E INTENÇÃO DE COMPRA

Data: ___ /____/ ____.	**Sexo: M ( ) F ( )**	**Idade:** _____ a.

1. TESTE DE ACEITAÇÃO

Por favor, prove a amostra de Pão de Forma contendo Chia e aromatizado com óleo de Orégano e avalie as características à direita de acordo com a escala à esquerda.

9- Gostei extremamente
8- Gostei muito
7- Gostei moderadamente
6- Gostei ligeiramente
5- Indiferente
4- Desgostei ligeiramente
3- Desgostei moderadamente
2- Desgostei muito
1- Desgostei extremamente

Atributos	**Nota**
Cor	_____
Aroma	_____
Sabor	_____
Textura	_____
Impressão global	_____

Comentários:

_____

_____

_____

2. INTENÇÃO DE COMPRA

Indique na escala abaixo sua atitude se encontrasse este produto a venda. **Se eu encontrasse Pão de forma contendo Chia e aromatizado com óleo de Orégano** a venda, eu:

Opinião	**Avaliação**
Certamente compraria	( )
Provavelmente compraria	( )
Tenho dúvidas se compraria	( )
Provavelmente não compraria	( )
Certamente não compraria	( )

Comentários:

_____

_____

_____

Figura 21 – Ficha sensorial para avaliação do pão de forma com farinha mista de trigo e chia, aromatizado com óleo de orégano.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CÁLCULO DO DIÂMETRO MÉDIO DE SAUTER DAS FOLHAS DE ORÉGANO DESIDRATADO

O diâmetro médio das folhas secas de orégano utilizadas para extração de óleo essencial foi avaliado através da análise granulométrica, utilizando-se um conjunto de peneiras e calculando o diâmetro médio de Sauter que foi de 1,69 mm. Na Tabela 10, são mostrados os dados desta análise.

Tabela 10 – Dados utilizados para cálculo do diâmetro médio das folhas secas de orégano (diâmetro médio de Sauter).

Abertura das peneiras		**Massa retida (g)**	***Xi* (fração de massa) (%)**
Mesh	$\bar{d}_i$ **(mm)**		
-2	7,93	2,99	7,47
-2+4	6,34	3,68	9,20
-4+7	3,78	7,18	17,95
-7+12	2,25	10,03	25,08
-12+18	1,35	6,68	16,70
-18+32	1,13	6,00	15,00
-32	0,56	3,44	8,60

5.2 EXTRACAO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DA FOLHA DE ORÉGANO DESIDRATADA POR HS-SPME

Estas análises foram realizadas para identificação inicial dos componentes característicos da planta aromática orégano, possíveis de serem extraídos nos diferentes óleos essenciais obtidos por diferentes métodos de extração, que serão objetos de estudos e aplicação deste trabalho.

O fato da SPME por headspace ser indicada para analitos de média e alta volatilidade (VALENTE e AUGUSTO, 2000), explicam o uso do método utilizado ser SPME por headspace.

5.2.1 Avaliação das fibras para SPME

Os resultados da composição química da folha desidratada de *Origanum vulgare* L (obtida por HS-SPME/CG-MS) estão apresentados na Tabela 11 e descrevem os 58 diferentes componentes voláteis do orégano, obtidos por HS-SPME da planta desidratada e triturada, caracterizados por CG-MS, utilizando-se quatro fibras: polimetilasiloxano (PDMS 100 µm), carboxen-polidimetilasiloxano (CAR-PDMS, 75 µm), polidimetilasiloxano-divenilbenzeno (PDMS-DVB, 65 µm) e poliacrilato (PA, 85 µm). As folhas desidratadas de orégano foram trituradas, e homogeneizadas, normalmente quanto menor o tamanho das partículas da matriz, mais eficiente é a extração de seus analitos (MAGGI et al, 2010). Essas análises foram realizadas de acordo com as condições citadas (temperatura de extração, 20 °C; tempo de extração, 60 min; massa da planta desidratada, 0,5 mg; tempo de dessorção, 4min).

Tabela 11 – Composição química da folha desidratada de *Origanum vulgare* L. (obtida por HS_SPME/CG-MS)

Compostos	TR (min)	Composição de voláteis/ Fibras							
		PDMS		PDMS DVB		PDMS CAR		Poliacrilato	
		Conteúdo relativo (%)	Área do pico (10^6)	Conteúdo relativo (%)	Área do pico (10^6)	Conteúdo relativo (%)	Área do pico (10^6)	Conteúdo relativo (%)	Área do pico (10^6)
Tujeno	8,091	1,32	6,33	6,21	38,99	2,98	4,54	-	-
α-Pineno	8,347	0,26	1,25	1,44	9,02	4,97	7,30	-	-
Canfeno	8,867	-	-	0,09	0,04	0,25	0,37	-	-
β-Pineno	9,754	3,20	15,35	6,3	39,56	0,37	1,47	0,36	0,14
β-Felandreno	9,875	0,01	0,04	0,86	5,40	2,97	4,48	-	-
3-Octanona	10,027	1,45	7,51	0,19	1,16	-		-	0,00
β-Mirceno	10,344	2,46	11,84	3,88	31,84	1,69	2,52	0,43	0,17
3-Octanol	10,693	0,36	1,62	0,81	5,09	-	-	-	-
α-Felandreno	10,850	0,45	2,17	1,14	24,39	0,87	1,25	-	0,00
α-Terpineno	11,075	0,12	0,56	0,29	5,09	0,86	1,27	-	0,00
β-Cimeno	11,289	1,78	8,57	6,72	42,20	-	-	0,27	0,10
o-Cimeno	11,574	1,70	8,17	6,58	41,35	4,08	7,95	0,98	0,38
β Felandreno	11,650	-	-	-	-	2,83	5,57	-	-
D-Limoneno	11,731	-	-	6,13	38,50	0,33	0,91	0,54	0,21
p-Cineol	11,851	0,46	2,23	0,5	3,17	3,34	6,37	-	-
1,8 cineol	12,021	2,87	13,77	6,34	39,81	3,30	6,45	1,60	0,62
β-trans-Ocimeno	12,397	1,22	5,85	1,49	9,34	1,39	1,90	0,13	0,05

β-cis-Ocimeno	12,650	-	-	-	-	8,55	11,70	-	-
γ-Terpineno	12,806	4,71	22,62	11,72	73,72	6,495	10,59	1,68	0,66
cis-Sabineno hidratado	13,112	2,16	10,37	1,11	6,95	10,13	13,86	0,61	0,24
Terpinoleno	13,853	0,56	2,68	2,02	12,69	10,93	14,98	-	-
trans-Sabineno hidratado	14,245	18,99	91,28	14,04	77,94	5,74	6,96	8,11	3,16
trans-p-Menten-2-ol-1	15,000	0,10	0,48	0,11	0,67	-	-	-	-
cis-p-Menten-2-ol-1	15,195	0,56	2,71	1,33	8,36	-	-	0,22	0,09
β Terpineol	16,432	-	-	0,32	1,98	1,78	2,79	2,84	1,11
Borneol	16,540	0,19	0,93	0,14	0,87	0,23	0,44	-	-
Terpinen-4-ol	16,890	0,98	4,72	0,07	5,28	0,52	1,14	0,39	0,15
p-cimen-8-ol	17,100	-	-	0,84	-	1,76	0,28	-	-
α-Terpineol	17,312	1,42	6,82	0,67	4,23	0,16	0,11	0,89	0,35
Decanal	17,697	0,09	0,41	0,11	0,68	-	-	-	-
trans-piperitol	17,857	0,04	0,18	0,03	0,22	-	-	-	-
cis-Geraniol	18,223	0,05	0,26	0,07	0,43	-	-	-	-
Timol metil éter	18,653	3,21	15,41	1,21	7,59	0,93	3,36	0,93	0,36
Lemonol	18,944	1,65	7,93	1,29	7,62	-	-	0,54	0,21
Bergamiol	19,264	11,92	57,24	3,37	40,24	1,21	1,65	3,39	1,32
1,4 Benzenediol	19,901	5,64	0,00	0,03	0,22	-	-	-	-
Timol	20,390	0,23	22,07	3,47	21,16	2,16	3,71	38,82	15,15
Carvacrol	20,681	0,08	2,10	0,36	2,21	0,04	0,25	7,82	3,05
Geraniol éster	22,112	0,08	0,37	0,06	0,40	-	-	-	-
α-Copaeno	22,963	1,63	7,81	0,07	0,44	1,20	1,65	-	-
β-Bourboneno	23,238	0,43	2,09	0,06	0,38	0,53	1,05	-	-
β-Cubebeno	23,363	0,36	1,75	0,04	0,24	0,11	0,18	-	-
β-Elemeno	23,854	0,06	0,10	0,02	0,18	-	-	-	-
β-Cariofileno	24,237	6,64	31,91	1,18	7,29	7,80	15,03	0,57	0,22
β-Gurjuneno	24,459	-	-	0,18	1,06	-	-	-	-
γ Elemeno	24,657	0,08	0,38	0,03	0,23	0,12	0,24	-	-
α-Humuleno	25,155	0,89	4,27	0,19	1,91	0,06	0,08	-	-
Germacreno D	25,786	6,47	31,07	0,58	4,04	0,13	0,25	1,36	0,53
α-Muuroleno	25,807	0,25	1,19	0,07	0,48	0,83	0,82	-	-
Germacremeno B	26,710	0,11	0,52	0,55	3,45	-	-	0,68	0,27
γ Cadineno	26,759	0,16	0,79	0,22	1,37	0,05	0,07	-	-
γ Muuroleno	26,889	0,23	0,95	0,61	0,95	-	-	-	-
β-Cadineno	26,906	0,43	2,07	0,36	2,29	-	-	-	-
Espatulenol	28,394	0,09	0,48	1,30	3,29	-	-	-	-
Óxido de Cariofileno	28,558	0,20	1,11	0,15	0,92	-	-	0,38	0,15
Trans-β-Elemenono	29,109	0,07	0,35	0,15	0,92	-	-	1,25	0,49
epi-α-Cadinol	29,599	0,09	0,42	0,05	0,31	-	-	0,5	0,19
Selin-11-en-4- α-ol	30,173	0,24	0,95	0,21	1,49	-	-	0,12	0,05
Total		88,75	422,06	97,36	639,67	91,695	143,55	75,41	29,40
SRD (%)		6,9		5,2		11,2		12,4	
Total de componentes	58	51		55		37		25	

TR – Tempo de retenção.
- não detectado

As fibras de PDMS e PDMS-DVB apresentaram os melhores resultados em termos de números de compostos identificados (51, 55), área total dos picos (422,06 x 10^6; 639,67 x 10^6), e menor erro apresentado com RSD% (6,9; 5,2) (Tabela 21).

PDMS é uma fase estacionária da fibra que é conhecida por abranger uma ampla faixa de extração de analitos, polar como apolar, além de apresentar uma forte capacidade de retenção (STEFFEN; PAWLISZYN, 1996; LORD; PAWLISZYN, 2000). Quando esta fase é PDMS-BVB, o resultado é uma polaridade relativamente menor, entretanto, é capaz de extrair compostos polares e aminas (SHIRLEY, 2000).

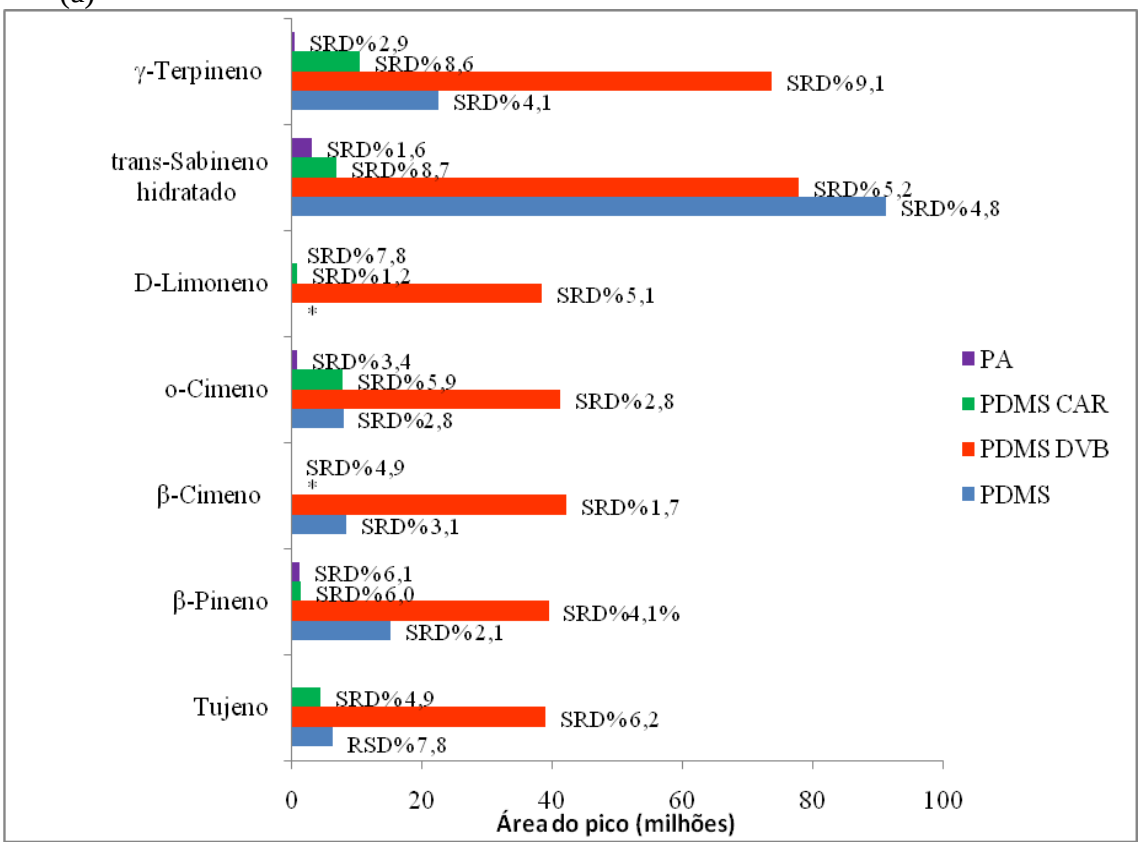
Em relação ao percentual total de compostos identificados as melhores fibras foram PDMS-DVB (97,36%) e PDMS-CAR (91,69%). Ambas apresentam recobrimento bi-polar, entretanto a fibra PDMS-CAR apesar de apresentar maior sinal de resposta (área) para compostos voláteis de baixo peso molecular entre C2-C12, apresentam retenção de moléculas maiores (>C12) que ficam retidos na superfície da partícula de Carboxen e embebedam a cobertura, dificultando assim a desorção dos analitos (PERERA; MARRIOT; GALBALLY, 2002). Este fato está de acordo com os resultados obtidos, pois esta fibra apresentou um número menor de compostos de maior peso molecular identificados.

E, a fibra PA apresentou o menor número de compostos identificados (25), assim como menor percentual total de compostos identificados (75,41%). Esta fibra apresenta maior fase polar, e consequentemente extrai mais analitos polares (STEFFEN; PAWLISZYN, 1996).

Assim, a partir desses resultados a fibra de PDMS-DVB foi escolhida para a sequência das análises (otimização).

As Figuras 22a e 22b apresentam os principais compostos voláteis identificados do orégano. Os compostos de maior área do pico relativo e percentual identificado foram trans-sabineno hidratado (91,28 x 10^6; 18,99%), γ-terpineno (73,72 x 10^6; 11,72%) e bergamiol (57,24 x 10^6; 11,92%). A maioria dos compostos apolares como os terpenos alifáticos, γ-terpineno, β-pineno e β-cymeno, apresentaram maior área do pico relativo nas fibras não-polares PDMS ou bi-polares PDMS-DVB. O composto oxigenado carvacrol por ser mais polar, apresentou maior área total do pico relativo e maior percentual de identificação com a fibra polar de PA (3,05 x 10^6; 7,85%); assim como o timol que apresentou melhor acúmulo do composto com percentual elevado de 38,82%, com SRD% de 6,8%.

(a)



(b)

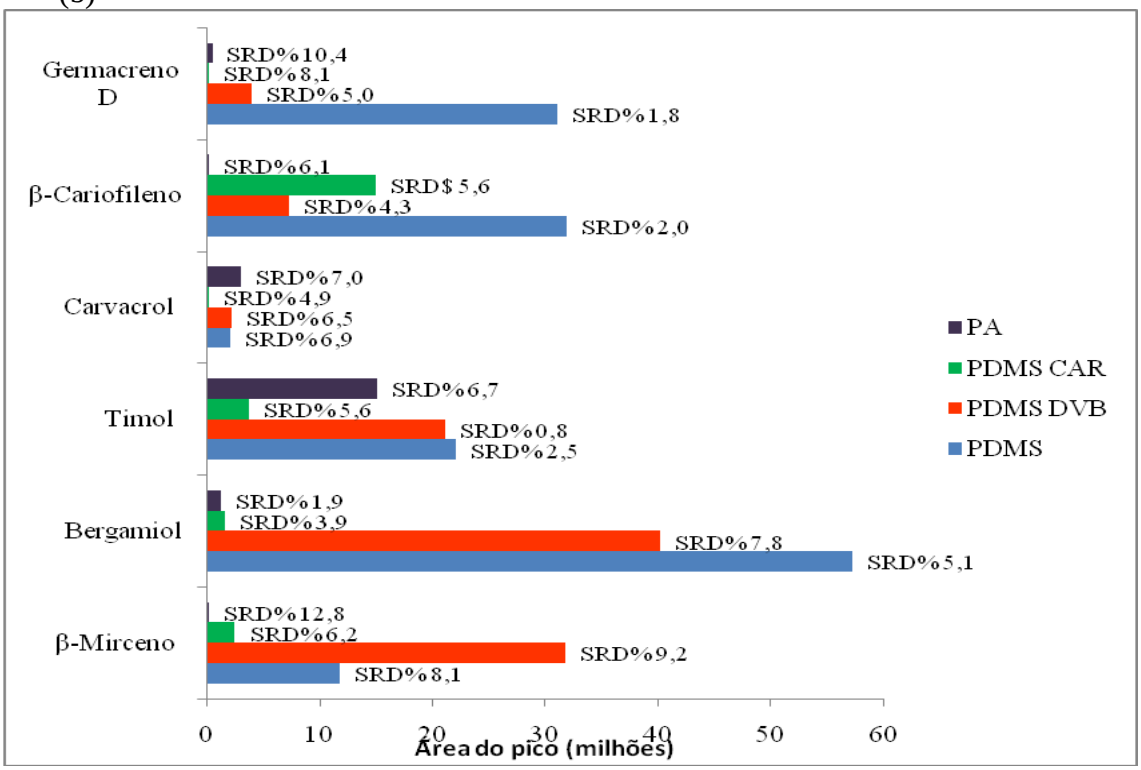


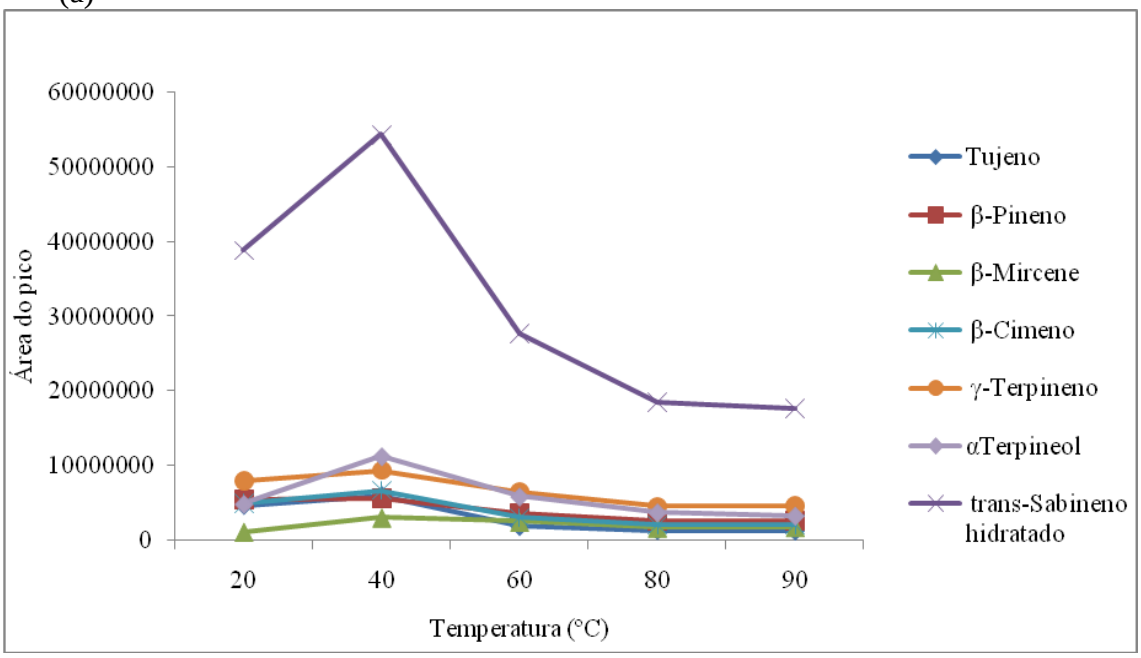
Figura 22 – Efeito da fibra utilizada (PDMS, PDMS-DVB, PDMS-CAR, PA) na extração dos principais compostos identificados por HS-SPME da folha de orégano desidratado por SPME.

Valores do coeficiente de partição entre a fase estacionária da fibra e o headspace de β-cariofileno (K_{fh}) relatados por Bicchi, Drigo e Ribiolo (2000), podem explicar os melhores resultados obtidos para este composto com as fibras PDMS e PDMS-CAR (Fig. 22b). Maiores valores de K_{fh} para PDMS (8,0 x10^4) e PDMS-CAR (7,3 x 10^4) foram encontrados em relação a PDMS-DVB (4,9 x10^4) e PA (2,0 x10^4) para este composto a temperatura de extração de 60 °C e dessorção de 230 °C. Esta temperatura de dessorção está próxima a utilizada no trabalho (250 °C) e é considerada uma temperatura dentro das faixas ideais para todas as 4 fibras utilizadas (Supelco, 1996).

5.2.2 Otimização da temperatura de extração para o método HS-SPME

Os principais compostos extraídos com a fibra escolhida PDMS-DVB, e seu perfil de extração de acordo com o aumento da temperatura de 20 °C até 90 °C, com um tempo fixo de extração de 40 min., estão apresentados na Figura 23. Para esta avaliação o tempo de adsorção (extração) utilizado foi menor que o utilizado para a avaliação das fibras (60 min) pois, para as fibras utilizadas, a PA normalmente necessita de um tempo de equilíbrio maior de até 60 min e as de PDMS um menor tempo de até 40 min dependendo do método ser direto ou de headspace (STEFFEN; PAWLISZYN, 1996). Além disso, são relatados tempos para equilíbrio de até 1 h (SPME direta) e até 40 min (SPME headspace) (MARTOS e PAWLISZYN, 1997), que podem ser reduzidos de acordo com a otimização realizada.

(a)



(b)

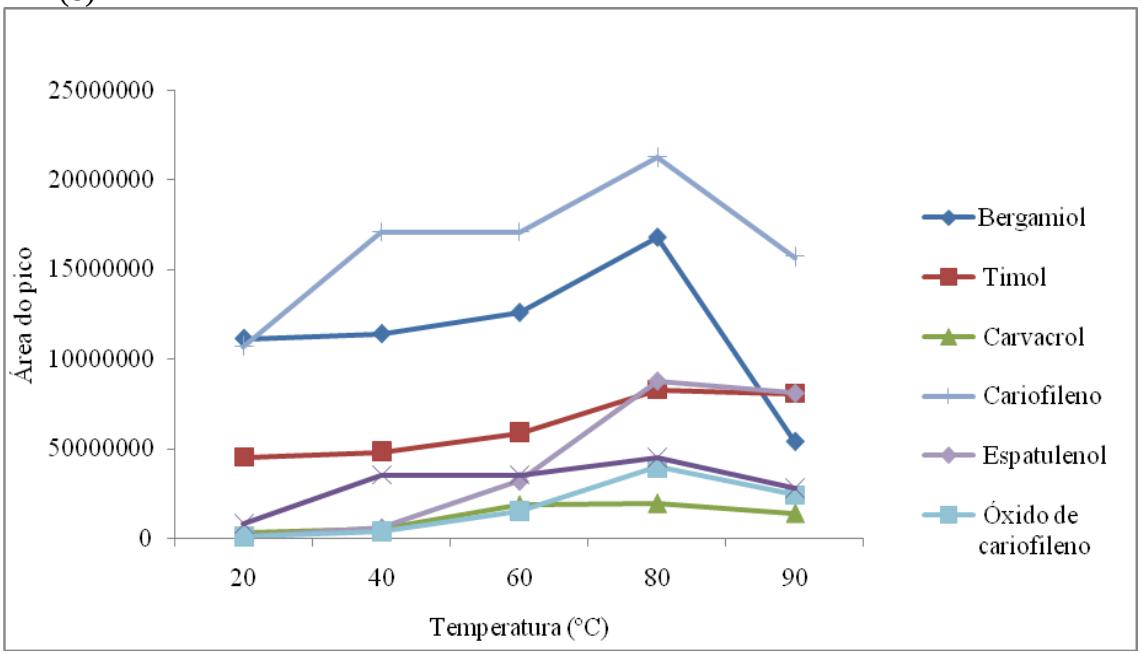


Figura 23 - Efeito da temperatura na extração nos principais compostos identificados no headspace da folha de orégano desidratado por SPME, utilizando a fibra PDMS-DVB por 40 min. (a) Compostos com tempo de retenção menor que 17,6 min (voláteis), (b) compostos com tempo de retenção maior que 17,6 min (semi-voláteis).

A temperatura é um parâmetro muito importante a ser otimizado. Em geral, um aumento na temperatura de extração acarreta no aumento da concentração dos analitos no headspace (MAGGI et al, 2010).

Este fato foi verificado apenas para os compostos com tempo de extração acima de 17,6 min, (Fig. 23b), considerados semi-voláteis, apresentam um aumento da extração com o aumento da temperatura, apresentando uma temperatura ideal de 80 °C. Como exemplos podem ser citados o β-cariofileno, timol e carvacrol; que apresentaram uma área relativa ao pico de 212,78 x 10^6, 82,71 x 10^6, 19,50 x 10^6, respectivamente.

Por outro lado, os compostos extraídos antes de 17,6 min (antes do composto decanal), considerados voláteis, apresentaram uma melhor temperatura de extração de apenas 40 °C (Fig. 24 a), como o trans-sabineno hidratado que apresentou uma área relativa ao pico elevada nesta condição de extração de 54,33 x 10^6. As temperaturas mais altas podem deslocar o equilíbrio no sentido headspace levando a uma diminuição de voláteis adsorvidos por fibras (MAGGI et al, 2010).

Este perfil em HS-SPME de acordo com a temperatura e o tempo de retenção, foi relatado por Nardini e outros (2012) para frutas cítricas. O estudo dividiu dois grupos, voláteis (entre 0 e 17,5 min) e semi-voláteis (acima de 17,6), com duas temperaturas ideais de extração, 5 °C e 50 °C.

5.2.3 Otimização do tempo de extração para o método HS-SPME

Para investigar o tempo de dessorção requerido para uma maior extração dos compostos do orégano por HS-SPME, foi utilizada a fibra escolhida PDMS-DVB e a temperatura de 80 ºC, por apresentar um melhor resultado para compostos com maior bioatividade comprovada como carvacrol e timol. O perfil de extração dos principais compostos extraídos nestas condições, variando-se o tempo de extração de 20 min até 60 min está apresentado na Figura 24.

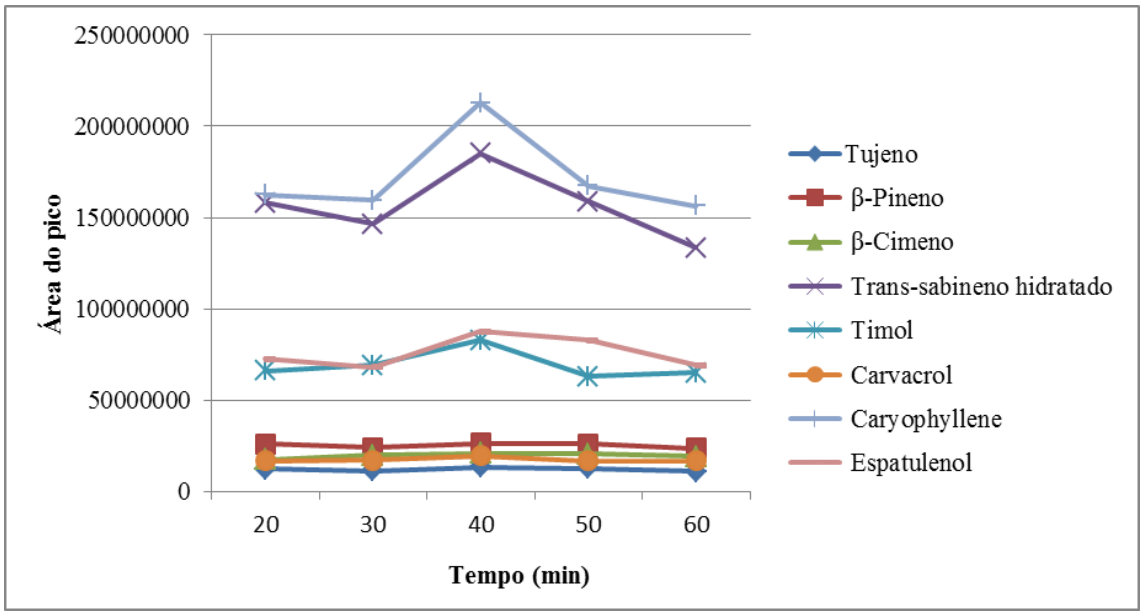


Figura 24 - Efeito do tempo de extração nos principais compostos identificados no headspace da folha de orégano desidratado por SPME, utilizando a fibra PDMS-DVB a 80 °C.

Os compostos que apresentaram elevada área do pico relativo como β-cariofileno, e trans-sabineno hidratado apresentaram valores maiores no tempo de dessorção de 40 min, com um aumento de 170 % e 31%, respectivamente, comparados com 20 °C. Os compostos bioativos carvacrol e timol também apresentaram melhores resultados neste tempo, com área total do pico relativo de 82,71 x 10^6 e 19,50 x 10^6 e, com aumento de *ca* 25% e 16%, respectivamente, comparados com 20 °C.

5.2.4 Otimização da temperatura em um mesmo procedimento de extração

Baseado nos resultados obtidos da otimização da temperatura e tempo de extração, foi utilizado uma extração otimizando-se a temperatura em um mesmo procedimento a fim de aumentar as áreas dos picos relativos aos compostos identificados, voláteis e semi-voláteis.

Assim em um mesmo procedimento foi utilizado a fibra PDMS-DVB para HS-SPME da folha de orégano a 80 ºC por 20 min, seguida de uma condição de extração de 40 °C por 20 min.; totalizando-se um tempo de 40 min (ideal) e utilizando-se as duas melhores temperaturas para este trabalho.

Os resultados estão apresentados na Figura 25, com os principais compostos identificados voláteis ou semi-voláteis, apresentando um aumento na área do pico relativo, ou

valor próximo ao obtido na temperatura anteriormente considerada ideal para cada grupo, 40 ºC e 80 ºC.

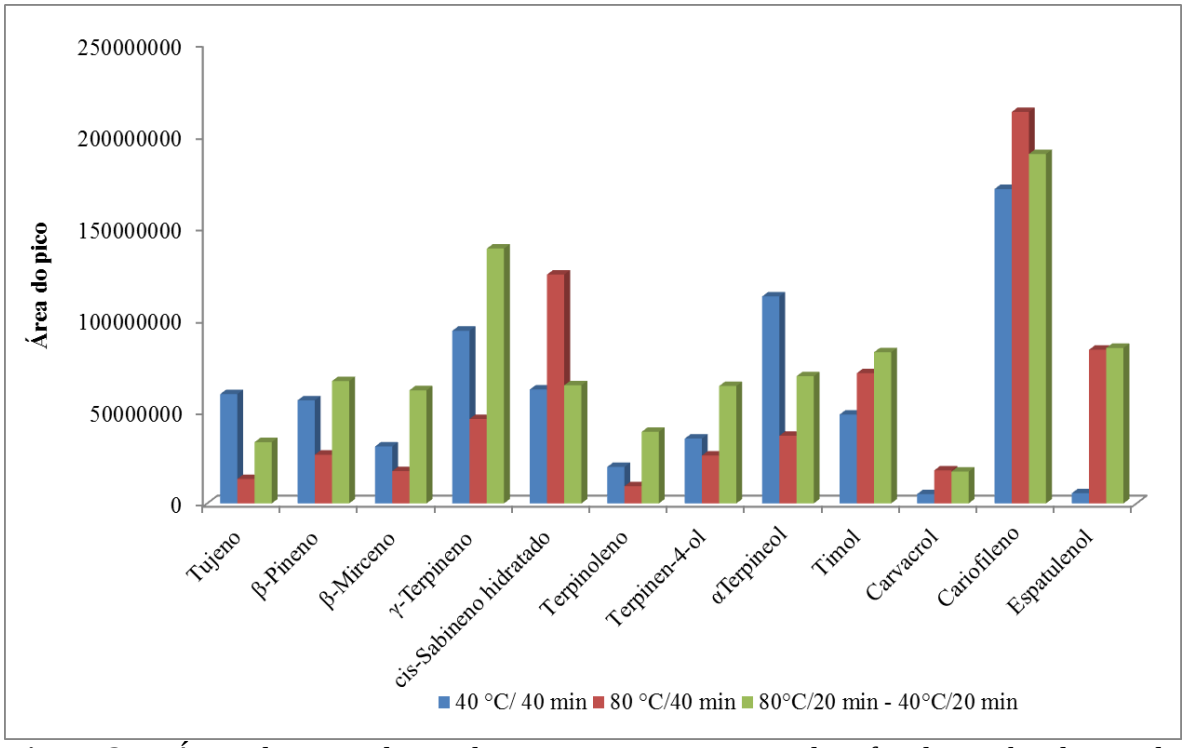


Figura 25 – Áreas do pico relativo dos principais compostos identificados no headspace da folha de orégano desidratado por SPME, utilizando a fibra PDMS-DVB, com a temperatura inicial de 80 °C/20 min e, temperatura final de 40 °C/20 min.

De acordo com Nardini e outros (2012) uma diminuição da temperatura pode favorecer a adsorção de compostos na fibra, neste caso o favorecimento ocorrerá para os voláteis após a adsorção dos semi voláteis. Como exemplo pode ser citado o γ-terpineno, que apresentou um valor de área total do pico nesta condição de otimização de 138,54 x 10^6, maior que o encontrado a 40 ºC (ideal para este composto) que foi de 93,87 x 10^6.

5.3 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A desidratação da amostra a 45 ºC por 24h, apresentou um rendimento de 13,49±0,69 % em folhas desidratadas de orégano (Tabela 12). Esta é uma etapa importante que antecede o processo de extração de compostos de interesse, como os antioxidantes; pois além de aumentar a superfície de contato com o solvente, inativa as enzimas lipoxigenase que são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática (JUNTACHOTE; BERGHOFER, 1985).

Tabela 12 - Rendimento em óleo essencial de orégano dos extratos obtidos por hidrodestilação e por Soxhlet com etanol.

Óleo de orégano	**Rendimento (%p/p de massa desidratada) ± DP**	**Tempo de extração (h)**	**Cor e aspecto**
Água (hidrodestilação)	4,55±0,02[a]	2	Amarelo escuro /óleo
EFS (CO_2/ 50°C/ 120 bar)	5,33±0,42[b]	2	Amarelo claro/ óleo
Hexano (Soxhlet)	7,17±1,04[c]	6	Marrom/oleoresina
Hexano (Soxhlet)	8,67±1,36[d]	4	Marrom/oleoresina
EFS (CO_2/ 50°C/ 160 bar)	13,33±0,07[e]	2	Amarelo claro/ óleo
Etanol (Soxhlet)	19,25±1,39[f]	4	Verde escuro/ oleoresina
Etanol (Soxhlet)	26,49±3,71[g]	6	Verde escuro/ oleoresina

DP- Desvio padrão (n = 4). Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação aos rendimentos dos óleos essenciais, os que apresentaram menor rendimento foram os extraídos por hidrodestilação (2 h) e por Soxhlet com etanol (4 e 6 h) e SFE com CO_2 (50 °C/ 2h, pressões de 120 e 160 bar) estão apresentados na Tabela 12. Esses dados foram expresso em mg de óleo extraído por 100 mg de orégano desidratado.

A extração com Soxhlet com etanol apresentou um maior rendimento em relação à hidrodestilação e EFS. Além disso, a extração com etanol apresentou um aumento no rendimento da extração do óleo com o aumento no tempo de extração de 4 para 6 horas (19,25±1,39 e 26,49±7,71 %p/p). O aumento da temperatura durante a extração muda as propriedades dos solventes e aumentam a eficiência na transferência de massa. Dessa forma, extratos obtidos por plantas com compostos de elevado peso molecular (EXARCHOU; NENADIS; TSIMIDOU, 2002). como as oleoresinas e pigmentos (proporcionando cor verde a oleoresina), considerados como resíduos para alimentos e perfumes, são obtidos com solventes orgânicos; aumentando o rendimento do extrativo obtido por este método.

A hidrodestilação foi o método utilizado que apresentou o menor rendimento em extração de óleo de orégano (4,55±0,02 %p/p). Normalmente um aumento no tempo de extração pode aumentar o rendimento da extração, como citado para Soxhlet com etanol, entretanto para este trabalho o tempo de extração de 2 h praticamente esgotou o óleo a ser extraído e, além disso, acima desse tempo, o óleo apresentou-se descaracterizado com cor mais escura e *off-flavour*.

Resultados próximos foram obtidos por Bayramoglu e outros (2008), que relataram uma extração de 0,048 mL de óleo/g orégano, por hidrodestilação por 3 h.

O óleo essencial de ervas aromáticas é tradicionalmente obtido por hidrodestilação, destilação a vapor ou extração por solvente. Esses processos tem baixo custo, mas podem induzir a hidrólise e degradação de alguns constituintes do óleo essencial. Estas desvantagens podem ser evitadas utilizando a extração com fluido supercrítico (EFS) (REVERCHON, 1997). O óleo obtido por EFS a 50 ºC/160 bar por 2 h apresentou características melhores (amarelo claro) em relação aos outros extratos obtidos. Os extratos obtidos por EFS podem manter as característica sensoriais do material de partida (BILJAN; ZIKA; VLADIMIR; ALEKSANDAR, 2005).

De acordo com Fornari e outros (2012), o tempo de extração de 1,76 h a 330 K e 30 MPa, é ideal para extração por EFS de óleo essencial de orégano e salsa; essas são condições próximas as utilizadas.

5.4 ANÁLISE DAS GLÂNDULAS SECRETORAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO POR MEV.

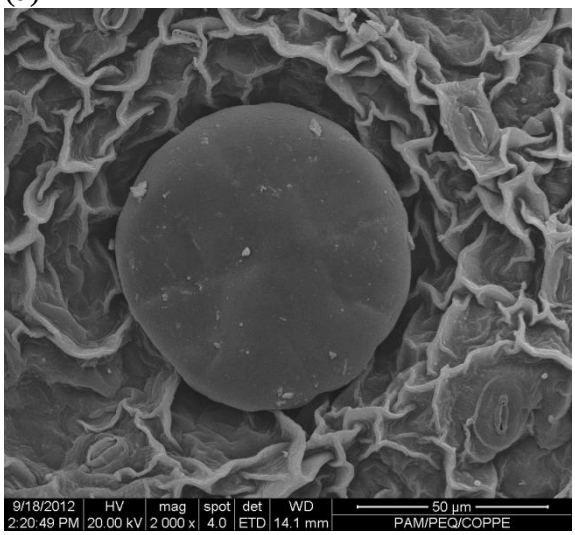
Os diferentes métodos de extração (Hidrodestilação, Soxhlet e EFS) produziram diferentes mudanças na amostra de orégano desidratado.

As fotomicrografias obtidas por MEV da planta desidratada não utilizada para extração são apresentadas na Figura 26. As estruturas podem ser comparadas com as amostras após o uso nos diferentes métodos de extração. As amostras não utilizadas para extração apresentam tricomas glandulares de *ca* 70 µm localizadas predominantemente na superfície abaxial em depressões nas superfícies foliares. Essas estruturas secretoras do óleo essencial apresentam-se arredondadas e cheias nas Figuras 26, entretanto algumas se apresentaram com aspecto de vazias, modificadas com perda do óleo (Fig. 26c). Isso pode ser explicada pela desidratação que pode ter rompido algumas glândulas.

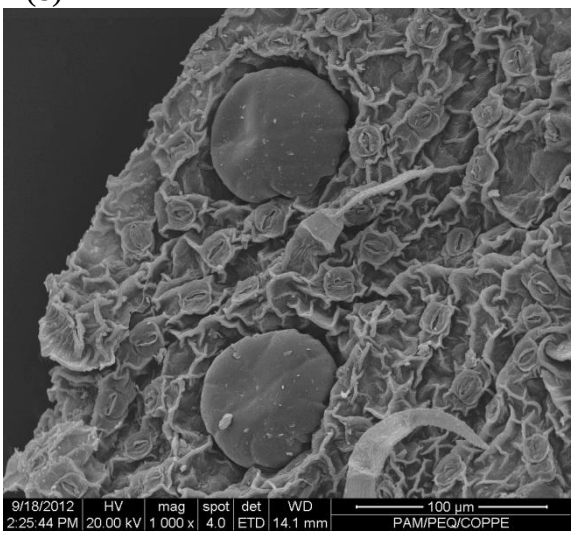
As modificações nas glândulas secretoras de óleo essencial das folhas de orégano utilizadas para extração são apresentadas na Figura 27. As folhas utilizadas na hidrodestilação (Figura 27a) e por Soxhlet com etanol por 6h (Fig. 27b-c) apresentam características das glândulas secretoras bem similares, com aspecto de vazias, diferentemente das glândulas das amostras utilizadas para EFS que se aparentaram destruídas (Fig 27d-e), o que poderia sugerir um maior rendimento em óleo essencial extraído.

Esse rompimento mais acentuado nas glândulas das amostras utilizadas por EFS pode ser explicada pela elevada pressão utilizada neste método de extração de 160 bar e posterior despressurização.

(a)



(b)



(c)

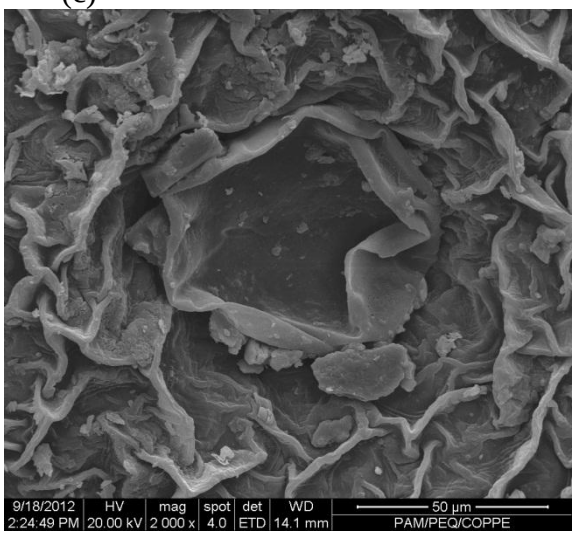
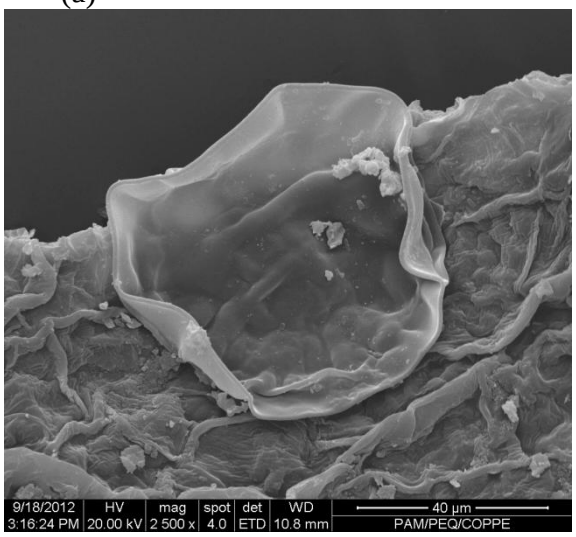
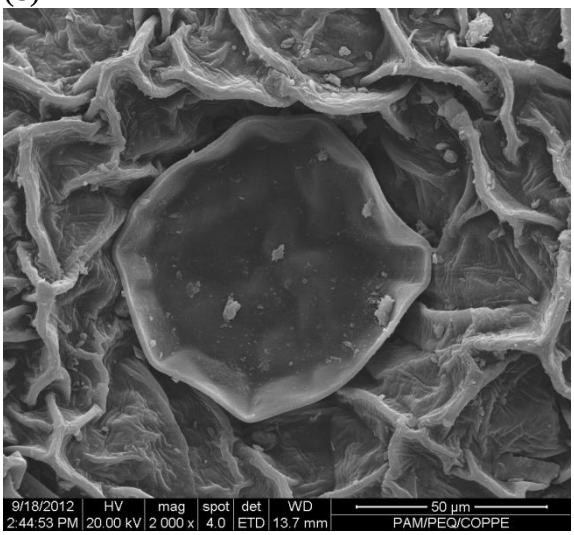


Figura 26 – Fotomicrografias MEV das glândulas secretoras de óleo essencial das folhas de orégano desidratadas a 40 °C por 24h (a-c).

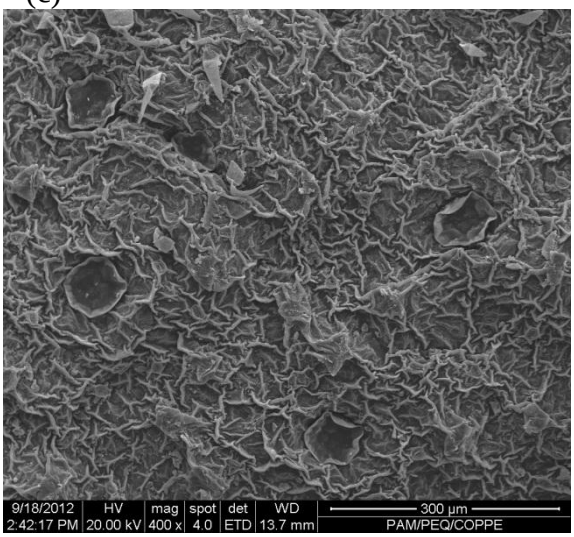
(a)



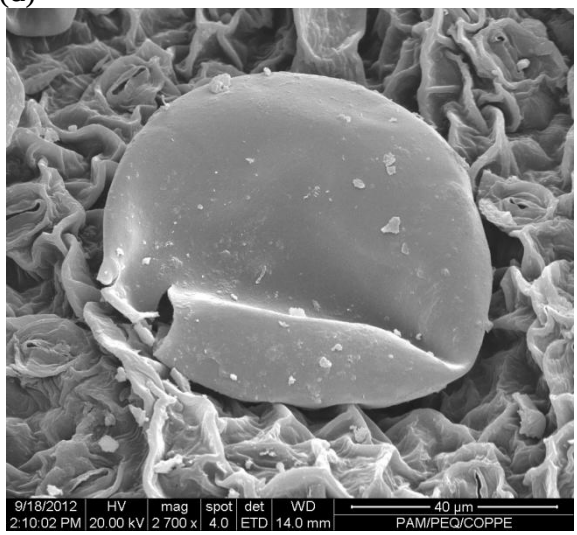
(b)



(c)



(d)



(e)

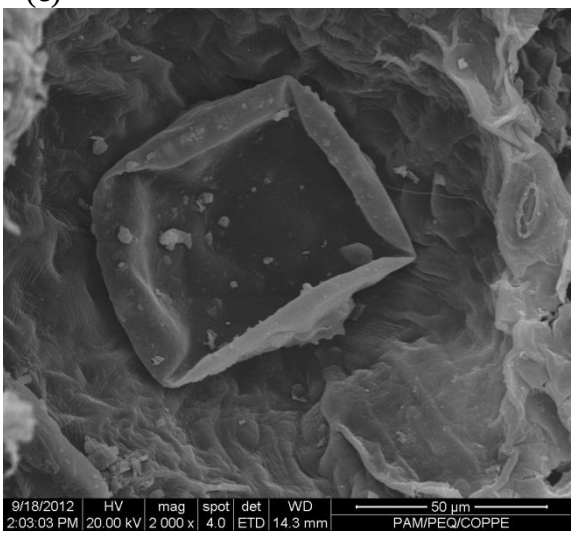


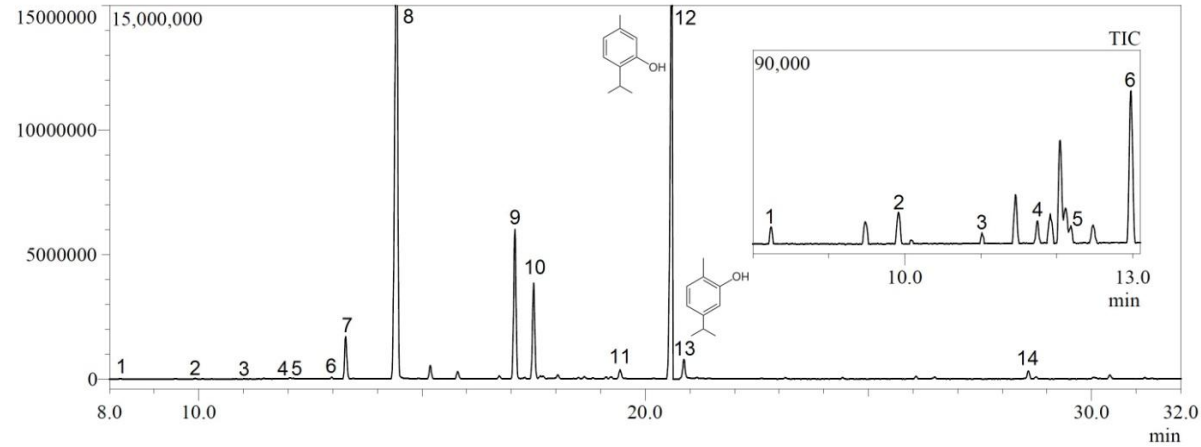
Figura 27 – Fotomicrografias MEV das glândulas secretoras de óleo essencial das folhas de orégano: (a) após desidratação e hidrodestilação por 2h, (b-c) após desidratação e Soxhlet com etanol por 6h, (d-e) após desidratação e EFS (50ºC/160 bar/2h).

5.5 ANÁLISES CG/FID E GC/MS

5.5.1 Composição dos óleos essenciais extraídos por diferentes métodos

Nas análises por GC/MS realizadas nos óleos extraídos por diferentes métodos, foram identificados 58 compostos que apresentaram similaridade superior a 90% em relação aos fragmentogramas das bibliotecas utilizadas, que são apresentados na Tabela 13, assim como o percentual obtidos pelos diferentes métodos de extração. Nos cromatogramas apresentados na Figura 28, são apresentados os picos e identificação dos principais componentes.

(a)



(b)

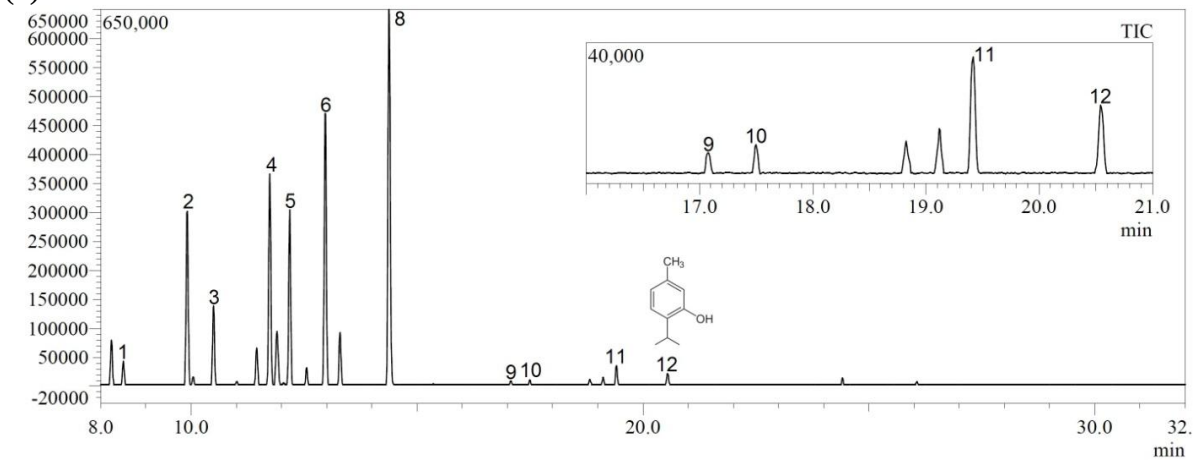


Figura 28 - Cromatograma de íons totais (obtidos através da análise de CG-EM) de óleo essencial de orégano extraído por hidrodestilação (2h) (a) e EFS (50 ºC/ 120 bar / 2h) (b), considerando similaridade superior a 90% (1: α -tujeno, 2: sabineno, 3: β-mirceno, 4: p-cimeno, 5, β-trans-ocimeno, 6: γ - terpineno, 7: terpinolene , 8: trans-sabineno hidratado, 9: 4-terpineol, 10: α-terpineol, 11, bergamiol, 12: timol, 13: carvacrol, 14: espatulenol.

Tabela 13 - Composição relativa (% FID) de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., obtidos por diferentes métodos de extração.

Compostos	***TR***	***IK***	***´Percentual de acordo com o método de extração (n = 3)***						
			Hidrod.	***Padrão****	***SFE (CO_2 / 50 °C/ 2h)***			***Soxhlet***	
			2h		***120 bar***	***140 bar***	***160 bar***	***4h***	***6h***
Tujeno	8,180	932	0,02	0,04	1,00	1,20	1,80	0,59	-
α-Pineno	8,372	937	-	0,59	0,90	1,25	1,20	0,89	0,02
Canfeno	8,803	949	-	0,13	-	-	-	0,23	-
Sabineno	9,400	975	-	-	5,40	5,8	7,50	2,20	-
β-Pineno	9,925	981	-	0,19	0,30	0,24	0,28	0,24	-
β-Mirceno	10,519	998	0,06	1,51	0,49	0,49	3,10	1,36	0,40
3-Octanol	10,700	1003	-	-	-	-	-	0,18	0,54
β-Felandreno	10,801	1006	0,03	-	0,51	0,12	0,99	0,14	0,44
α-Felandreno	10,896	1008	0,05	0,20	-	-	-	-	-
α-Terpineno	11,450	1024	0,13	1,01	10,21	10,04	10,09	2,61	0,70
β-Cimeno	11,611	1028	-	-	7,10	7,90	8,10		
p-Cimeno	11,650	1030	9,10	11,10	3,42	3,21	3,39	0,46	0,49
o-Cimeno	11,615	1029	-	-	-	-	-	0,51	0,54
D-Limoneno	11,763	1033	-	0,27	0,33	0,32	0,32	0,20	0,28
β-Terpineno	11,798	1034	0,08	-	-	-	-	-	-
p-Cineol	11,889	1036	0,06	0,38	0,20	0,21	0,22	0,01	0,11
α Pineno	11,979	1039	-	-	0,55	0,55	0,56	0,64	0,52
cis-beta-Terpineol	12,111	1040	-	-	0,89	0,9	1,21	0,35	0,24
β-trans-Ocimeno	12,158	1044	-	-	6,90	6,90	7,80	0,55	1,62
β-cis-Ocimeno	12,526	1054	-	-	0,12	0,17	0,22	0,21	0,41
γ-Terpineno	12,931	1066	0,29	5,34	1,02	1,08	1,97	0,88	0,9
cis-Sabineno hidratado	13,257	1075	2,12	0,03	0,29	0,35	0,88	3,47	5,71
Terpinoleno	13,894	1093	0,09	0,19	0,07	0,07	0,06	0,10	0,12
trans-óxido de linalol	14,244	1103	-	2,43	-	-	-	-	-
trans-Sabineno hidratado	14,325	1105	20,31	-	15,09	15,99	17,00	27,21	32,99
trans-p-Menten-2-ol-1	15,043	1127	1,27	-	-	-	-	-	-
cis-p-Menten-2-ol-1	15,655	1145	0,89	-	-	-	-	-	-
B-Terpineol	16,354	1167	0,02	-	-	-	-	1,13	1,00
Borneol	16,587	1174	0,25	0,47	-	-	-	0,02	0,02
Óxido de limoneno	16,871	1182	-	-	-	-	-	0,15	0,15
Terpinen-4-ol	16,979	1185	13,09	0,97	0,02	0,10	0,16	2,15	0,34
p-cyimen-8-ol	17,161	1191	0,21	0,03	-	-	-	--	0,49
α-Terpineol	17,395	1198	5,59	0,29	0,03	0,09	0,14	0,63	0,63
trans-piperitol	17,898	1214	0,56	-	-	-	-	0,64	0,64
Timol metil eter	18,711	1241	0,12	-	0,23	0,24	0,39	-	-
Carvona	19,005	1250	0,06	-	0,05	0,04	0,04	-	-
Lemonol	19,301	1260	0,46	-	-	-	-	-	-
Bergamiol	19,326	1261	-	1,79	1,39	1,92	1,42	3,43	2,16
Benzenediol	19,850	1280	-	-	-	-	-	1,03	0,34

Timol	20,448	1298	40,01	3,46	4,00	4,10	5,70	2,70	21,10
Acetato de trans-sabineno	20,601	1303	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	20,747	1308	1,58	28,53	0,44	0,43	0,46	0,2	0,40
Acetato de Timil	21,101	1320	-	0,09	-	-	-	-	-
γ-Elemeno	21,850	1347	0,27	0,11	0,19	0,18	0,2	0,23	0,23
4 – Etoximetil fenol	21,900	1348	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol éster	23,003	1387	0,35	0,09	0,09	0,09	0,11	0,1	0,13
Copaeno	23,101	1391	-	0,07	0,14	0,14	0,15	0,12	0,07
α-Bourboneno	23,316	1398	-	-	-	-	-	0,1	0,11
α-Cubebeno	23,200	1394	-	0,03	-	-	-	-	-
β-Elemeno	23,434	1402	-	-	-	-	-	0,05	0,05
Cariofileno	24,283	1434	0,47	7,8	0,23	0,28	0,28	1,83	1,23
γ-Cadineno	24,529	1444	-	0,12	0,03	0,03	0,04	0,13	0,17
γ-Muuroleno	24,945	1459	-	-	-	-	-	0,13	0,10
α-Humuleno	25,206	1469	0,24	-	0,05	0,05	0,05	0,25	0,20
α-Muuroleno	24,964	1460	-	-	-	-	-	0,06	0,07
Germacreno D	25,944	1497	0,14	0,25	-	-	-	1,63	1,49
Germacremeno B	26,363	1513	0,19	0,34	-	-	-	1,13	0,73
β-Cadineno	26,975	1538	-	0,02	-	-	-	0,29	0,20
Espatulenol	28,461	1597	0,07	0,14	-	-	-	0,28	0,11
Óxido de cariofileno	28,620	1603	0,09	0,76	-	-	-	0,14	0,10
Total			98,98	68,77	61,68	64,48	75,83	60,23	78,84
SRD (%)			7,1	10,0	9,8	8,4	11,2	9,9	6,4
Total de componentes		58	35	33	33	32	33	44	46

TR – Tempo de retenção, IK – Índice de Kovats, experimento na coluna capilar Rtx-5ms (30m x 0,25 milímetros e 0,25 µm) com padrão de alcano saturado, série n-alcano (C7-C30). – não detectado.
* Padrão de óleo essencial de orégano obtido da Sigma-Aldrich.

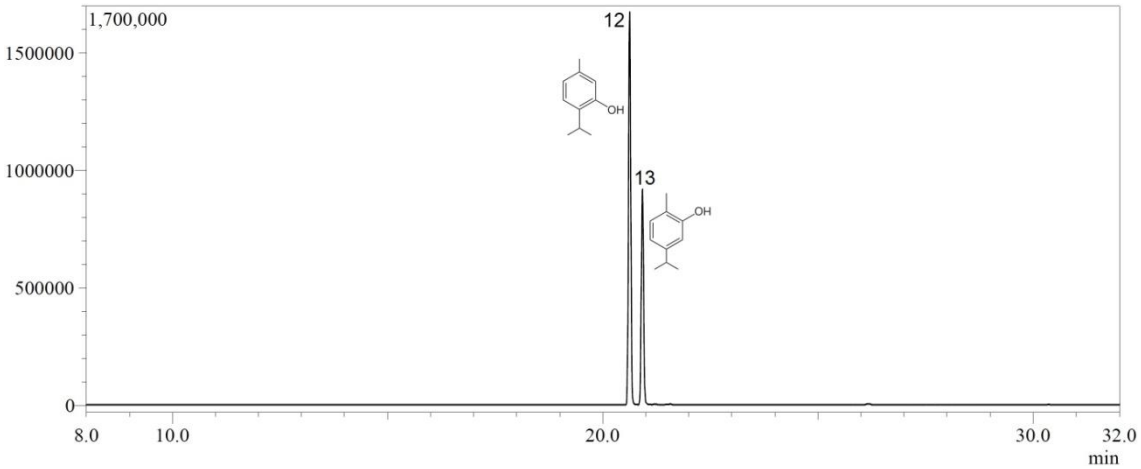


Figura 29 - Cromatograma de íons totais (obtidos por GC-MS). Análise dos padrões de timol e carvacrol (Sigma- Aldrich).

A análise por GC/FID e GC/MS do óleo essencial obtido por hidrodestilação levaram à identificação e quantificação de 35 componentes, que representaram 98,98% do total. Timol (40,01%) foi o componente mais abundante no óleo essencial e semelhante ao carvacrol (1,58%) é um fitoquímico que apresenta atividade antioxidante (BAYDAR; SAGDIÇ; OZKAN, 2004; DELFINE et al., 2005) e eficaz atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares de *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (NAZER et al, 2005; LAMBERT et al, 2001). Este método de extração produziu o maior rendimento (%) dos principais compostos biologicamente ativos em comparação com os outros métodos utilizados neste estudo.

As condições experimentais para a EFS neste estudo (50 ºC, 2 h) com variação da pressão que foram de 120, 140 e 160 bar, não apresentaram bons resultados em termos de extração dos compostos bioativos como carvacrol e timol. Foi mais seletivo para extrair compostos que são mais voláteis, como β-mirceno e o sabineno hidratado. O sabineno é aplicado na preparação de vários óleos essenciais artificiais (ROSSATO, 2006); o mirceno é um monoterpeno tóxico para insetos e fungos simbióticos de coníferas (SILVA, 2005).

Para um melhor rendimento em compostos alvos como os monoterpenos fenólicos timol e carvacrol, através da extração com fluido supercrítico, deve-se buscar uma densidade próxima a desses compostos. Na condição supercrítica o aumento da temperatura diminui a densidade do fluido, sendo esta diminuição abrandada com um aumento expressivo da pressão (MAZUTTI et al, 2006).

Sendo assim, os resultados indicam a necessidade de melhorar as condições aplicadas na EFS, a fim de obter mais compostos antioxidantes. A utilização de uma densidade (CAVERO et al, 2006) superior ao utilizado neste estudo (cerca de 0,53 g/cm^3, para 120 bar), expostos à temperatura mais baixa (MAZUTTI et al, 2006) e/ou alta pressão (REVERCHON; MARCO, 2006) poderia melhorar o rendimento do monoterpenos fenólicos carvacrol e timol.

O uso de co-solvente como etanol pode aumentar a solubilidade dos compostos antioxidantes na extração com CO_2 supercrítico. Cavero e outros (2006) constataram que o uso de 7% de etanol na extração com supercrítico de óleo essencial de orégano a 150 bar e 40 ºC (densidade de 0,73 g/mL) aumenta a atividade antioxidante do extrato.

Nas extrações realizadas por Soxhlet com etanol por 4 e 6 h, houve um aumento na concentração de timol (2,70% para 21,10%) e de carvacrol (0,20 para 0,48%). As extrações com o solvente etanol resultam em uma maior concentração de compostos fenólicos com o aumento do tempo de extração (LAPORNIK; PROŠEK; WONDRA, 2005).

No entanto, a integridade da substância não pode ser mantida nas condições utilizadas na extração de Soxhlet, a decomposição, térmica ou reação com o solvente pode ocorrer (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007). Isto pode explicar a menor concentração de timol e carvacrol obtidos com esse método, quando comparado com o método de hidrodestilação.

Além disso, condições diferentes das usados (em torno de 45 º C e 24 horas) para secar o orégano, podem ser testadas para evitar a perda de compostos de interesse, pois a utilização de secagem das amostras em um forno de convecção (com ar quente) leva a volatilidade de compostos de interesse (DÍAZ-MAROTO et al, 2004).

A menor concentração de hidrocarbonetos monoterpenos (por exemplo o β-cimeno), provenientes da hidrodestilação e os métodos de Soxhlet é devido à sua instabilidade quando exposto ao calor que pode causar sua degradação por efeitos térmicos ou hidrolíticos (BAYRAMOGLU; SAHIN; SUMNU, 2008). Estas inferências não se aplicam ao método EFS, uma vez que utiliza temperaturas mais baixas e por isso nas três pressões utilizadas, os óleos obtidos apresentaram valores bem maiores deste composto em relação aos outros métodos de extração, de até 8,10% de β-cimeno extraído a 160 bar.

Uma maior concentração de compostos voláteis de interesse como o carvacrol e o timol pode ser obtida, modificando não apenas os métodos de extração como também adequando o tempo e a temperatura de secagem do orégano. Figiel e outros (2010) relataram que na desidratação do orégano (*Origanum vulgare*) por convecção (usando ar quente) à 60 ºC, a diminuição das concentrações dos compostos voláteis foi fortemente associada com o conteúdo de água que evapora e que atua como solvente, possibilitando a difusão desses voláteis, carreando-os da matéria que está sendo desidratada para o meio ao redor.

Govaris e outros (2010), comprovaram que a adição de 0,6 % de óleo essencial de orégano em carne de carneiro estocada a 4 ºC por 12 dias apresentou propriedades sensoriais melhores que a amostra controle e que as com 0,9% do óleo essencial. Isto mostra a importância de buscar combinações de antioxidantes naturais com ação sinérgica para aumentar a probabilidade de aceitação na análise sensorial.

5.5.2 Análise quantitativa de timol, carvacrol e sabineno hidratado nos óleos essenciais obtidos.

Na Tabela 14 são apresentados dados quantitativos dos monoterpenos oxigenados timol e carvacrol e do hidrocarboneto monoterpênico sabineno hidratado.

Tabela 14 – Concentração de timol, carvacrol e sabineno hidratado nos óleos essenciais de orégano.

	Concentração em mg/mL óleo essencial (*n* =3)		
Origem	**Timol**	**Carvacrol**	**Sabineno hidratado**
Hidrodestilação (2h)	496,62±22,01[a]	17,14±1,01[a]	33,08±1,22[a]
Padrão (Sigma-Aldrich)	26,41±0,89[b]	222,84±14,9[b]	0,31±0,02[b]
EFS (50 °C/160 bar/ 2h)	57,53±3,08[c]	0,38±0,04[c]	3,96±0,19[c]
Soxhlet com etanol (6h)	19,10±0,09[d]	1,45±0,08[d]	0,23±0,02[b]
Soxhlet com etanol (4h)	2,89±0,13[e]	0,01±0,00[c]	4,11±0,03[c]

Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os valores apresentados confirmam os percentuais desses compostos obtidos por CG-FID e identificados pelo tempo de retenção dos padrões, com exceção dos extrativos obtidos por Soxhlet com etanol. Isso pode ser explicado pelo fato desses óleos apresentarem outros compostos além dos voláteis, como resina. Assim, maiores valores percentuais são encontrados diferentemente das análises por cromatografia, e por isso a quantificação dos compostos, principalmente os bioativos, é de grande importância nos óleos essenciais.

Além disso, foi verificado que os óleos essenciais de orégano obtidos apresentaram maior concentração de timol que carvacrol, diferentemente do óleo padrão, que apresentou maior valor percentual de carvacrol. Este fato pode ser explicado por diversos fatores, como a época da colheita, clima, chuva e genótipo da planta. O teor de carvacrol é maior em plantas colhidas no verão, pois o teor de fenólicos aumenta na florescência (KOKKINI et al, 1997). Isso também pode explicar o baixo teor de carvacrol para as amostras extraídas, pois a planta utilizada para as extrações foi coletada entre agosto e setembro, no inverno.

Pode ser comparado também o percentual de p-cimeno com o teor de carvacrol, pois a redução de p-cimeno pode implicar em um aumento de carvacrol, pois este é um precursor biológico de carvacrol (ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

5.5.3 Cinética de extração de timol nos óleos essenciais de orégano por EFS.

Na Tabela 15 e Figura 30 é apresentado o perfil de extração do monoterpeno oxigenado timol nos óleos essenciais de orégano por EFS, a 50 ºC, fluxo de CO_2 de 20-30 L/h, variando-se a pressão (120, 140 e 160 bar), por até 120 min. Um rendimento maior de timol no extrato é importante pois este analito apresenta bioatividade comprovada.

Tabela 15 - Perfil de extração de timol em função do tempo, por EFS da folha de orégano (*O. vulgare* L.) a 50 °C, fluxo de CO_2 de 20-30 L/h; em diferentes pressões (120, 140 e 160 bar).

	Timol (mg/mL) ± DP (*n* = 3)*		
Tempo (min)	**120 bar**	**140 bar**	**160 bar**
35	2,88±0,05 [a]	4,01±0,11 [a]	6,16±0,14 [a]
50	4,23±0,14 [b]	11,08±0,07 [b]	13,23±0,13 [b]
60	5,48±0,15 [c]	15,24±0,14 [c]	18,56±0,14 [c]
80	6,99±0,06 [d]	22,36±0,45 [d]	35,99±0,10 [d]
100	9,11±0,54 [e]	29,85±0,32 [e]	54,92±1,13 [e]
120	10,05±0,21 [f]	33,27±0,25 [f]	55,53±1,14 [e]

* Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

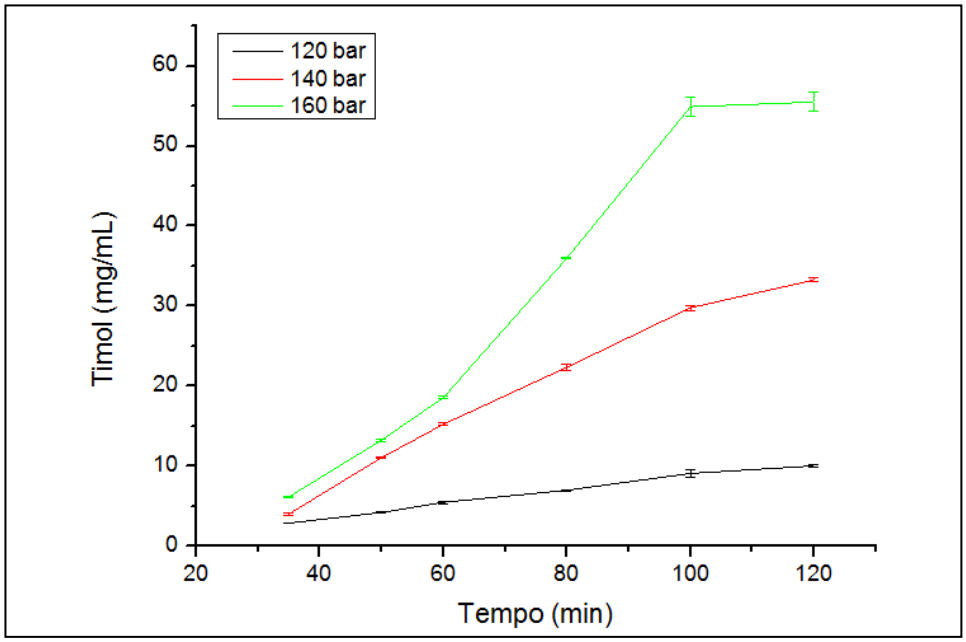


Figura 30 – Perfil de extração de timol em função do tempo, por EFS da folha de orégano (*O. vulgare* L.) a 50 °C, fluxo de CO_2 de 20-30 L/h; em diferentes pressões (120, 140 e 160 bar).

A concentração do timol no óleo foi obtida com as curvas padrões de timol (obtido da Sigma-Aldrich) de acordo com as análises de CG-FID. Amostras coletadas antes de 35 min

em isopropanol não apresentaram detecção deste composto de acordo com a metodologia utilizada para identificação.

Maiores concentrações foram obtidas com a pressão maior utilizada de 160 bar, de até 55,53 mg/mL. Além disso, foi verificado que de 0 a 100 minutos ocorreu um aumento significativo de extração deste analito para as três pressões utilizadas, entretanto, a partir de 100 min ocorreu uma acentuada redução na extração o que demonstra que em 100 min é um tempo ideal para extração de timol nestas condições.

5.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A avaliação de compostos fenólicos foi realizada para os óleos essenciais obtidos pelos diferentes métodos de extração. Os resultados foram expressos em mg BHT/ g de orégano desidratado e estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Concentração de fenólicos nos óleos essenciais obtidos pelos diferentes métodos de extração, expressos em mg BHT/ g orégano desidratado.

Método de Extração	**Fenólicos (mg BHT/ g orégano desidratado) (*n* = 4)**
Hidrodestilação/ 2h	7,74±0,12[a]
Etanol (Soxhlet/6h)	7,80±0,09[a]
Etanol (Soxhlet/4h)	3,92±0,12[b]
EFS (CO_2/ 50°C/ 160 bar)	0,31±0,01[c]
EFS (CO_2/ 50°C/ 120 bar)	0,21±0,01[d]

Concentração ± DP. Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

O óleo essencial obtido por Soxhlet com hexano não foi considerado devido a sua toxicidade como solvente, o que impede a aplicação em alimentos. Compostos fenólicos totais foram medidos pelo método de Folin-Ciocalteau usando a curva padrão de soluções de BHT. O BHT é um antioxidante sintético, usado desde 1950 nos alimentos para estabilizar o frescor e para evitar perdas no valor nutritivo, sabor e cor (IARC, 1986; JECFA, 1996).

Os óleos obtidos por hidrodestilação e por Soxhlet com etanol por 4 e 6 h, apresentaram os maiores valores para fenólicos de acordo com a metodologia utilizada, de 7,74±0,12 e 7,80±0,09 mg BHT/ g orégano desidratado, respectivamente; esses valores apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$). Os óleos obtidos por EFS apresentaram

valores menores de fenólicos, não apresentando diferença significativa com o aumento da pressão de 120 para 160 bar a 50 ºC (Tabela 16).

Substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonóides e ácidos fenólicos, apresentam atividade antioxidante principalmente devido às suas propriedades redutoras e estrutura química que atuam neutralizando ou seqüestrando radicais livres, evitando a propagação do processo oxidativo, atuando como antioxidante (DELAZAR et al, 2006). Atuam formando intermediários relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOARES, 2002).

Entretanto, os vegetais contêm além dos compostos fenólicos, outros inibidores de oxidação, como ácido ascórbico, ácido hidroxicarboxílico e carotenóides (POKORÝ, 1991). Assim a análise da atividade antioxidante desses óleos essenciais foi realizada, para que se possa ter outro parâmetro em relação à bioatividade dos óleos essenciais de orégano obtidos.

5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH)

Este método foi utilizado para avaliar as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais (OE) do orégano extraídos por diferentes métodos de extração (Soxhlet com etanol, hidrodestilação e EFS), e a comparação desses óleos com os antioxidantes sintéticos conhecidos, ácido ascórbico e BHT e, o padrão de óleo essencial de orégano (Sigma-Aldrich). É baseado na redução da solução alcoólica de DPPH na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. As soluções de DPPH mostram uma forte absorvância a 517 nm apresentada pela coloração violeta e, a descoloração e conseqüentemente a diminuição no valor de leitura da absorvância ocorre estequiometricamente de acordo com o grau de redução deste radical. Sendo assim, o radical DPPH não reduzido que é mensurado após um tempo determinado, corresponde inversamente à atividade sequestrante de radicais do antioxidante utilizado (BLOIS,1958).

De acordo com a Tabela 17 e Figura 31, a atividade sequestrante de radicais livres diminui na ordem carvacrol > timol >> ácido ascórbico > BHT >> (Soxhlet/etanol/6h) > óleo essencial (CO_2/ 50°C/ 160 bar) > EFS (CO_2/ 50°C/ 120 bar) > OE (padrão) > OE (Soxhlet/etanol/4h) > OE (Hidrodestilação).

Tabela 17 – Atividade antioxidante (IC_{50}) do óleo essencial de orégano, BHT e ácido ascórbico.

Antioxidante	**IC_{50} * (*n* = 4)**
Carvacrol	0,004324 ± 0,000030 [a]
Timol	0,004468 ± 0,000048 [a]
Ácido Ascórbico	0,0197 ± 0,000122 [b]
BHT	0,0264 ± 0,000208 [b]
Óleo essencial (Soxhlet/etanol/6h)	0,1299 ± 0,001218 [c]
EFS (CO_2/ 50°C/ 160 bar)	0,2947 ± 0,002180 [d]
EFS (CO_2/ 50°C/ 120 bar)	0,3200 ± 0,001110 [d]
Óleo essencial padrão	0,4089 ± 0,000201 [e]
Óleo essencial (Soxhlet/etanol/4h)	0,4314 ± 0,004850 [e]
Óleo essencial (Hidrodestilação)	0,5153 ± 0,023986 [f]

* Concentração (mg/ml) ± DP para uma inibição de 50%. Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

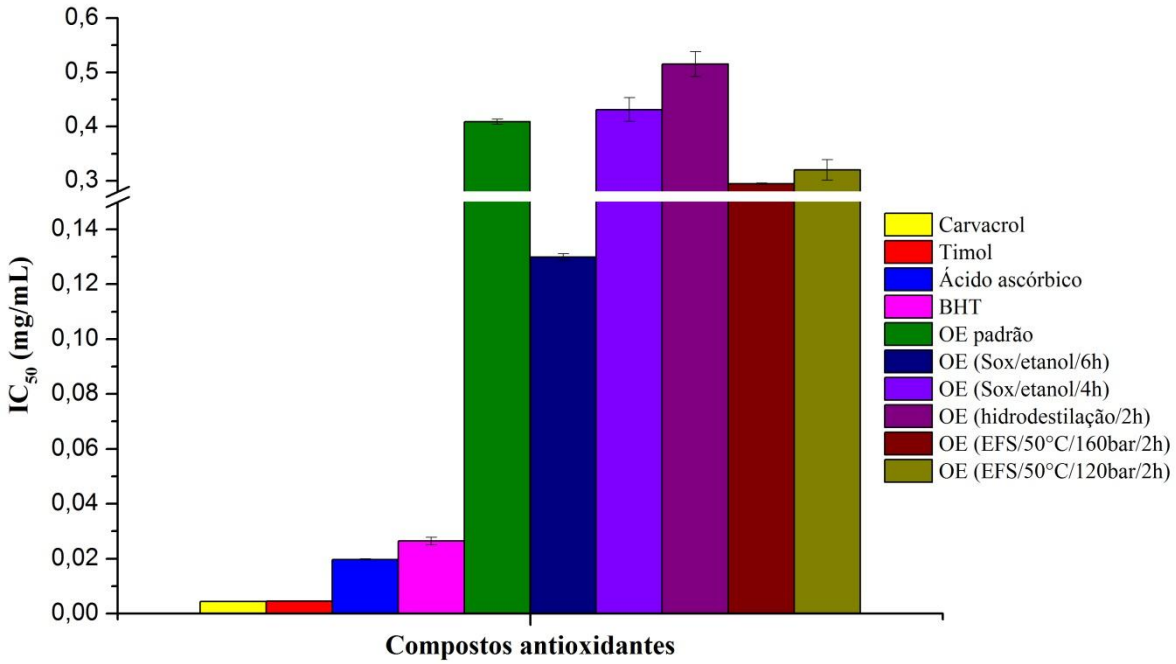


Figura 31 - Atividade antioxidante (método DPPH) de compostos antioxidantes. IC_{50} (mg/ml) (valores menores indicam capacidade antioxidante mais poderoso). OE significa óleo essencial de orégano.

Os padrões comparativos de ácido ascórbico e BHT apresentaram elevada atividade sequestrante de radicais livres, enquanto a atividade dos óleos essenciais do orégano obtidos

por hidrodestilação e extração por Soxhlet com etanol foi muito menor. Esses resultados estão de acordo com Kulisic e outros (2004).

O aumento no tempo de extração de 4 para 6 horas do óleo essencial de orégano por Soxhlet com etanol proporcionou um aumento acentuado na atividade antioxidante do óleo, conforme a diminuição do valor de IC_{50}, de 0,4314 para 0,1299, referentes aos tempos de extração de 4 e 6 horas respectivamente.

A menor atividade sequestrante avaliada foi a do óleo obtido por hidrodestilação por 2 horas, apesar de apresentar o maior percentual de timol que os outros extratos obtidos por outros métodos de extração (Tabela 14).

A atividade antioxidante depende dos diferentes constituintes químicos e pode depender também da concentração de compostos fenólicos. No entanto, o estudo de outros componentes é necessário, para avaliar o possível efeito sinérgico sobre o potencial antioxidante total do óleo.

Cavero e outros (2006) relatam que a extração de uma mistura de compostos de interesse que atuem com sinergia, permite uma redução na concentração de cada substrato, podendo aumentar sua atividade antioxidante. O sinergismo entre os compostos antioxidantes pode superar a atividade individual dos componentes.

Entretanto, a mistura de três ou mais antioxidantes podem apresentar uma diminuição da capacidade antioxidante quando comparado com seus valores individuais. O efeito antagonista de timoquinona ou p-cimeno é mais forte que o efeito sinergístico de timol e carvacrol (MILOS e MAKOTA, 2012), e isso pode explicar o menor valor da atividade antioxidante dos óleos obtidos por hidrodestilação, que apesar de apresentar elevada concentração de timol, apresenta maiores valores de p-cimeno (9,11%) que os óleos obtidos por outros métodos de extração.

5.8 ANÁLISE TÉRMICA

Foi realizada análise térmica do orégano desidratado, dos óleos essenciais obtidos por Soxhlet com etanol (que apresentaram maior atividade antioxidante neste trabalho), e dos antioxidantes sintéticos ácido ascórbico e BHT.

A análise térmica do orégano tratado termicamente pode ser observada na Figura 32, onde são apresentadas as curvas TG, DTG e DTA. A curva TG do orégano tratado exibe dois estágios de decomposição. O primeiro exibe uma perda de massa de aproximadamente 10%, sugerindo uma mistura de compostos voláteis e água. O terceiro estágio de decomposição

ocorreu a 230 °C e refere-se aos extrativos orgânicos. O resíduo a 800 ºC foi de 25%, referente aos inorgânicos.

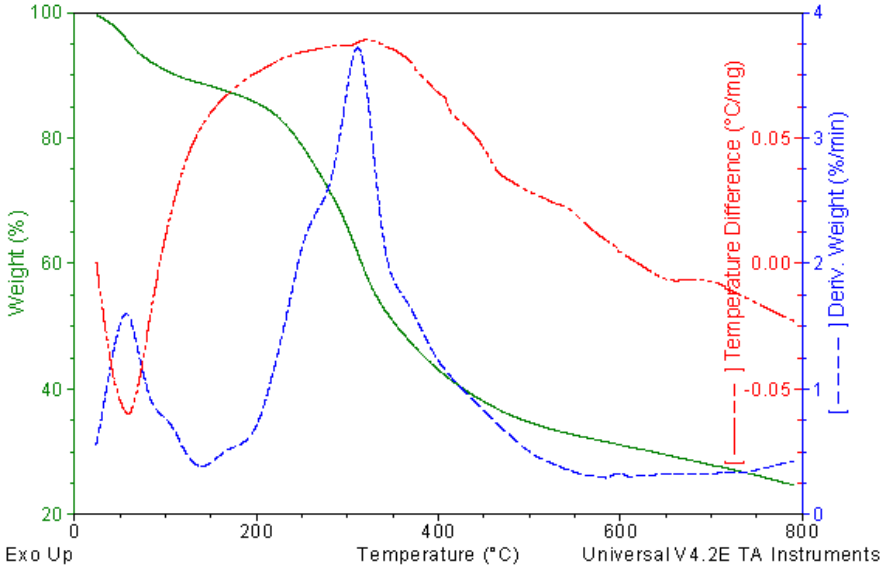


Figura 32 – Curvas de TG, DTG e DTA do orégano desidratado.

A curva DTG do orégano tratado termicamente apresentou dois acentuados e quatro suaves (ombros) estágios de decomposição. Dos estágios acentuados, o primeiro ocorreu a 60 °C, relativo a compostos voláteis; e o segundo a 310 ºC que apresenta o pico máximo de decomposição, referindo-se a decomposição dos lignocelulósicos. Dos suaves estágios, o primeiro ocorreu a 100 ºC referente a evaporação da água, o segundo a 160 °C, o terceiro a 260 °C que se refere à decomposição da hemicelulose ou dos extrativos orgânicos, e o último ocorreu a 360 °C referente à decomposição térmica da celulose e da lignina.

A curva DTA do material tratado apresenta dois eventos endotérmicos a 60 °C e a 310 °C. O primeiro sugere a decomposição de compostos voláteis e o segundo a decomposição dos ligninocelulósicos.

A Figura 33 mostra a análise térmica do óleo essencial do orégano obtido por extrator Soxhlet com etanol por 4 h. A curva TG do óleo apresenta dois estágios de decomposição, o primeiro a 120 ºC e o segundo a 250 ºC. O resíduo a 800 ºC foi de 20%, sugerindo os compostos inorgânicos.

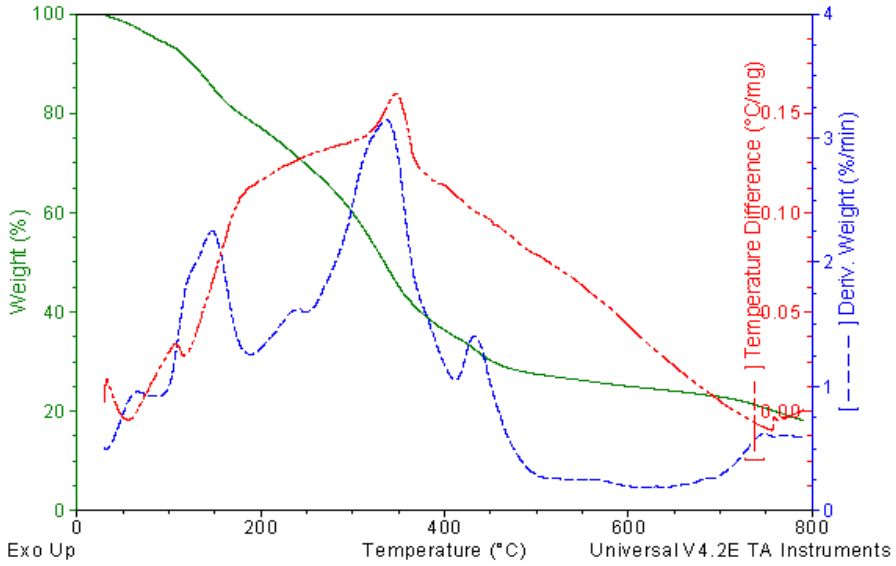


Figura 33 – Curvas de TG, DTG e DTA do óleo essencial obtido por extração com Soxhlet com etanol por 4 horas.

A curva DTG do óleo essencial do orégano extraído por Soxhlet com etanol por 4 horas apresentou cinco acentuados estágios de decomposição e um suave que ocorreu a 120 ºC. O primeiro estágio de decomposição acentuado ocorreu a 60 °C relativo à evaporação do etanol. O segundo ocorreu a 150 °C. O terceiro a 230 °C, sugerindo a decomposição de uma mistura contendo timol, que é um bioativo importante no extrato. O quarto estágio acentuado de decomposição apresenta o pico máximo de decomposição a 340 °C, referindo-se a decomposição de compostos orgânicos. O último estágio ocorreu a 440 °C referente à resina. O extrato obtido pela extração por Soxhlet, diferentemente da hidrodestilação, apresentou não apenas o óleo volátil ou essencial, mas também compostos resinosos, por isso o produto deste método de extração é chamado de óleo resina.

A curva DTA da oleoresina do orégano apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro a 60°C relacionado com o solvente etanol e, o segundo a 120 ºC e apresentou um evento exotérmico a 350 ºC referente à oxidação dos óleos (triglicerídeos).

Na Figura 34 pode ser observada a análise térmica do óleo essencial do orégano obtido por extrator Soxhlet com etanol por 6 h. A curva TG do óleo exibiu dois estágios de decomposição, sendo o primeiro a 130 ºC e o segundo a 290 ºC.

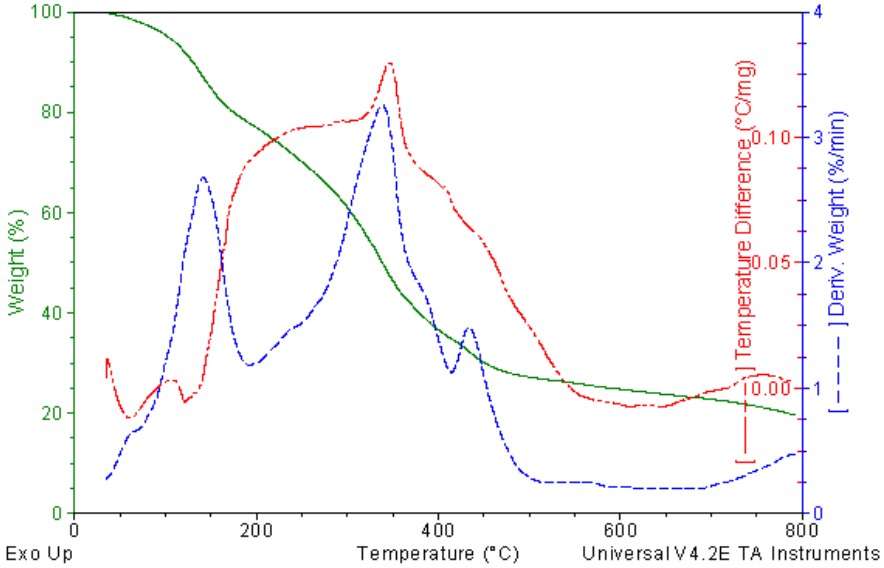


Figura 34 - Curvas de TG, DTG e DTA do óleo essencial obtido por extração com Soxhlet com etanol por 6 horas.

A curva DTG do óleo essencial do orégano extraído por Soxhlet com etanol por 6 horas apresentou três acentuados e dois suaves estágios de decomposição. O primeiro estágio acentuado ocorreu a 60 °C relativo à evaporação do solvente, o segundo ocorreu a 150 °C, o terceiro a 340 ºC apresentou o pico máximo de decomposição, referindo-se a decomposição de compostos orgânicos. O último estágio de decomposição ocorreu a 430 °C, referente à resina como já mencionado. Os estágios suaves de decomposição ocorreram a 230 ºC e a 380 ºC.

A curva DTA do óleo resina do orégano apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro a 60°C e o segundo a 130 ºC e apresenta um evento exotérmico a 350 ºC sugerindo a oxidação de triglicerídeos seguido de decomposição.

Assim, de acordo com a análise térmica, a estabilidade térmica do óleo essencial obtido por Soxhlet com etanol não foi diminuída com o aumento no tempo de extração de 4 horas para 6 horas, como pode ser visto na Figura 35.

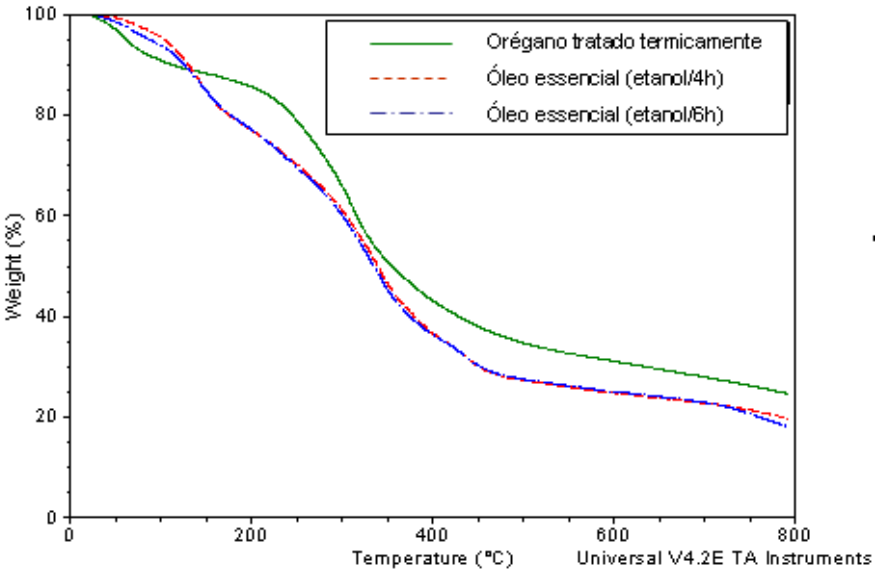


Figura 35 - Curvas sobrepostas da TG, do orégano tratado termicamente e do óleo essencial obtido por extração com Soxhlet com etanol por 4 e 6 horas.

Na Figura 36 pode ser observada a análise térmica do BHT. A curva TG do BHT mostra um único estágio de decomposição iniciado a 140 ºC .

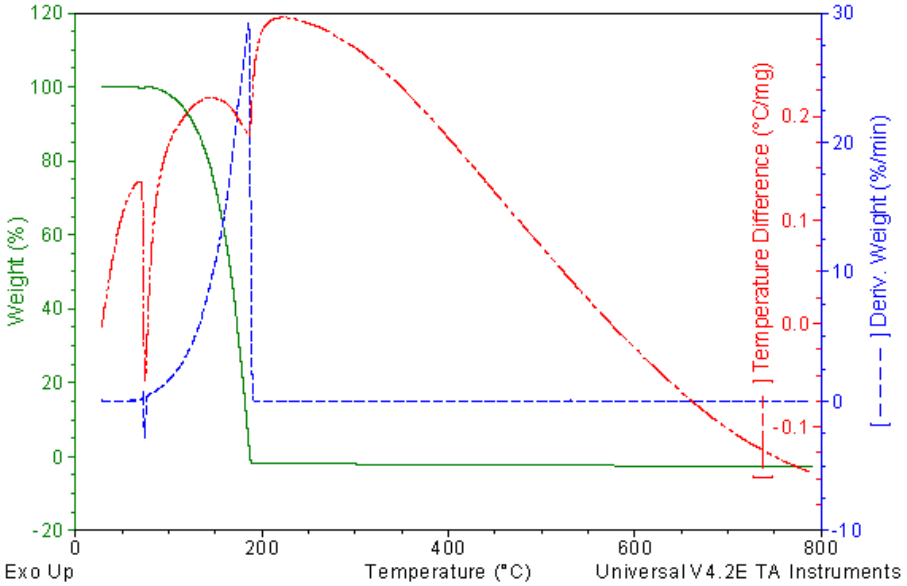


Figura 36 – Curvas de TG, DTG e DTA do antioxidante sintético BHT.

A curva DTG do BHT apresentou um acentuado estágio de decomposição a 180 °C, referente ao produto. E, a curva DTA apresenta dois eventos endotérmicos, o primeiro a 70°C, seguido da temperatura de fusão (T_m) e o segundo a 180 ºC, seguido de decomposição do BHT.

As curvas TG e DTG do ácido ascórbico tem dois estágios de decomposição nas temperaturas de 180 ºC e 200 ºC (Figura 37). O resíduo foi de 20% a 800 °C.

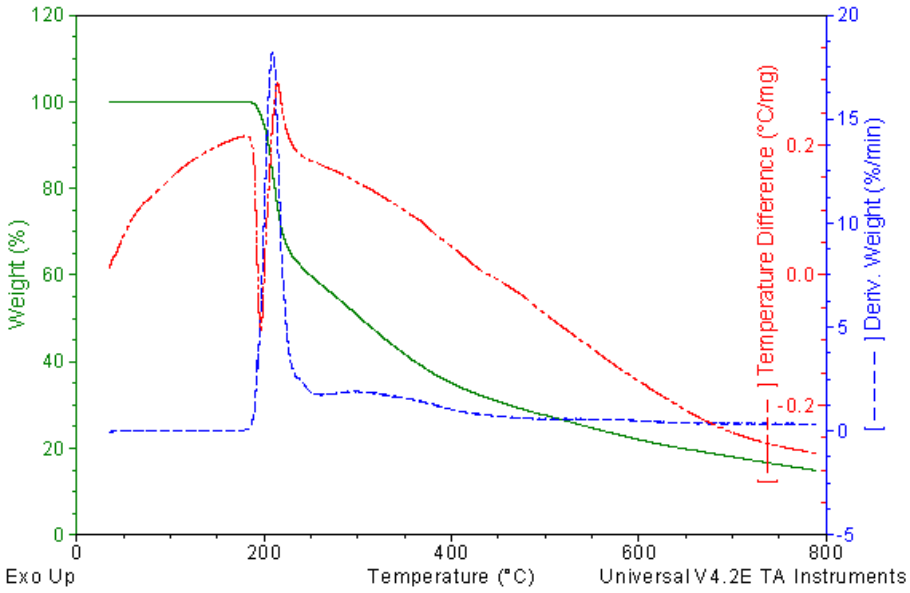


Figura 37 – Curvas de TG, DTG e DTA do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico comercial apresentou maior estabilidade térmica até 200 ºC, e o BHT menor estabilidade e mais fácil decomposição ou volatilização. Cabe ressaltar que a partir de 200 ºC o perfil da curva TG apresentou semelhança do óleo essencial com o ácido ascórbico (Figura 38). O teor de resíduo foi de aproximadamente 20% para o ácido ascórbico e óleo essencial na temperatura de 800 ºC. Ao passo que para o BHT foi próximo de zero.

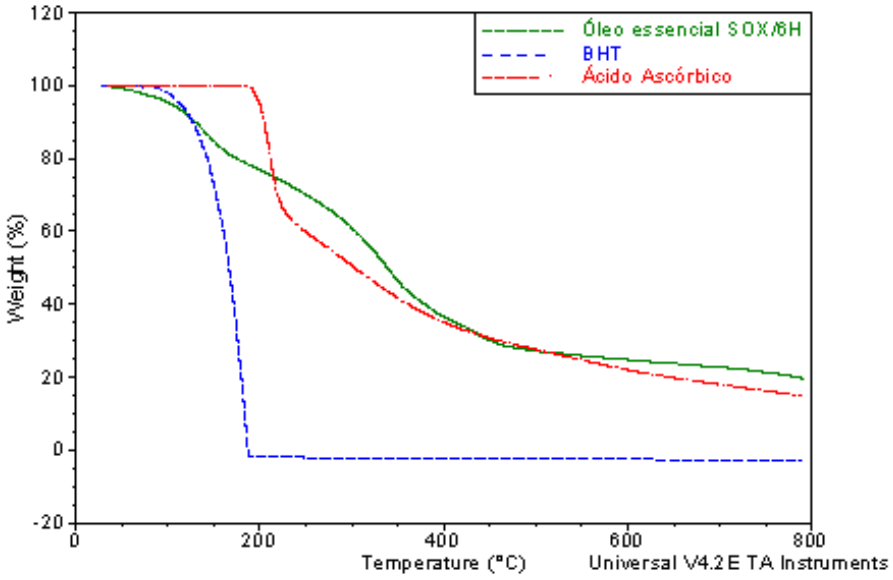


Figura 38 – Sobreposição das curvas de TG do óleo essencial do orégano (obtido por extração com Soxhlet com etanol por 6 horas), do BHT e do ácido ascórbico.

A curva TG do timol padrão (Figura 39) exibe um único estágio de decomposição em torno de 160 ºC, com uma perda de massa de aproximadamente 100%, sugerindo um composto puro, como esperado. A curva DTG apresentou um acentuado estágio de decomposição, que ocorreu a 180 °C. A curva DTA apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro em 50 °C indicando uma temperatura de fusão, T_m e um segundo a 180 °C, referente a decomposição do timol, corroborando com a DTG.

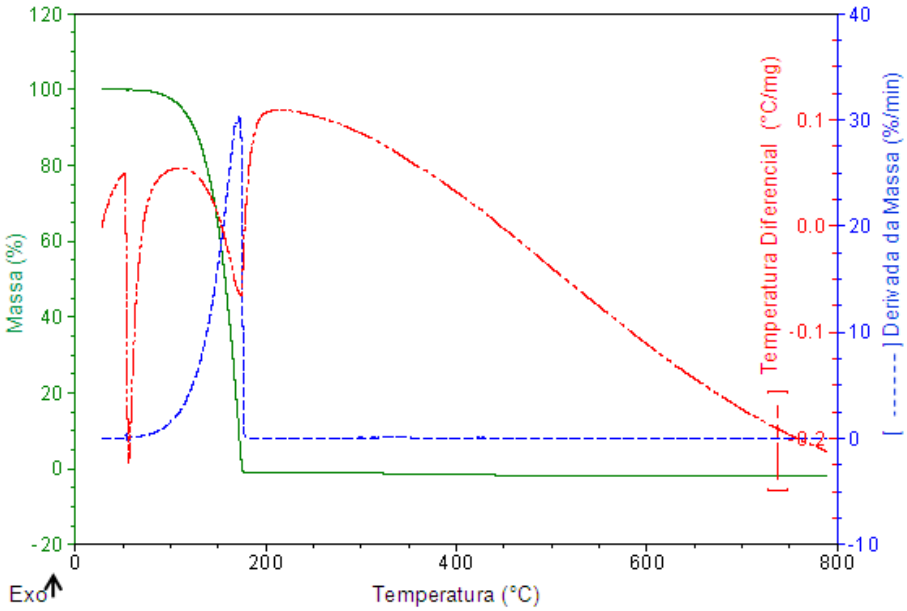


Figura 39 - Curvas de TG, DTG e DTA do timol.

A Figura 40 exibe as curvas TG/DTG e DTA do carvacrol, onde a curva de TG mostra um estágio de decomposição a 170 ºC, não deixou resíduo, devido à elevada pureza do padrão utilizado. A curva DTG apresentou um acentuado estágio de decomposição, que ocorreu a 180 °C. A curva DTA apresentou um evento endotérmico a 180 °C, confirmando o estágio único de decomposição das curvas TG e DTG. Esses resultados sugerem que o carvacrol apresenta uma estabilidade térmica ligeiramente maior que o timol, o que é confirmado na CG/MS com um maior tempo de retenção (menor volatilidade) do carvacrol.

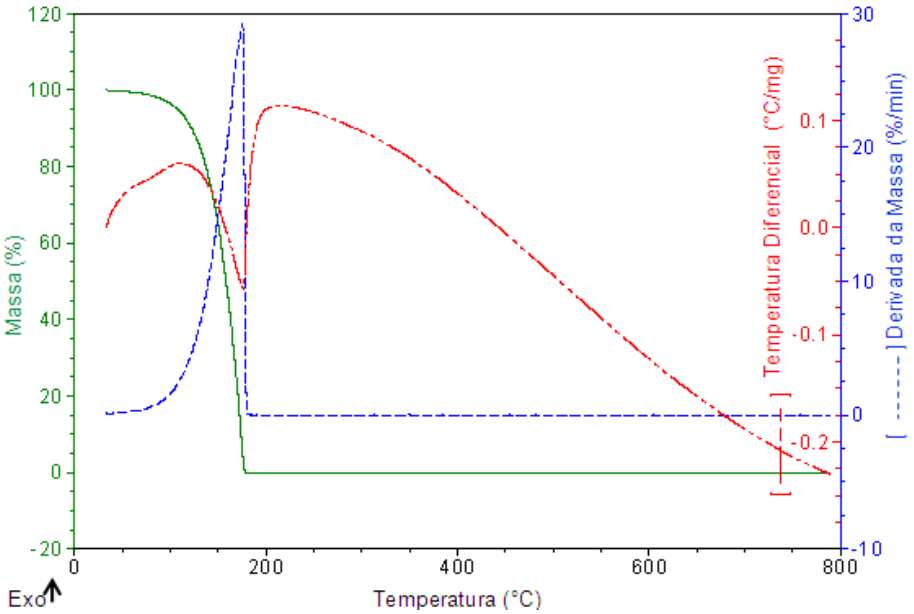


Figura 40 - Curvas de TG, DTG e DTA do carvacrol.

Esta técnica, de acordo com os resultados apresentados, mostrou ser uma técnica de importante aplicação, oferecendo diferentes informações necessárias para o desenvolvimento de produtos aplicados na indústria de alimentos.

O resíduo a 800 ºC nas curvas TG dos óleos essenciais obtidos por Soxhlet com etanol (4 e 6 h) é referente aos compostos inorgânicos, responsáveis pela nutrição mineral de plantas, também detectados no orégano desidratado através das cinzas das amostras por espectrometria de fluorescência de raios X (EDXRF). Os elementos de maior concentração estão apresentados na Tabela 18 e, apresentam-se na forma oxidada mesmo sendo a análise térmica realizada em atmosfera de nitrogênio para obtenção das cinzas, pois estes elementos apresentam-se desta forma nas plantas e solos (FERNANDES, 2006).

Tabela 18 - Determinação da composição por EDXRF das cinzas obtidas pela Análise térmica do orégano desidratado e dos óleos essenciais de orégano obtidos por Soxhlet com etanol por 4 e 6 h.

Elemento	Composição de compostos inorgânicos (%)		
	Orégano desidratado	**Óleo essencial (Soxhlet/etanol/4h)**	**Óleo essencial (Soxhlet/etanol/6h)**
K2O	40,560	69,883	62,026
CaO	29,046	-	-
Cl	8,714	22,221	25,046
Na2O	1,890	-	6,142
P2O5	6,415	4,254	2,084
SiO2	3,781	1,146	1,826
SiO3	3,634	1,757	1,225
MgO	4,585	-	0,994
Fe2O3	0,649	0,322	0,283
CuO	0,022	0,062	0,085
TiO2	0,114	0,120	0,085
MnO	0,515	0,060	0,061
Cr2O3	-	0,063	0,046
NiO	0,008	-	0,022
Br	0,006	0,013	0,014
Rb2O	0,009	0,013	0,014
ZnO	0,034	0,048	0,013
SrO	0,017	-	-
ZrO2	0,003	-	-

5.9 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.9.1 Avaliação do halo de inibição – difusão em disco.

A Tabela 19 e Figura 41 apresentam os respectivos halos de inibição de 50 µL de solução etanólica de 10 mg/mL (ou seja, 0,50 mg) dos óleos essenciais obtidos por diferentes métodos de extração e seus comparativos contra bactérias patogênicas alimentares e fungos. As amostras avaliadas foram: óleo essencial de orégano obtidos por diferentes métodos de extração (hidrodestilação (2h), Soxhlet com etanol (4 e 6 h), EFS (50 °C/120 e 160 bar/2h) e, os comparativos óleo essencial de orégano padrão (Sigma-Aldrich), carvacrol, timol ácido sórbico, ácido benzoico e propionato de cálcio. Os micro-organismos selecionados foram: *Salmonella Typhimurium, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterecoccus faecalis, Aspergillus niger* e *Penicillium stolonifer*.

Tabela 19 – Propriedade antimicrobiana de óleo essencial de orégano obtido por diferentes métodos de extração e seus comparativos (conservadores sintéticos e padrões de óleo, carvacrol e timol), contra seis micro-organismos.

	Halo de inibição (cm)* **(*n* = 4)**					
Amostra (0,50 mg)	***Salmonella Typhimurium***	***E. coli***	***Staphylococcus aureus***	***Enterecoccus faecalis***	***Aspergillus niger***	***Penicillium stolonifer***
OEO hidrodestilação	0,30±0,04[a]	0,44±0,05[a]	0,38±0,04[a]	0,26±0,03[a]	0,10±0,02[a]	0,25±0,04[a]
OEO Soxhlet/etanol/4h	N.D.	0,20±0,02[b]	N.D.	N.D.	0,10±0,02[a]	0,10±0,02[b]
OEO Soxhlet/etanol/6h	N.D.	0,22±0,03[b]	N.D.	N.D.	0,12±0,03[b]	0,14±0,03[c]
OEO EFS 50°C/120 bar/2h	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,14±0,02[c]	0,13±0,03[d]
OEO EFS 50°C/160 bar/2h	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,15±0,02[d]	0,14±0,03[c]
OEO padrão	0,48±0,02[b]	0,46±0,03[a]	0,48±0,04[b]	0,16±0,02[b]	0,10±0,01[a]	0,16±0,03[e]
Timol	0,82±0,06[c]	1,26±0,10[c]	0,66±0,08[c]	1,20±0,15[c]	0,45±0,06[e]	0,40±0,05[f]
Carvacrol	0,28±0,02[a]	0,70±0,05[d]	0,58±0,05[d]	0,90±0,10[d]	0,42±0,06[f]	0,40±0,05[f]
Ácido sórbico	0,14±0,02[d]	0,08±0,01[e]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ácido benzoico	0,06±0,01[e]	0,10±0,02[e]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Propionato de cálcio	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,20±0,04[g]	0,10±0,02[b]
Etanol (branco)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

* Média do halo de inibição (cm) ± DP. Halo do disco não foi incluído. Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

OEO – óleo essencial de orégano. N.D. – halo de inibição não detectado.

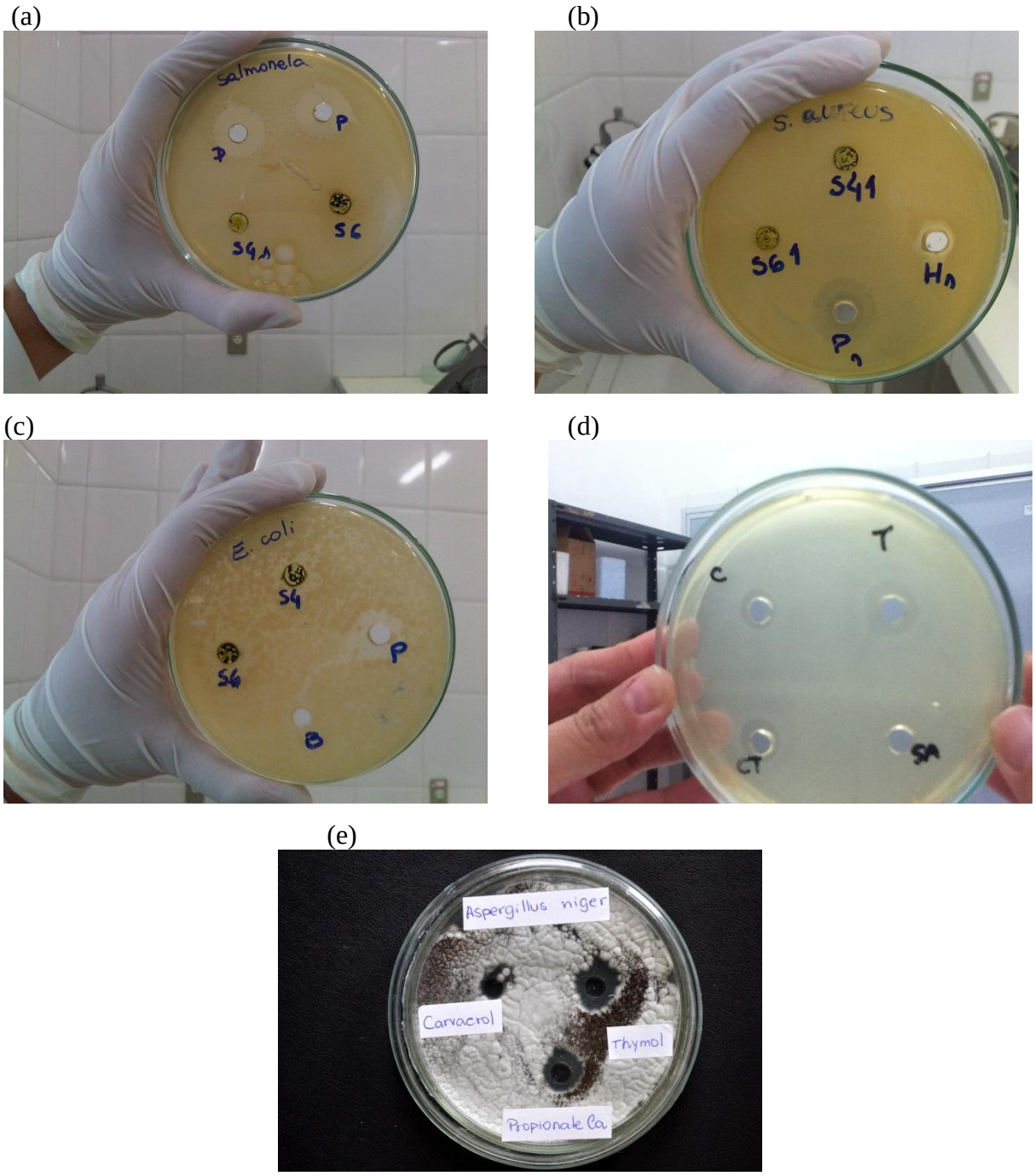


Figura 41 – Propriedades antimicrobianas de óleo essencial de orégano obtido por diferentes métodos de extração e seus comparativos (óleo padrão (Sigma-Aldrich), carvacrol, timol, ácido sórbico, ácido benzoico e propionato de cálcio), contra seis diferentes micro-organismos usando o método de difusão em disco. (a) *Salmonella Typhimurium*, (b) *Escherichia coli*, (c) *Staphylococcus aureus*, (d) *Enterococcus faecalis*, (e) *Aspergillus niger*.

Das amostras avaliadas o timol apresentou a maior atividade em relação aos micro-organismos avaliados, com halo de inibição de 1,26±0,10 cm para *E. coli* e, 0,45±0,06 cm para *Aspergillus niger*.

Os monoterpenos oxigenados timol e carvacrol são relacionados com a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e isoladamente, apresentam elevada atividade (OUSALAH et al, 2007). Ambos apresentaram maior atividade em relação às outras amostras testadas para os seis micro-organismos, confirmando a literatura. Assim, a avaliação da composição destes compostos nos extrativos obtidos por diferentes métodos mostra-se muito importante.

Nas condições avaliadas, todos os óleos essenciais de orégano avaliados apresentaram atividade antibacteriana melhor que os aditivos conservadores sintéticos, ácido sórbico e ácido benzoico, que são amplamente utilizados pela indústria de alimentos. Além disso, apresentaram atividade antifúngica contra *A. niger* e *Penicillium stolonifer* similar ou maior que o conservador sintético propionato de cálcio que é utilizado em alimentos evitando o desenvolvimento de fungos (SOFOS, 1989), principalmente em produtos de panificação.

Dos óleos essenciais de orégano avaliados, apenas o extrato obtido por hidrodestilação por 2 h e o padrão (Sigma-Aldrich) apresentaram efeito com halo de inibição para todos os micro-organismos avaliados. As oleoresinas obtidas por Soxhlet com etanol (4 e 6 h) apresentaram na concentração utilizada, apenas inibição contra a bactéria patogênica Gram negativa *E. coli* e os fungos avaliados (*A. niger* e *P. stolonifer*). E, os óleos obtidos por EFS com CO_2 apresentaram atividade apenas para os fungos, nas duas condições apresentadas, com halo de inibição de 0,15±0,02 cm para *A. niger* e, 0,14±0,03 cm para *Penicillium stolonifer*; ambos para o óleo obtido a 50 ºC/ 160 bar/ 2h.

Aparentemente, a concentração de timol e carvacrol influencia em uma maior atividade e isso pode explicar os melhores resultados dos óleos obtidos por hidrodestilação e o padrão, que apresentaram um somatório de timol e carvacrol maior que os outros óleos obtidos.

Em relação aos micro-organismos avaliados, das bactérias, *E. coli* (Gram negativa) e *S. aureus* (Gram positiva), apresentaram maior sensibilidade em relação aos óleos essenciais utilizados, entretanto, das duas bactérias patogênicas, apenas *E. coli* foi sensível a oleoresina obtida por Soxhlet com etanol e, ambos os fungos avaliados apresentaram sensibilidade a todos óleos essenciais utilizados.

Normalmente as bactérias Gram negativas apresentam maior resistência que as Gram positivas aos efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais, devido as Gram positivas

apresentarem uma estrutura do envelope celular, o que podem afetar sua sensibilidade ao óleo. Alem disso, a estrutura da parede celular das Gram negativas por serem constituídas essencialmente por lipopolissacarídeo (LPS), evitam o acúmulo de óleos na membrana celular (SMITH-PALMER et al, 1998). Porém, isso nem sempre é verdadeiro (KARAPINAR; AKTUNG, 1987).

De acordo com a literatura, há uma grande diferença nas atividades antimicrobianas dos óleos para uma mesma planta. Por exemplo, para o óleo essencial de orégano, apresentaram maior sensibilidade *S. aureus* (LAMBERT et al, 2001) e *Enterococcus faecalis* (HAMMER et al, 1999). Essas variações podem estar relacionadas com os diferentes locais de plantio da planta, época de colheita, genótipo, clima, procedimento de secagem, metodologia de extração do óleo e parte da planta utilizada. Todas essas variáveis influenciam na composição química e concentração relativa de cada constituinte nos óleos (OUSSALAH et al, 2007).

Assim, esses resultados confirmam a importância dos estudos relacionados com bioatividade dos óleos essenciais, neste caso de orégano (*O. vulgare* L.), para uma possível aplicação em produtos que utilizam aditivos sintéticos como forma de conservar e aumentar sua vida útil. Além disso, o óleo volátil apresenta como vantagem em relação a sua matéria prima (planta), poder ser utilizado em menor quantidade por apresentar apenas os compostos principais aromáticos e com atividade antimicrobiana.

5.9.2 Observações nas mudanças das estruturas dos fungos por MEV

Especificações da morfologia de *A. niger* podem ser observadas por microscopia óptica e MEV, nas Figuras 42 e 43, onde o crescimento normal é evidente, aparentemente homogêneo, com hifas, septos, conidiosporos e conídios uniformes e normais. As hifas são tubulares e os conideosporos apresentam células lisas.

(a) (b)

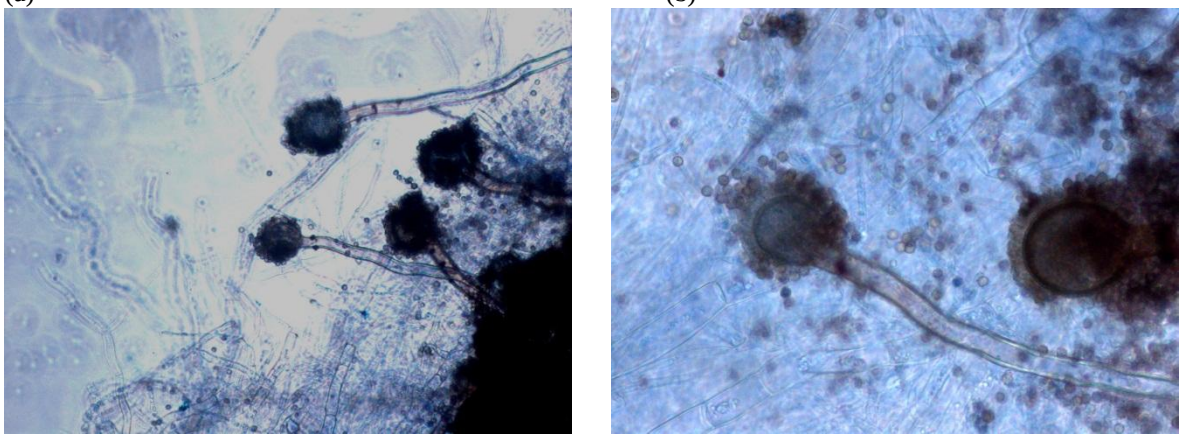
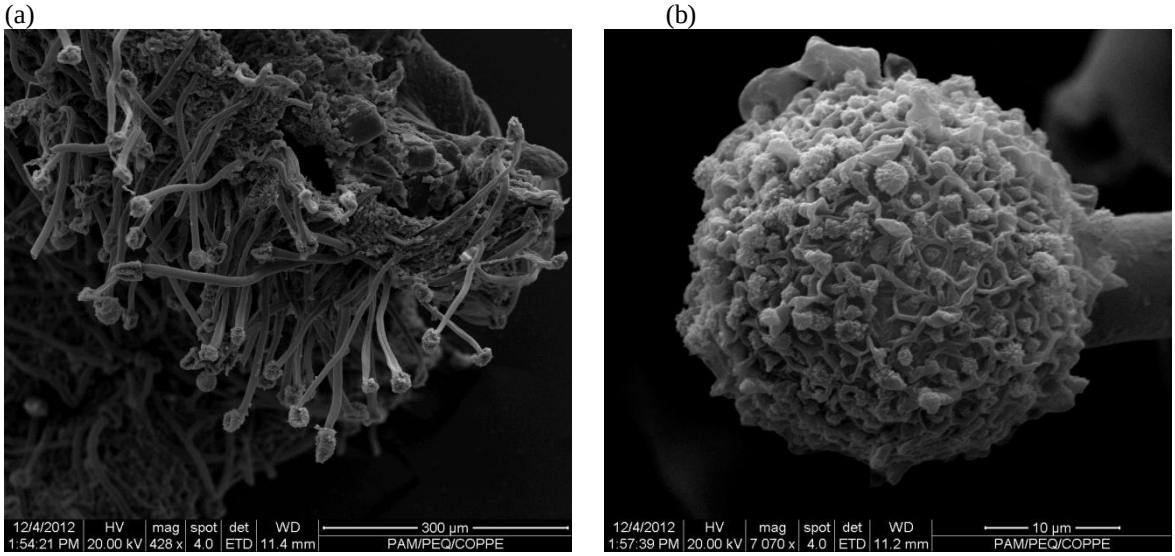


Figura 42 – Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica de *A. niger*, inoculado em ABD, a 30 ºC por 96h. (a, b) Visão geral do micélio de fungo controle, aparentemente homogêneo, com hifas e conidiosporos uniformes e normais.

(a) (b)



(c)

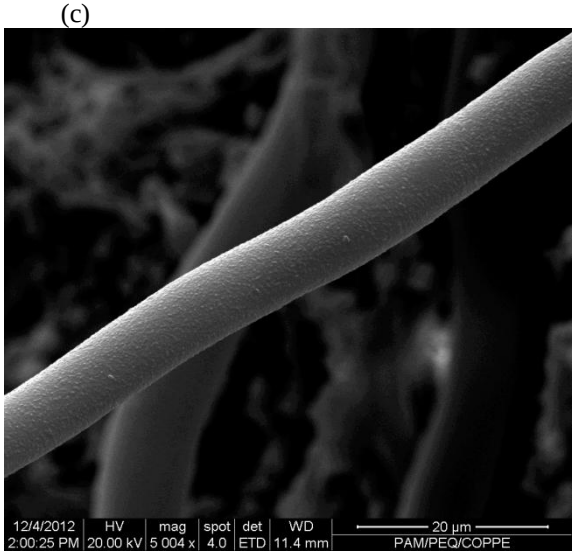


Figura 43 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. niger*, inoculado em ABD, a 30 ºC por 96h. (a) Visão geral do micélio de fungo controle, aparentemente homogêneo, com hifas, septos, conidiosporos e conídios uniformes e normais. (b) Detalhe do conidiosporo. (c) Detalhe da hifa.

Os efeitos do óleo essencial de orégano obtido por hidrodestilação, óleo essencial padrão, carvacrol, timol e propionato de cálcio na estrutura de *A. niger*, podem ser observadas ao nível de MEV, nas Figuras 44 e 45. O halo de inibição é considerado a exposição para inibição do óleo essencial de orégano (5 µg), e evidentes mudanças morfológicas podem ser visualizadas devido sua difusão no meio sólido (ABD).

As fotomicrografias do fungo exposto ao óleo essencial de orégano obtido por hidrodestilação (Fig. 44a-b) e óleo de orégano padrão (Fig. 44c-d) apresentam similaridade, que evidenciam a inibição da esporulação, com a falta de conídeos com deformação e dobra das hifas.

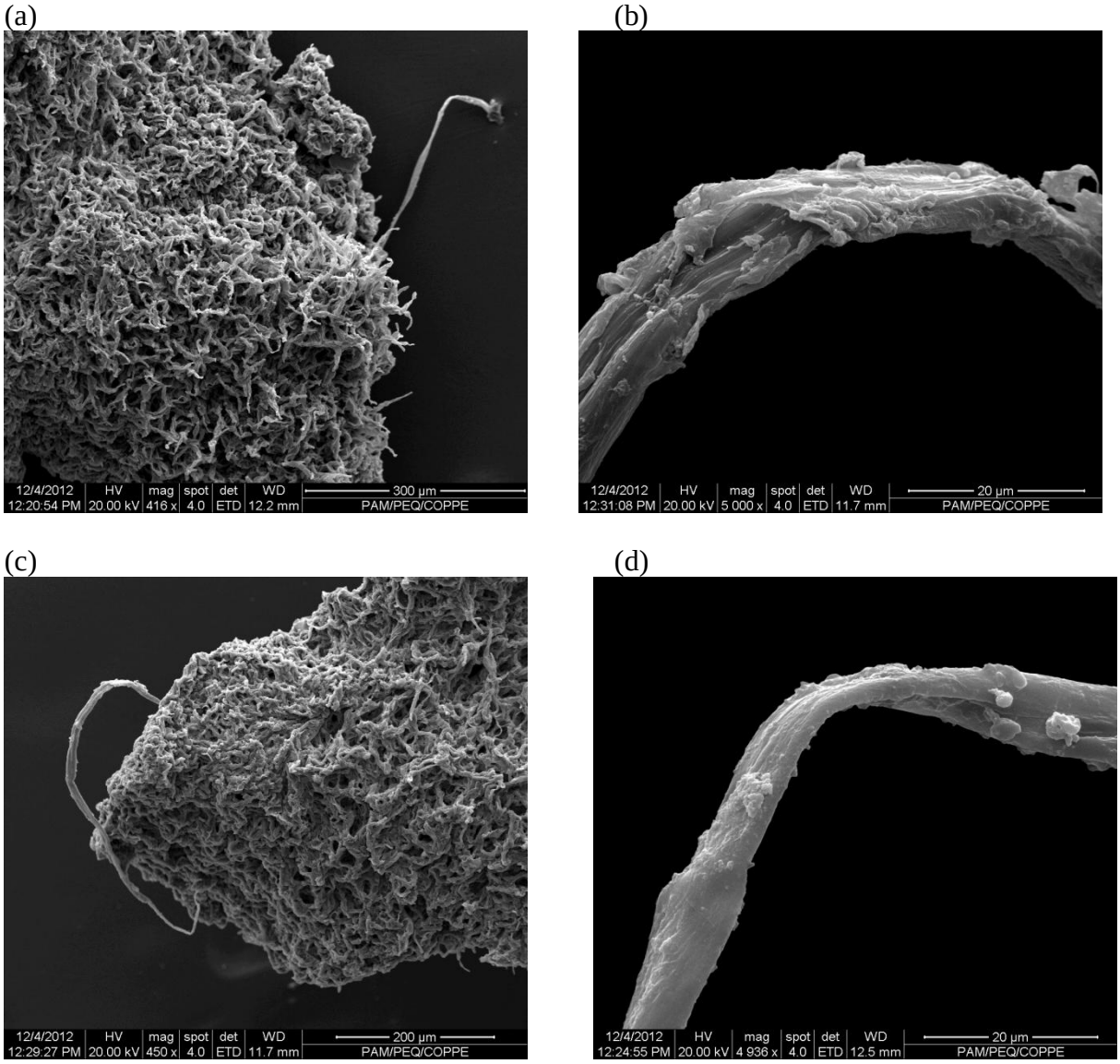


Figura 44 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. niger*, inoculado em ABD, a 30 ºC por 96h. (a-b) exposto ao óleo essencial de orégano obtido por hidrodestilação, (c-d) exposto ao óleo de orégano padrão (Sigma-Aldrich).

Na Figura 45 (a-d) são apresentadas as fotomicrografias do fungo exposto ao carvacrol, timol e propionato de cálcio. Carvacrol e timol (Fig. 45a e Fig. 45b) aparentemente descaracterizaram *A. niger*, não sendo observado esporulação e com as hifas cruzadas, descaracterizadas e indistinguíveis. O conservador sintético propionato de cálcio apresentou similar atuação ao timol e carvacrol, entretanto é possível visualizar poucas hifas deformadas, separadas do conjunto de hifas indistinguíveis (45c) e isolados conídeos (45d).

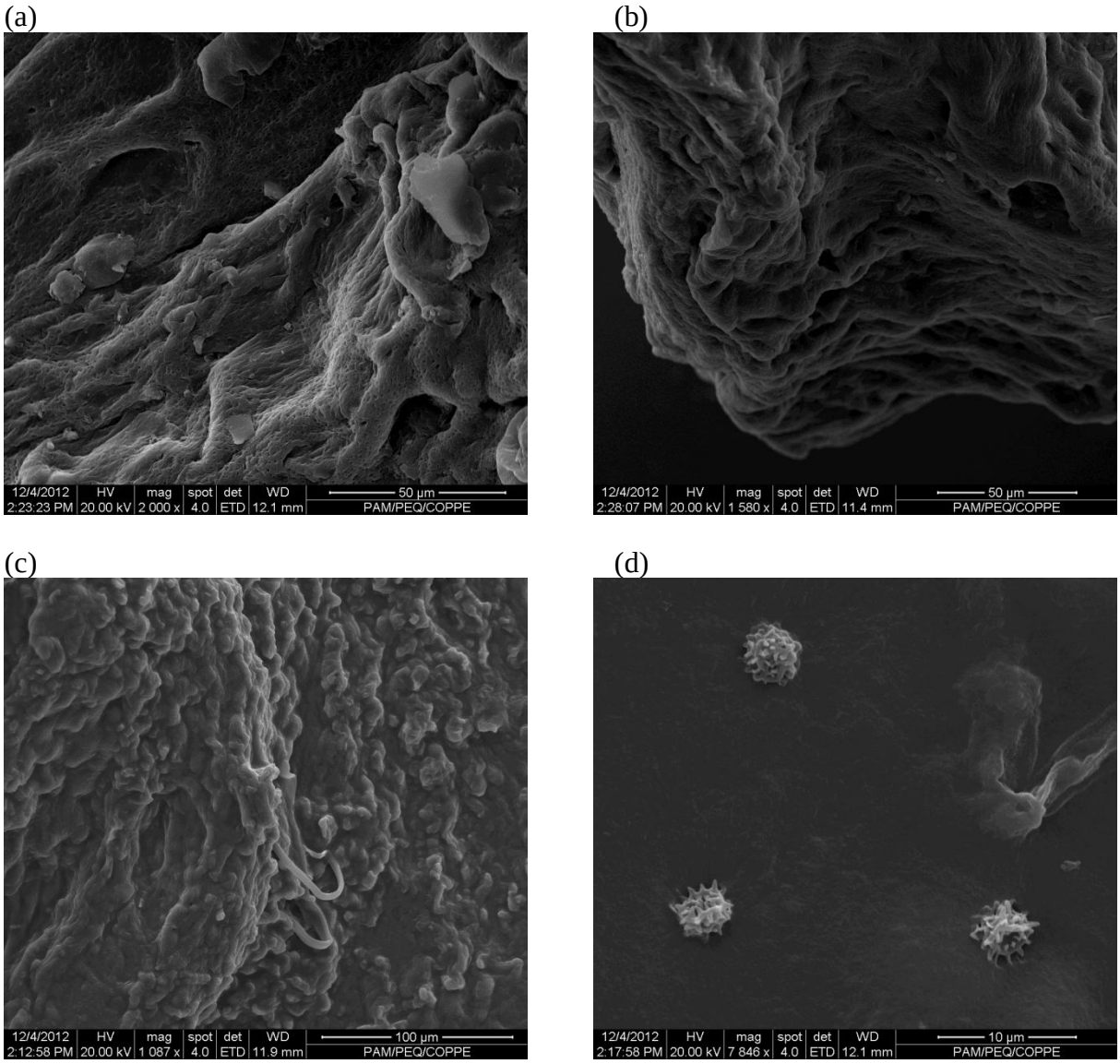


Figura 45 – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *A. niger*, inoculado em ABD, a 30 ºC por 96 h. (a) exposto ao carvacrol, (b) exposto ao timol, (c-d) exposto ao propionato de cálcio.

5.10 APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM PÃO DE FORMA

A escolha do pão de forma como alimento a ser aplicado e avaliado a bioatividade do óleo essencial de orégano como antimicrobiano, aumentando a vida de prateleira, justifica-se pelo fato deste produto ser de grande aceitação por consumidores de todas as faixas etárias e bastante acessível à população, sendo consumido por crianças, adolescentes e adultos (FISBERG; COZZOLINO, 1996).

O uso de farinha mista de trigo e chia para a formulação tem como finalidade aumentar o valor nutritivo do produto pois a chia (*Salvia hispanica* L.) é uma semente rica em ácidos graxos altamente insaturados, agregando valor e inovação ao produto. Além disso, o uso de farinha mais gordurosa necessitaria de um antioxidante, e o óleo essencial de orégano discutido no trabalho, apresenta esta bioatividade, mesmo não sendo este o foco da aplicação.

A formulação de farinha mista (FM) que melhor apresentou características favoráveis para fabricação foi a que continha 10% de farinha de chia, no total de farinha mista de trigo e chia. A formulação completa foi descrita em materiais e métodos, Tabela 9. Assim esta formulação foi utilizada para aplicação do óleo essencial de orégano na concentração de 0,02%, previamente selecionada para aplicação neste produto.

Há um aumento do aroma e do sabor do orégano em níveis elevados de aplicação em alimentos, especialmente a 1% (CHOULIARA et al, 2007). Por isso menores valores foram testados para aplicação no produto, buscando-se uma concentração com aceitação sensorial. Além disso, de acordo com Naidu (2000), óleo essencial de orégano nas concentrações de 0,02 a 0,05% apresentam completa inibição contra crescimento de uma variedade de fungos.

A aplicação do óleo no produto foi realizada de duas formas: na massa do pão e aspergido no produto após ser assado.

Um total de 3 produtos (pães), pão com farinha mista de chia e trigo, pão com FM de chia e trigo com 0,02% de óleo essencial na massa e, pão com FM de chia e trigo com 0,02% de óleo essencial de orégano aspergido no pão após ser assado.

Cabe ressaltar que o óleo aplicado (comercial, padrão da Sigma-Aldrich) que foi utilizado devido a necessidade de um maior volume para aplicação e avaliações iniciais do produto, apresentou maior composição em carvacrol que timol. Entretanto, na avaliação microbiológica utilizando o teste de difusão em Ágar, os óleos essenciais de orégano obtidos apresentaram resultados similares aos obtidos pelo óleo essencial padrão para os dois tipos de fungos filamentosos (bolores) *Aspergillus niger* e *Penicillium stolonifer*.

5.10.1 – Composição Centesimal e avaliação da atividade antifúngica

As características físico-químicas (composição centesimal) dos pães são apresentadas na Tabela 20. Foi verificado um aumento em percentual significativo ($p<0,05$) de lipídeos, isso pode ser explicado devido aos produtos de panificação à base de farinhas integrais, geralmente apresentares elevado teor lipídico. Os valores encontrados na composição centesimal para os pães com farinha mista de trigo e chia estão próximos aos descritos na literatura para pão de forma de trigo integral (NEPA, 2006).

Tabela 20 – Composição centesimal dos pães de forma

	Composição físico-química (%) (*n* = 3)				
Formulação	**Umidade**	**Proteína**	**Lipídeos**	**Carboidratos**	**Cinzas**
FT (controle)	31,13±0,67	8,32±0,07	2,69±0,41	56,33±0,71	1,53±0,01
FMTC*	31,47±0,12	7,61±0,66	4,81±0,02*	54,32±0,64*	1,79±0,03*
FMTC e OEO na massa	30,15±0,15	7,73±0,14	4,69±0,23*	55,61±0,46*	1,81±0,01*
FMTC e OEO aspergido	31,68±0,29	8,34±0,22	5,08±0,06*	52,60 ±0,53*	1,80±0,01*

FT – farinha de trigo, FMTC– farinha mista de trigo e 10% chia, OEO – óleo essencial de orégano. *Representa diferença significativa em relação ao controle (FT) pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

A avaliação da contaminação visual de fungos dos pães está apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 – Avaliação da contaminação visual fúngica nos pães de forma incubados a 30 ºC.

Dias	**FT**	**FMTC**	**FMTC e OEO na massa**	**FMTC e OEO aspergido**
4	-	-	-	-
5	-	+/-	-	-
6	+/-	+	-	-
7	+	++	+/-	+/-
8	++	++	+	+

FT – farinha de trigo, FMTC– farinha mista de trigo e 10% chia, OEO – óleo essencial de orégano. O seguintes símbolos para avaliação visual fúngica foram utilizadas: -: sem contaminação visual na superfície; +/-início de contaminação superficial visual; + contaminação avançada; ++ completa contaminação superficial visual. Dados foram obtidos de uma média de 3 repetições.

Os pães de forma com farinha mista de chia e trigo que foram aplicados óleo essencial na massa ou aspergido, estocados em estufa a 30 °C, apresentaram 2 dias a mais de vida de prateleira que o pão sem aplicação do óleo essencial. Em 7 dias os pães com farinha mista de

trigo e chia óleo essencial apresentaram inicial contaminação superficial por fungos, e o pão com a farinha mista sem óleo essencial apresentou praticamente completa contaminação superficial.

Foi realizada análise microbiológica de contagem total de fungos do pão com contaminação inicial visual na superfície, onde a contagem foi de *ca* de 2,3 x 10^4 UFC/g.

O pão de forma de farinha de trigo foi avaliado para comparar com o pão contendo farinha mista, conforme os resultados, o pão contendo farinha mista sem óleo essencial apresentou uma menor vida de prateleira, sendo este produto mais perecível.

Esses resultados demonstram a importância do uso de um antimicrobiano natural como o óleo essencial de orégano para produtos com maior valor nutritivo como os pães com farinha de chia que contém alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, representando assim um problema para a sua estabilidade devido susceptibilidade à ocorrência de reações de rancificação durante o armazenamento.

5.10.2 Aceitação sensorial

A análise sensorial foi realizada com os três diferentes produtos (Tabela 22). Cabe ressaltar que antes da realização da análise sensorial, os pães foram encaminhados para análise microbiológica para aprovação de acordo com as Resoluções vigentes da ANVISA e, um projeto acerca desta etapa do trabalho foi encaminhado para avaliação da Comissão de ética da UFRRJ, processo n. 23083.000388 / 2013 - 02.

Tabela 22 – Análise sensorial dos pães de forma.

Pães	**Atributos**				
	Cor	**Aroma**	**Sabor**	**Textura**	**Impressão Global**
FM chia e trigo	7,89±0,86[a]	7,28±1,40[a]	7,80±1,00[a]	7,80±1,29[a]	7,93±0,94[a]
FM chia e trigo/ OEO 0,02% massa	8,00±0,82[a]	7,59±1,29[b]	7,78±1,16[a]	8,03±1,07[a]	7,97±1,06[a]
FM chia e trigo/ OEO 0,02% aspergido	7,84±0,93[a]	7,46±1,30[ab]	7,68±1,33[a]	7,90±1,17[a]	7,75±1,11[a]

FM – farinha mista, OEO – óleo essencial de orégano. Valores com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). DMS – Diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

Os três diferentes produtos apresentaram valores próximos em relações a quatro dos cinco atributos avaliados: cor, aroma, sabor, textura e impressão global. Apresentando assim aceitação igual, a 5% de significância.

Para o atributo aroma, os pães elaborados com óleo essencial de orégano, apresentaram maiores valores em relação ao pão sem este aromatizante. A pontuação média de 60 provadores para este atributo foi de 7,59 e 7,46, para os pães com aplicação do óleo na massa e aspergido, respectivamente, em uma escala de 0 a 9. O pão com óleo na massa apresentou diferença significativa a 5% em relação ao não aromatizado.

Este resultado é explicado pelas características dos óleos essenciais, que são aromatizantes naturais, que apresentam compostos monoterpênicos aromáticos, como carvacrol, timol e p-cimeno.

Em relação a intenção de compra, os três produtos avaliados apresentaram resultado satisfatório, onde o maior percentual obtido foi ‘provavelmente compraria” (Figura 46). Além disso, apresentaram índice de aceitação sensorial de 88,55% e 86,11±1,10%, para pão de forma com farinha mista com óleo de orégano na massa e aspergido, respectivamente.

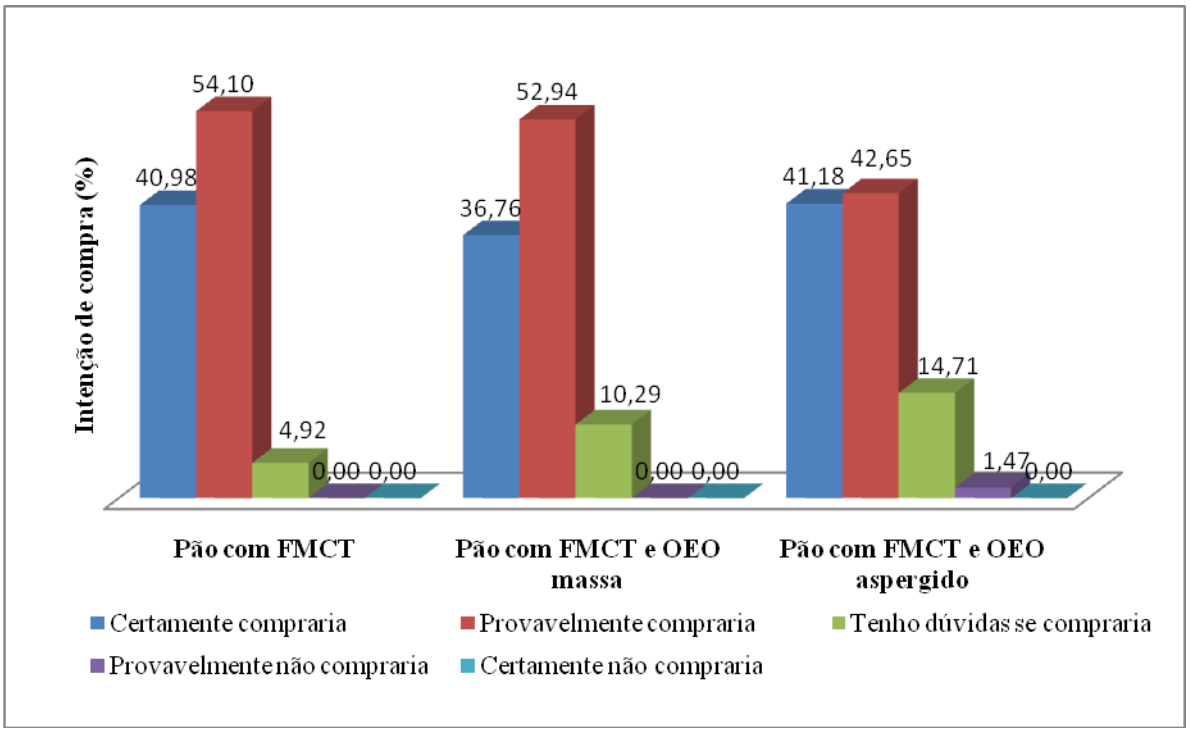


Figura 46 – Intenção de compra dos pães com farinha mista de chia e trigo (FMCT) sem e com óleo essencial de orégano (OEO).

Os resultados sugerem o interesse dos consumidores pelos produtos com adição de óleo essencial em pão de forma com farinha mista de trigo e chia, não tendo sido observada rejeição para a formulação com aplicação na massa.

Dessa forma, foi comprovado que o óleo essencial de orégano pode ser utilizado como uma alternativa natural para o aumento de vida de prateleira do pão de forma formulado com farinha mista de chia e trigo e que além de mostrar a possibilidade do uso do óleo essencial como alternativa aos conservadores sintéticos, demostrou apresentar aceitação sensorial no produto avaliado aplicado na massa do pão ou aspergido, confirmado pelo índice de aceitação sensorial superior a 70%.

Não foi encontrada na literatura consultada a aplicação de óleo essencial de orégano em pão de forma como antimicrobiano, apenas em embalagens.

Normalmente produtos de padaria e dos seus ingredientes, apresentam 60% como responsáveis pela contaminação os fungos (*Penicillium* spp. e *Aspergillus niger*), enquanto que as leveduras são responsáveis por apenas 15%. Além da visão negativa de crescimento visível, os fungos são responsáveis pelo sabor estranho, por produção de micotoxinas, bem como compostos alergênicos (NIELSEN; RIOS, 2000). Embora os fungos sejam destruídos durante o cozimento, pode ocorrer recontaminação durante o empacotamento e subsequente arrefecimento fazendo com que ocorra a contaminação por fungos após o processamento. Assim, a utilização do óleo essencial aspergido pode ser uma melhor alternativa para esses produtos em relação a aplicação na massa. Neste trabalho, entretanto, a forma de aplicação dos óleos na concentração de 0,02% no pão de forma não influenciou na vida de prateleira.

6 CONCLUSÃO

A matriz orégano (*Origanum vulgar* L.) apresentou um percentual de compostos bioativos como timol e carvacrol, de até 38,82% e 7,82% respectivamente, avaliados por microextração em fase sólida (SPME), o que demonstra sua escolha para extração e aplicação de seus óleos. Dentre as técnicas de extração analisadas, a SPME apresentou maior eficiência em números de compostos extraídos e percentual em área relativa com a fibra polidimetil siloxano-divenilbenzeno (PDMS-DVB) utilizando em um mesmo método de extração as temperaturas de 80 ºC e 40 ºC por 20 minutos cada.

Dos óleos essenciais obtidos por diferentes métodos de extração o óleo obtido por extração com CO_2 supercrítico (EFS) à 160 bar em 50 ºC por 2h, apresentou resultados favoráveis para rendimento em óleo, composição em timol e atividade antioxidante. O óleo obtido por hidrodestilação apesar de apresentar maior concentração em bioativos como timol, apresentou menor atividade antioxidante, o que foi explicado pelo maior percentual em p-cimeno, que e o precursor metabólico do timol. Entretanto, este óleo foi o que apresentou atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos avaliados (*Salmonella Typhimurium, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterecoccus faecalis, Aspergillus niger* e *Penicillium stolonifer*).

Em relação a atividade antioxidante, o óleo obtido por Soxhlet com etanol por 6h foi o que apresentou melhores resultados.

A análise térmica mostrou-se uma ferramenta importante no monitoramento da composição e rendimento no processo de extração do referido trabalho. A técnica de Termogravimetria (TG) mostrou que a estabilidade térmica do óleo essencial de orégano obtido pelo método de extração Soxhlet com etanol não modificou com o aumento do tempo de extração de 4 para 6 horas. Além disso, mostrou 20% de compostos inorgânicos (confirmados EDXRF) presentes nestas oleoresinas. A Termogravimetria Derivada mostrou que o produto obtido por extração foi heterogêneo, necessitando de processo de purificação. A Análise Térmica Diferencial ilustrou que a decomposição do triglicerídeo presente no produto obtido foi por oxidação, além de ter mostrado que a principal diferença entre os padrões timol e carvacrol foi a temperatura de fusão em 50 ºC no timol.

Os diferentes óleos obtidos apresentaram uma eficácia maior contra *E. coli* e *S. aureus*, além de apresentarem atuação contra fungos *A. niger* e *Penicillium stolonifer*, melhor que os conservadores sintéticos utilizados (ácido sórbico, ácido benzóico e propionato de

cálcio), avaliados pelo tamanho do halo de inibição. Além disso, a microscopia eletrônica de varredura confirmou a atuação do óleo essencial de orégano contra estes fungos.

O óleo essencial de orégano a uma concentração de 0,02% p/p apresentou ser uma eficiente forma de substituição de aditivos sintéticos para o produto pão de forma com farinha de chia e trigo, aumentando a vida útil em até 2 dias, comparado com o produto controle. Maiores concentrações poderiam aumentar a atividade antimicrobiana, entretanto, poderia afetar a aceitação sensorial, que apresentaram índice de aceitação sensorial para impressão global de até 88,56%, indicando uma boa aceitação sensorial, requisito importante para comercialização de produtos alimentícios.

TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o tempo de estabilidade dos óleos essenciais de orégano em relação a concentração de timol e carvacrol;
- Avaliar diferentes matrizes como fontes de bioativos;
- Avaliar a influência dos diferentes tamanhos de partículas das matrizes a serem extraídos os óleos essenciais no rendimento, composição em compostos bioativos e estabilidade térmica;
- Aplicar o óleo essencial de orégano em outros produtos comparando com outros aditivos sintéticos e atuação;
- Avaliar efeitos sinergísticos na atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de orégano em aplicação junto com aditivos sintéticos.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J. C., HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. London: Applied Science, 1983. 199p.

ANDERSON, L.; DIBBLE, M. V.; TURKKI, P. R.; MITCHELL, H. S. **Nutrição.** 17.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p. 119-123.

ARANHA, F. Q.; BARROS, Z. F.; MOURA, L. S. A.; GONÇALVES, M. C. R.; BARROS, J. C.; METRI, J. C.; SOUZA, M. S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista Nutrição**, v. 13, p.89-97. 2000.

ARAÚJO, J. M. A. **Antioxidantes fenólicos sintéticos em alimentos**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1998. p.1-5.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, p. 2145–2148.1990.

ATARÉS, L.; BONILLA, J.; CHIRALT, A. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 678-687. 2010.

AZIZAH, A. H.; RUSLAWATTI, N. M.; TEE, T. S. Extraction and caracterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 199-202. 1999.

BAKER, G. R., LOWE, R. F.; SOUTHWELL, I. A. Comparison of oil recovered from tea tree leaf by ethanol extraction and steam distillation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 48 p. 4041–4043. 2000.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475. 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n.1, p. 191-203. 2006.

BARA, M. T. F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica***. 1992. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosas, 1992.

BAROCELLI, E.; CALCINAA, F.; CHIAVARINIA, M.; IMPICCIATOREA, M.; BRUNIB, R.; BIANCHIB, A.; BALLABENI, V. Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida Reverchon* “Grosso” essential oil. **Life Sciences**, v. 76, p. 213–223, 2004.

BASHER, K. H. C.; OZEK, T.; DEMIREHAKMAK, B.; NURIDDINOV, K. H. R.; ABDUGANIEV, B.Y. O.; ARIPOV, K. H. .N., KHODZIMATOV, K. K. H.; NIGMATULLAEV, O. A.; SHAMYANOV, E. D. Essential oils of some Artemisia species from central Asia. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 33, p. 293–295. 1997.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p.169-172. 2004.

BAYRAMOGLU, B.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 535-540, 2008.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B.V. **Secundary Plants Products**. New York: Springer – Verlag, 1980.

BENKACI-ALI, F.; BAALIOUAMER, A.; EKLATI, B.Y.; CHEMAT, F. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa e*xtracted by microwave and hydrodistillation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 148–153. 2007.

BERNARDO-GIL, M.; RIBEIRO, M. A.; ESQUÍVEL, M. M. Produção de extratos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. **Boletim Biotecnologia**, v. 73, p. 14-21. 2002.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 528-534. 1992.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130. 1999.

BICCHI, C.; DRIGO, S.; RUBIOLO, P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 469-485. 2000.

BILJANA, D.; ZIKA, L.; VLADIMIR, Z.; ALEKSANDAR, T. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO_2: Comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 143–149. 2005.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

BRASIL. Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. **Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 dez. 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333. 1998.

BRUNNER, G. **Gas Extraction**. New York: Steinkopff Darmstadt Springer, 1994. p.3-5.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253. 2004.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, p. 49-55. 1993.

CARVALHO, C. C. C. R. De; FONSECA, M. M. R. De. Biotransformation of Terpenes. **Biotechnology Advances,** v.24, p.134-142. 2006.

CAVERO, S.; GARCÍA-RISCO, M.R.; MARÍN, F.R.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G.; IBAÑEZ, E. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano - Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. **Journal of Supercritical Fluids**, v.38, p.62-69, 2006.

CEAGESP - Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/cotacoes/index_html?b_start:int=80&grupo_nome=Verduras&consultar=Consultar&grupo=3&data=16/04/2010>. Acesso em: 20 jan. 2010.

CERPA, M. G.; MATO, R. B.; COCERO, M. J.; ROBERTA CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A.; PRADO, J. M.; LEAL, P. F.; TAKEUCHI, T. M.; MEIRELES, M. A. A. **Steam Distillation Applied to the Food Industry**, cap. 2, p.35-38, 2009. In Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications. Meireles, M.A.A. 2009.

CHARLES, D. J.; JOLY, R. J.; SIMON, J. E. Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2837–2840. 1990.

CHIPAULT, J.R.; MIZUN, G.K.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55. 1952.

CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 ºC. **Food Microbiology**, v. 24, p. 607-617. 2007.

CIETTI, E.; MERLE, P.; CHAINTREAU, F. Quantization in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 450–459, 2008.

COELHO, G. L. V. Modelagem do Processo de Extração com Fluido Supercrítico**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 14, p. 186-196, 1994.

COELHO, G.L.V.; AUGUSTO, F.; PAWLISZYN, J. Desorption of Ethyl Acetate from Adsorbent Surfaces *Organo-clays* by Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** v. 40, n. 1, p. 364. 2001.

CONNER, D. E. Naturally occurring compounds. In Davidson, P. M., Branen, A. L. (Eds.), **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker, p. 441–468, 1993 apud SANDRI, I. G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry**, v. 103, p. 823–828. 2007.

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A. **Dictionary of Terpenoids.** London: Chapman and Hill, 1991.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564–582. 1999.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINTON, J. R., WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meleuca alternifolia* (tea tree oil**). Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170–175. 2000.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 210p.

CROWE, T. D., WHITE, J. Oxidative stability of walnut oils extracted with supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil Chem. Soc**., v. 80, p. 569-574, 2003.

DELAZAR, A.; TALISCHI, B.; NAZEMIYEH, H.; REZAZADEH, H.; NAHAR, L.; SARKER, S.D. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 286-290. 2006.

DELFINE, S.; LORETO, F.; PINELLI, P.; TOGNTTI, R.; ALVINO, A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.106, p. 243-252, 2005.

DEMEESTERE, K.; DEWULF, J.; WITTE, B.; VAN LANGENHOVE, H. Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 130–144. 2007.

DIÁZ-MAROTO, M.C.; PALOMO, E.S.; CASTRO, L.; VINAS, M.A.G.; PEREZ-COELLO, M.S. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L.) during drying. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 2070–2076, 2004.

DUNN, C.; SLEEP, J.; COLLETT, D. Sensing an improvement: an experimental study to evaluate the use of aromatherapy, massage and periods of rest in an intensive care unit. **Journal of Advanced Nursing**, v. 21, p. 34–40. 1990.

DURÁN, R. M.; PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v.44, n.2, p.101-106. 1993.

EMIROĞLU, Z. K.; YEMIŞ, G. P.; COŞKUN, B. K.; CANDOĞAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, p. 283-288. 2010.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v.22, p.896-902. 2001.

European Medicines Evaluation Agency. **Note for guidance on clinical practice**, CPMP/ICH/135/95. London: EMEA**,** 1997 apud BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Considerações e definições para Pesquisa Clínica**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm. Acesso em: 20 jan. 2011.

EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; TSIMIDOU, M. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5294–5299. 2002.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry**, 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073395.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2011.

FERGUSON, L. R., HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 8, p. 17-25. 1999.

FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas.** Viçosa. UFV, 2006. 432p.

FIGIEL, A.; SZUMNY, A.; GUTIÉRREZ-ORTÍZ, A.; CARBONELL-BARRACHINA, A.A. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. **Journal of Food Engineering**, v.98, p.240-247, 2010.

FISBERG, M.; COZZOLINO, S. M. **Valor nutritivo do pão francês**. São Paulo: V. Macedo Alimentos, 1996.

FORNARI, F.; RUIZ-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, G.; VAZQUEZ, E.; GARCIA-RISCO, M. R.; GREGLERO, G. Kinetic study of the supercritical CO2 extraction of different plants from Lamiaceae Family. **J. of Supercritical Fluids,** v. 64, p. 1– 8. 2012.

FURTADO, F. A.; COELHO, G. L. V. 2012. Determination of infinite dilution activity coefficients using HS-SPME/GC/FID for hydrocarbons in furfural at temperatures of (298.15, 308.15, and 318.15) K. Journal of Chemical Thermodynamics, v. 49, p. 119–127. 2012.

GAVAHIAN, M.; FARAHNAKY, A.; JAVIDNIA, K.; MAJZOOBI, M. Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 14, p. 85–91, 2012.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, p. 700–703. 1990.

GIACOMETTI, D. C. **Ervas Condimentares e Especiarias**. São Paulo: Nobel, 1989. 81p.

GIOTI, E.M.; FIAMEGOS, Y.C.; SKALKOS, D.C.; STALIKAS, C.D. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. **Food Chemistry**, v. 117, p. 398–404. 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatinechitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, p. 889-896, 2010.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (O*cimim selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, p.8-14, 2003.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.175-180. 2010.

GRAHAM, P. H.; BROWNE, L.; COX, H.; GRAHAM, J. Inhalation aromatherapy during radiotherapy: results of a placebo controlled double-blind randomized trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, p. 2372–2376. 2003.

GRIGONIS, D.; VENSKUTONIS, P.R.; SIVIK, B.; SANDAHL, M.; ESKILSSON, C. S. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 3, p. 223-233. 2005.

GUILLAND, J. C.; LEQUEU, B. **As vitaminas do nutriente ao medicamento**. São Paulo: Santos, 1995. 375p.

GUPTA, R. B.; SHIM, J-J. Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. Boca Raton: CRC Press., 2007. p. 1.

HAGEN, T. M.; INGERSOLL, R. T.; LYKKESFELDT, J.; LIU, J.; WEHR, C. M.; VINARSKY, V.; BARTHOLOMEW, J. C.; AMES, A. B. (R)-alpha-lipoic acid supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. **FASEB Journal**, v. 13, p. 411-418. 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation, and antioxidant protection in chloroplasts. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.44, p.327–340, 1987.

HARTMANS, K. J.; DIEPENHORST, P.; BAKKER, W.; GORRIS, L. G. M. The use of carvone in agriculture; sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 3-13. 1995.

HAWTHORNE, S.B. Analytical-scale supercritical fluid extraction**. Analytical Chemistry,** v. 62, p. 633A-642A, 1990.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. **Food Chemistry**, v. 98, p. 136-148. 2006.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273-292. 2005.

HU, G.; CHEN, H.; CAI, J.; DENG, X. Solubility and micronization of griseofulvin in supercritical CO_2 with cosolvent acetone. In: Proc 6th Int. Symp. Supercrit Fluid, v.3, p.1725-1734, 2003.

HUI, Y. H.; JOHN, W. SONS PUBLICATION, USA. **Handbook of food products manufacturing**, 2007.

IARC. Some industrial chemicals. **International Agency for Research on Cancer**, v.60, p.398, 1994.

IETSWAART, J. H. **A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae)**. 1980. PhD thesis. Leiden Botanical Series 4, Leiden University Press.

IMPORTADORA DE SEMENTES PARA LAVOURA-ISLA. **Catálogo 2006/2007.** Porto Alegre: Isla Sementes, 2006. 74p.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUSHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 565–573. 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICVA (IBGE). Censo Agropecuário 2006 apud BRAINER, J. S. C. P.; SENA, J. V. C. Ervas aromáticas. **Informe rural Etene**, ano 4, v.3, 2010.

JALSENJAK, V.; PELJNAJK, S.; KUSTRAK, D. Microcapsules of sage oil: essential oils content and antimicrobial activity. **Pharmazie**, v.42, p.419–420, 1987.

JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; MILOŠ, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, p.36, 649-654. 2001.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 193-202. 2005.

KALT, W.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A; PRIOR, R. L. Anti- oxidant capacity, vitamin C. Phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4638-4644. 1999.

KAWASE, K. Y. F.; ALVARENGA, C. M.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Extração de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) com CO_2 supercrítico e métodos convencionais. **Revista Analytica**, v. 53, p. 58-67. 2011.

KAWASE, K. Y. F.; FURTADO, F. A.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Changes in essential oil of *Origanum vulgare* L. affected by different extraction methods. **International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences,** v. 14**.** 2013.

KAWASE, K. Y. F.; MOTHÉ, C. G.; COELHO, G. L. V. Carvacrol e timol: caracterização térmica em óleo essencial de orégano. In: VIII Congresso Brasileiro e III Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria, 1-4 abril 2012. São Paulo. **Anais do VIII Congresso Brasileiro e III Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria.** São Paulo. 2012.

KAWASE; K. Y. F.; LUCHESE, R. H.; COELHO, G. L. V. Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, junho. 2009.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; DARDIOTI, A.; KRIGAS, N.; LANARAS, T. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v. 44, p. 883-886. 1997.

KOKKINI, S.; VOKOU, D.; KAROUSOU, R. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgar* L. in Greece**. Botanika Chronika**, v. 10, p.337-346. 1991.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640. 2004.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244–282. 2007.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453-462. 2001.

LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-501, 2005.

LEVIN, D. A. The role of trichomes in plants defense. **The Quarterly Review of Biology, Baltimore**, v.1, p.3-15. 1973 apud JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).** 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2008.

LI, J.; ZHANG, M.; ZHENG, T. The in vitro antioxidant activity of lotus germ oil from supercritical fluid carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 115, p. 939-944. 2009.

LOOMIS, W. E. Growth-differentiation balance vs carbohydrate-nitrogen ratio. **Proceedings of American Society of Horticultural Science,** v. 29, p. 240-245. 1932

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153–193. 2000.

MAGGI, F.; PAPA, F.; CRISTALLI, G.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S. Characterization of the mushroom-like flavor of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *Melissophyllum* by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Food Chemistry**, v. 123, p. 983-992. 2010.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MAÑAS, P.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1387-1399. 2005.

MANSO, S.; CACHO-NERIN, F.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. **Food Control**, v. 30, p. 370-378. 2013.

MANZAN, A. C. C. M.; TONIOLO, F. S.; BREDOW, E.; POVH, N. Extraction of essential oil and pigments from *Curcuma longa* [L.] by steam distillation and extraction with volatile solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 6802–6807. 2003.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oil from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195. 2001.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 245-248. 1997.

MARTOS, P.A.; PAWLISZYN, J. Calibration of Solid Phase Microextraction for Air Analyses Based on Physical Chemical Properties of the Coating. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 206-215, 1997.

MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. **Journal of Cleaner Production**, v. 13, p. 833–839. 2005.

MAUL, A. A. Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. *Revista* **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 42-46. 1999.

MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. De. Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO_2 a altas pressões. **Química Nova**, 29, 1198-1202. 2006.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577. 2005.

MEIRELES, M.A.A. **Extraction and Purification of Bioactive Compounds**, cap. 1, p. 4-7, 2009. In Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications. Meireles, M.A.A. 2009.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 36, p. 1-11. 2002.

MENDONZA-YEPES, M.J.; SANCHEZ-HIDALGO, L.E.; MAERTENS, G.; MARIN-INIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 47-55. 1997.

MILAN, S. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 531–537. 2006.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v. 26, p. 211–219.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela; 1998.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D. **Análise Térmica de Materiais.** São Paulo. Ieditora, 2002. 300p.

MULLER, L.; GORECKI, T.; PAWLISZYN, J.; FRESENIUS, J. **Analytical Chemistry**, v. 364, p. 610. 1999.

NAIDU, A.S. **Natural Food Antimicrobial Systems.** Washington, D.C. CRC Press, 2010. 801p.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.29, n. 4, p. 273-300. 1990.

NARDINI, G. S.; MERIB, J. O.; DIAS, A. N.; DUTRA, J. N. B.; SILVEIRA, C. D. S.; BUDZIAK, D.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Determination of volatile profile of citrus fruit by HS-SPME/GC-MS with oxidized NiTi fibers using two temperatures in the same extraction procedure. **Microchemical Journal**. 2012. doi:10.1016/j.microc.2012.03.024

NAZER, A.I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.-L.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v.22, p.391-398, 2005.

NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.219–229. 2000.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiology Reviews**, v.49, p.1–32. 1985.

NOSTRO, A.; GERMANO, M. P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.,; CANNATELLI, M. A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p.379–384. 2000.

OCAÑA-FUENTES, A.; ARRANZ-GUTIÉRREZ, E.; SEÑORANS, F.J.; REGLERO, G. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1568–1575. 2010.

OLIVEIRA, R.; RODRIGUES, M. F.; BERNARDO-GIL, M. G. Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. **JAOCS**, v,79, p.225-230. 2002.

ORDÓNEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. São Paulo: Artmed, 2005. 294p.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.155–162. 1997.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes.* **Food Control**, v. 62, n.2, p. 414-20. 2007.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and engineering with supercritical fluids in pharmaceutics. **Pharmaceutical Sciences**, v.27, p.299-310, 2006.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: Theory and practice**. New York: Wiley-VCH, 1999.

PERERA; R. M. M.; MARRIOT, P. J.; GALBALLY, I. E. Headspace solid-phase microextraction—comprehensive two-dimensional gas chromatography of wound induced plant volatile organic compound emissions. **Analyst**, v. 127, p. 1601-1607. 2002.

PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUR, F. Ennancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes. Part I: micronization of meat particles. ***Int. J. Pharm.***, v. 288, p. 3-10, 2005.

PFLUG, I.; GOULD, G.W. Heat Treatment. In B. M. Lund, A. Baird-Parker & G. M. Gould (Eds.), **The Microbiological Safety and Quality of Food**. Maryland: Aspen Publishers Inc., p.36-64, 2000 apud ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, p. 896-902. 2001.

POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of Natural antioxidants. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON,M. **Antioxidants in food***:* practical applications. New York: CRC Press, 2001.p. 311-330.

POKORÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 223-227, 1991.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, p. 289-97. 1997

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography**, v.1163, p.2-24, 2007.

PRELA-PANTANO, A.; TERAMOTO, J. R. S.; FABRI, E. G. **O cultivo e a comercialização de orégano.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Oregano/index.htm>. Acesso em: 19 jan 2011

RAJESWARA RAO, B. R. Biomass and essential oil yields of cornmint (*Mentha arvensis* L. f. *piperascens* Malinvaud *ex* Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, v.10, p.107–113. 1999.

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

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO_2 extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284. 2002.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. The properties of gases and liquids. Fourth Edition. New York: McGraw-Hill, 1987. p.667.

REIS, H. A. S.; TAVARES, L. V.; GOMES, R. A.; MALUF, W. R. **Cultivo do orégano (*Origanum vulgare L.)***. Boletim Técnico de Hortaliças – UFLA, n. 49, 2000.

REVERCHON, E.; MARCO, I. De. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166. 2006.

REVERCHON, E.; SENATORE, F. Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO_2 extraction. **Journal of Flavour and Fragrance**, v.7, p. 227. 1992.

RIBA, A.; BOURAS, N.; MOKRANE, S.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products**. Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2772–2777. 2010.

RIBEIRO, M. A.; ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G. A extração supercrítica e os antioxidantes naturais. **Ingenium**, p.141-143, março/abril. 2007.

ROCHA, J. Antioxidantes Naturais: Mantendo o frescor naturalmente. **Revista Food Ingredients**, n. 4, p. 44-46. 2008.

RODEA-GONZÁLEZ, D. A.; CRUZ-OLIVARES, J.; ROMÁN-GUERRERO, A.; RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; VERNON-CARTER, E. J.; PÉREZ-ALONSO, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering,** v. 111, p. 102–109. 2012.

RODILLA, J. M.; SILVA, L.A.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DAVYT, D.; CASTILLO, L.; GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; ZROSTLÍKOVÁ, J.;

DELLACASSA, E. Advances in the identification and agrochemical importance of sesquiterpenoids from *Bulnesia sarmientoi* essential oil. **Industrial Crops and Products,** v. 33, p. 497-503, 2011.

ROJAS, M. C.; BREWER, M. S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. **Journal of Food Science**, v.72, n.4, p.282–288, 2007.

ROSA, P. T. V.; PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; ANDRÉS MOURE, A.; DÍAZREINOSO, B.; SMITH, R. L.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L. J.; PETERS, C. J.; GOTO, M.; SUSANA LUCAS, S.; MEIRELES, M. A. A. **Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to the Food Industry**, cap. 6, p.273-288, 2009. In Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications. Meireles, M. A. A. 2009.

ROSSATO, M.; DOS SANTOS, A.C.A.; SERAFINI, L.A.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M.R.; WASUM, R.; BARBIERI, R.L. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (briquet) moldenke (verbenaceae) do sul do Brasil. **Química Nova**, v.29, p.200-202, 2006.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid models systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-174. 2000.

RUSSO, M.; GALLETTI, G.C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3741-3746. 1998.

SAAD, B.; SING, Y.Y.; NAWI, M.A.; HASHIM, N.; ALI, A.S.M.; SALEH, M.I.; SULAIMAN, S.F. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. **Food Chemistry**, v.105, p.389–394, 2007.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. Food and Indoor Fungi (1st Edition). Utrecht, The Netherlands.: Centraalbureau voor Schimmelcultures.2010.

SANDRI, I. G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry**, v. 103, p. 823–828. 2007.

SANTOS, A. L.; CHIERICE, G. O.; ALEXANDER, K. S.; RIGA, A.; MATTHEWS, E. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, p. 821–825. 2009.

SANTOS; A. L. F.; KAWASE, K. Y. F.; COELHO, G. L. V. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 277–282. 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M;, DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275–280. 2004.

SAWAMURA, M.; SONA, U.-S.; CHOIB, H.-S.; KIMB, M.-S. L.; PHIA, N.T.L.; FEARSC, M.; KUMAGAI, C. Compositional changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. **The International Journal of Aromatherapy,** v. 14, p. 27–36. 2004.

SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. **Food Research International**, v. 40, p. 15–21. 2007.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, p. 639–644. 2006.

SHAIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics:** sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281-319.

SHEN, S.; SHA, Y.; DENG, C.; FU, D.; CHEN, J.; ZHANG, X. Comparison of solid phase microextraction, supercritical fluid extraction, steam distillation, and solvent extraction technicques for anlaysis of volatile constituints in *Fructus Amomi*. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 418-423. 2005.

SHIREY, R. E. Optimization of extractions conditions and fiber selection for semivolatile analytes using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 279–288. 2000.

SILVA, C. P. Da. **Poiretia latifólia e Poiretia tetraphylla**: Estudo dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares. 2005. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SILVA, R. A. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil**. Ciência Rural,** v. 36, p. 1842-1848. 2006.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianopolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

SINGH, H. P.; KAUR, S.; MITTAL, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Phytotoxicity of major constituents of volatile oil from leaves of Artemisia scoparia Waldst & Kit. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 663-666. 2008.

SINGH, H. P.; KAUR, S.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of Artemisia scoparia. **Food Chemistry**, v.114, p.642–645, 2009.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SISTEMA ALICE DO MINISTÉRIO DO DESENCOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC). Disponível em: <www.mdic.gov.br>. Acesso em: 20 jan 2011.

SIVROPOULOU, A.; NIKOLAOU, C.; PAPANIKOLAOU, E.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of Salvia fruticosa essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3197–3201. 1997.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. J. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química.** 7 ª Edição. São Paulo: LTC, 2007.

SMITH, R. L.; COHEN, S. M.; DOULL, J.; FERON, V. J.; GOODMAN, J. I.; MARNETT, L. J.; PORTOGHESE, P. S.; WADDELL, W. J.; WAGNER, B. M.; HALL, R.L.; HIGLEY, N.A.; LUCAS-GAVIN, C.; ADAMS, T. B. Procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 345–363. 2005.

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

SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v.88, p.411–417, 2004.

STASHENKO; E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, p. 235–242. 2007.

STEFFEN, A.; PAWLISZYN, J. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2187–2193. 1996.

SUPELCO; **Chromatographic Products** (catálogo); Supelco, Bellefonte, PA, 1996, p. 373.

SUR, S.V.; TULJUPA, F.M.; SUR, L.I. Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. **Journal of Chromatography**, v.542, p.451–458, 1991.

TAARIT, M.B.; MSAADA, K.; HOSNI, K.; MARZOUK, B. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. **Food Chemistry**, v. 119, p. 951–956. 2010.

TAKEUCHI, T. M.; PEREIRA, C. G.; BRAGA, M. E. M.; MARÓSTICA, M. R.; LEAL, P. F.; MEIRELES, M. A. A. **Low-Pressure Solvent Extraction (Solid–Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants**, cap. 4, p. 138-159, 2009. In Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications. Meireles, M.A.A. 2009.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987. 180 p.

TAMMELA, P.; NYGREN, M.; LAAKSO, I.; HOPIA, A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. Volatile compound analysis of ageing *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) seeds. **Flavour Fragrance Journal,** v. 18, p. 290–295. 2003.

TEMELLI, F.; SALDAÑA, M. D. A.; MOQUIN, P. H. L.; MEI SUN, M. **Supercritical Fluid Extraction of Specialty Oils**. In.: Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds, Edited by MARTÍNEZ, J.L. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 97.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v. 90, p. 333–340. 2005.

TOLOUEE, M.; SOHEIL ALINEZHAD, S.; SABERI, R.; ESLAMIFAR, A.; ZAD, S.J.; JAIMAND, K.; TAEB, J.; REZAEE, M-B.; KAWACHI, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. **International Journal of Food Microbiology,** v. 139, p. 127–133. 2010.

TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, E.; SAIJA; A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry,** V. 89, p. 549–554. 2005.

TREYBAL, R. E. **Mass Tranfer.** 3th ed. McGRAW-HILL. 1981.

ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561–1568, 2002.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

VANZANI, P.; ROSSETO, M.; MARCO, V. De; RIGO, A.; SCARPA, M. Efficiency and capacity of antioxidant rich foods in trapping peroxyl radicals: A full evaluation of radical scavenging activity. **Food Research International**, v. 44, p. 269–275. 2011.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. **Orégano.** Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas, EMPRAPA, 2006.

VIJAYA, C.; REDDY, K. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in Índia. **Food Research International**, v.3, p.385-388. 2010.

VOKOU, D.; KOKKINI, S.; BESSIERE, J. M. *Origanum onites* (Laminamiceae) in Greece. Distribution, volatile oil yield, and composition. **Economic Botany,** v. 42, p. 407-412. 1998.

VON HERTWING, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais:** plantio, colheita, secagem e comercialização. 2. ed. São Paulo: Icone, 1991. 414p.

VOYSEY, P. A.; LEGAN, J. D. CONFECTIONERY PRODUCTS – CAKES AND PASTRIES. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 474–480. 1999.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry,** v. 63, p. 335-342, 1998.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705. 1996.

WATANABE, C. H.; NOSSE, T. M.; GARCIA, C. A.; PINHEIRO, P. N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais,** v. 8, p. 76-86. 2006.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decaboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components of spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 280–283. 1995.

WINTON, A. L.; WINTON, K. B.; Structure and composition of food Sugar, sirup, honey, tea, coffee, cocoa, spices, extracts, yeast, baking powder**,** v.4. New York. John Willey & Sons. 1939 apud BERNARDES, D.M.L. **Avaliação de métodos de identificação de especiarias e vegetais desidratados submetidos a irradiação**. 1996. 103f. Tese (Doutorado em Ciências em Tecnologia Nuclear) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

WOISK, R. G.; SALATINO, A. Analisys of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apicult Res**, v. 37, p. 99-105, 1998.

WÜRTZEN, G. Short comings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants**. Food Chemistry and Toxicology**, v. 28, n.11, p.743-745. 1990.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176–186. 2001.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species - induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, p. 201-210, 1997.

ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (Zingiber officinale Roscoe) oleoresin with CO_2 and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76. 2002.

ZHANG, C.; BRUSEWITZ, G. H.; MANESS, N. O.; GASEM, K. A. M. Feasibility of using supercritical carbon dioxide for extracting oil from whole pecans. **Transactions of the ASABE**, v. 38, p. 1763-1767. 1995.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Quantitative extraction using an internally cooled solid phase microextraction device. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34–43. 1995.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170. 2001.

ZRIRA, S.; ELAMRANI, A.; BENJILALI, B. Chemical composition of the essential oil of Pistacia lentiscus L. from Morocco – A seasonal variation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 475–480. 2003.

ANEXOS

ANEXO A – PROGRAMA MATLAB

File Edit Text Go Cell Tools Debug Desktop Window Help

This file uses Cell Mode. For information, see the rapid code iteration video, the publishing video, or help.

```
%Programa para cálculo de densidade do CO2 utilizando equação de
%Peng-Robinson.
%Kátia Yuri Fausta Kawase
clear all
clc
%Entrada de dados
T=input('entre com o valor de temperatura em K--->')
P=input('entre com o valor da pressão em bar--->')
%Dados críticos T[K], P[bar]
Tc=304.1;
Pc=73.8;
%Fator Ascêntrico(w) e constante dos gases [L*bar/(K*mol)]
w=0.239;
R=8.314*10^(-2);
%Cálculo de a, b e alfa para Peng-Robinson
alpha=0.37464+1.54226*w-0.26992*w^2;
a = 0.45724*(R^2)*(Tc^2)*(1+alpha*(1-(T/Tc)^.5))^2/Pc;
b=0.07780*R*Tc/Pc;
%Utilização da forma cúbica da equação de Peng Robinson em termos de Z.
As = a*P/(R^2*T^2);
Bs = b*P/(R*T);
%Cálculo dos coeficientes da equação cúbica de Peng-Robinson
%a1*V^3+a2*V^2+a3*V+a4=0
a1=(P/(R*T))^3;
a2=(-1+Bs)*(P/(R*T))^2;
a3=(As-3*(Bs^2)-2*Bs)*(P/(R*T));
a4=-As*Bs+(Bs^2)+(Bs^3);
%Criação de vetor contendo os coeficientes do polinômio cúbico da equação
%de Peng-Robinson
V=[a1,a2,a3,a4];
%Cálculo do volume molar em L/mol utilizando o comando roots
```

PROGRAMA MATLAB (continuação)

```
Command Window
New to MATLAB? Watch this Video, see Demos, or read Getting Started.
entre com o valor de temperatura em K--->323.15

T =

  323.1500

entre com o valor da pressão em bar--->120

P =

   120


v =

   0.0572 + 0.0687i
   0.0572 - 0.0687i
   0.0829

fx >>
```