

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES
MÉTODOS DE SECAGEM, MOAGEM E EXTRAÇÃO
NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis articulata* (Lam.)
Pers.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Tischer

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE
SECAGEM, MOAGEM E EXTRAÇÃO NO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.**

Bruna Tischer

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador: Juliano Smanioto Barin

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tischer, Bruna
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM,
MOAGEM E EXTRAÇÃO NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis*
articulata (Lam.) Pers. / Bruna Tischer.-2014.
88 p.; 30cm

Orientador: Juliano Smanioto Barin
Coorientador: Roger Wagner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2014

1. Carqueja 2. Preparo de amostra (secagem, moagem,
extração) 3. Injeção de gases (extração SFME) 4. Composição
do óleo essencial e atividade antioxidante 5. Distribuição
do tamanho de partícula e microscopia do material vegetal
I. Smanioto Barin, Juliano II. Wagner, Roger III. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Bruna Tischer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: brunatischer@hotmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE
SECAGEM, MOAGEM E EXTRAÇÃO NO ÓLEO ESSENCIAL DE
Baccharis articulata (Lam.) Pers.**

elaborada por
Bruna Tischer

como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Juliano Smanioto Barin, Dr.
(Orientador, UFSM)

Edson Irineu Müller, Dr.(UFSM)

Sandro Rogério Giacomelli, Dr.(URI)

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2014.

Ao meu pai (in memoriam), o qual sempre me motivou a estudar e à minha família, em especial à minha mãe e a minha irmã, prova concreta, na minha vida, que sem amor não somos nada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria – UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela acolhida e por ter me proporcionado mais aprendizado e crescimento profissional, possibilitando assim, minha titulação e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao meu orientador Juliano S. Barin, pela paciência, dedicação, disponibilidade e orientação, pelo convívio e amizade e por ter acreditado em mim, abrindo os caminhos para concretização deste trabalho. Em todo este período de formação acadêmica, ao seu lado, tenho aprendido muito, te agradeço, em especial, por tudo.

Ao meu coorientador Roger, pela amizade, disponibilidade, e grande ajuda no trabalho.

Ao Professor Érico e todo pessoal do LAQIA (Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais) da UFSM, pela ajuda no trabalho, amizade, paciência e parceria.

Ao Professor Sandro pelo fornecimento de amostra, esclarecimento de dúvidas e ajuda nas análises.

Ao Jardim Botânico da UFSM pela disponibilização de plantas para o estudo.

A todos os colegas do NTA colegas e amigos do NTA pela amizade, ótima convivência, pelas risadas e pelo apoio, em especial à Raquel, Mari e Jossie que me ajudaram quando mais precisei e não deixaram eu me sentir sozinha em momento algum.

À Carolina Simões Cortê Real (*in memoriam*), por ter me mostrado a lado mais leve da vida, a persistência na busca dos sonhos e pela amizade e ajuda no trabalho. Você fez, faz e fará parte da minha história!

Obrigada aos alunos de Iniciação Científica que me ajudaram muito no projeto e sempre com muita dedicação e responsabilidade, Carol, Matheus e Alê!

Aos meus colegas de mestrado pela companhia nas aulas, pelos trabalhos realizados, em especial a Luana e a Dani, aos professores do PPGCTA e também a todo pessoal dos laboratórios pela disponibilidade e ajuda nas análises.

À minha mãe, por ser meu maior exemplo, minha referência, por estar sempre presente na minha vida, pelo incansável apoio e pelo amor dedicado todos os dias e a minha irmã pela amizade, carinho, e pelo apoio em todas as minhas decisões.

Muito Obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de terpenos a partir do IPP e do DMAPP	17
Figura 2 – <i>B. articulata</i> . (a), vista geral (b) vista ampliada das partes aéreas	19
Figura 3 - Etapas envolvidas na obtenção de óleos essenciais a partir de materiais vegetais.....	20
Figura 4 - Conjunto de moagem utilizado em alguns moinhos criogênicos	27
Figura 5 - Extração de óleos essenciais pelo método convencional (Hidrodestilação), usando sistema tipo Clevenger	29
Figura 6 - Equipamento para extração de OEs por SFME.....	30
Figura 7 - Fluxograma com as etapas de preparo de amostra estudadas para obtenção de OE de <i>B. articulata</i>	32
Figura 8 - Forno MO adaptado utilizado no experimento	35
Figura 9 - Equipamento utilizado para extração de OEs por SFME.....	39
Figura 10 - Distribuição do tamanho de partícula obtido por diferentes métodos de moagem	46
Figura 11 - Microscopia do material vegetal	48
Figura 12 - Cromatograma do OE obtido da planta não cominuída indicando os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação aos OEs obtidos por diferentes métodos de moagem.....	49
Figura 13 - Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados para óleo essencial de <i>B. articulata</i> submetida a diferentes métodos de moagem	52
Figura 14 - Análise de PCA para diferentes métodos de moagem	53
Figura 15 - Avaliação do tempo de secagem por diferentes métodos. Linha Tracejada: representa o limite máximo de umidade recomendado pela Legislação Brasileira, 12%	55
Figura 16 - Cromatograma do OE obtido da planta IN indicando os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação aos OEs obtidos por diferentes métodos de secagem.....	57
Figura 17 - Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados para óleo essencial de <i>B. articulata</i> submetida a diferentes métodos de secagem	60
Figura 18 - Porções selecionadas dos cromatogramas obtidos por GC-FID dos OEs de plantas secas por diferentes métodos para visualização de alterações na concentração dos compostos	61
Figura 19 - Análise de PCA para diferentes métodos de secagem	62
Figura 20 - Capacidade redutora de ferro (FRAP) para óleo essencial de <i>B. articulata</i> submetida a diferentes métodos de secagem.....	64
Figura 21 - Rendimento do OE em função do tempo de extração	66

Figura 22 - Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados para óleo essencial de <i>B. articulata</i> extraída por SFME e por HD	69
Figura 23 - Cromatograma do OE obtido indicando os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação aos OEs obtidos em diferentes atmosferas na extração	70
Figura 24 - Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados para óleo essencial de <i>B. articulata</i> extraída por SFME submetida a injeção de diferentes gases	72
Figura 25 - Compostos que podem ser formados a partir de α -pineno durante a transformação ou degradação.....	73
Figura 26 - Capacidade redutora de ferro (FRAP) para óleo essencial de <i>B. articulata</i> submetido à injeção de diferentes gases durante a extração por micro-ondas	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos principais métodos de secagem de materiais vegetais	22
Tabela 2 -	Classificação de moinhos utilizados para cominuição de materiais vegetais	25
Tabela 3 -	Condições experimentais usadas nos diferentes métodos de moagem	36
Tabela 4 -	Condições de secagem de <i>B. articulata</i> , para quatro métodos de moagem	36
Tabela 5 -	Caracterização de material vegetal após a moagem por diferentes métodos (n=3).....	45
Tabela 6 -	Composição química do OEs (%) de <i>B. articulata</i> obtidos por diferentes métodos de moagem.....	51
Tabela 7 -	Caracterização do material vegetal após a secagem por diferentes métodos	56
Tabela 8 -	Composição química do óleo essencial (%) de <i>B. articulata</i> submetida a cinco métodos de secagem diferentes	59
Tabela 9 -	Atividade antioxidante dos OEs obtidos de plantas secas por diferentes métodos, expressa em concentração eficiente (EC50) e Índice de Atividade Antioxidante (IAA)	64
Tabela 10 -	Composição química do óleo essencial (%) de <i>B. articulata</i> submetida à extração com aquecimento convencional e com micro-ondas	67
Tabela 11 -	Composição química do óleo essencial (%) de <i>B. articulata</i> submetida à injeção de gases durante a extração por micro-ondas	71
Tabela 12 -	Atividade antioxidante expressa em concentração eficiente (EC50) e Índice de Atividade antioxidante.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AMB	– Ambiente
Ar	– Argônio
ARSINT	– Ar sintético
BHT	– Butilhidroxitolueno
Co	– Colênquima
DMAPP	– Dimetilalildifosfato
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, do inglês <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> .
ep	– Epiderme
EST	– Estufa
FPP	– Farnesildifosfato
FRAP	– Capacidade redutora de Ferro do inglês <i>ferric reducing assay power</i>
GC-FID	– Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama do inglês <i>gas chromatography-flame ionization detector</i>
GC-MS	– Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa do inglês <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
GGPP	– Geranildifosfato
gt	– Tricomas glandulares
HD	– Hidrodestilação
IAA	– Índice de Atividade Antioxidante
IK	– Índice de Kovats
IN/FRESCO	– Sem secagem, <i>in natura</i>
IPP	– Isopentenil difosfato
LIO	– Liofilização
MB	– Moinho de Bolas
MCRIOG	– Moinho criogênico
MFCR	– Moinho de facas com refrigeração
MFSR	– Moinho de facas sem refrigeração
MHD	– Hidrodestilação assistida por micro-ondas do inglês <i>microwave hydrodistillation</i>
MO	– Micro-ondas
O ₂	– Oxigênio
OEs	– Óleos Essenciais
sd	– Dutos secretores
SFME	– Extração assistida por micro-ondas sem solvente, do inglês <i>solvent-free microwave extraction</i>
SM	– Sem moer/picada manualmente

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM, MOAGEM E EXTRAÇÃO NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

AUTORA: BRUNA TISCHER

ORIENTADOR: JULIANO SMANIOTO BARIN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de fevereiro de 2014.

Óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de materiais vegetais, que possuem propriedades bactericidas, antioxidantes e antifúngicas. Contudo, a composição dos OEs pode ser alterada nas etapas de preparo de amostra, podendo modificar a sua atividade biológica. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes métodos de preparo da amostra - moagem, secagem e atmosfera e método de extração, no volume e composição do óleo essencial presente nas partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., popularmente conhecida como carqueja. Na avaliação do efeito da moagem foram utilizados moinho criogênico, de facas (com e sem refrigeração) e de bolas. Para avaliação da secagem foram utilizados quatro métodos: temperatura ambiente, estufa, liofilização e micro-ondas. Para extração foram avaliadas a hidrodestilação convencional (HD) e a extração assistida por micro-ondas sem solvente (SFME). Os resultados mostraram que o OE da planta moída em facas forneceu o perfil similar ao OE da planta não moída, enquanto que a moagem criogênica resultou em menor quantidade de OE devido ao menor tamanho de partícula obtido que levou a ruptura de tricomas glandulares que armazenam OEs. A secagem por micro-ondas proporcionou ao OE um perfil similar àquele obtido da planta *in natura*, a liofilização forneceu os menores rendimentos de OE. O tempo de extração de apenas 45 min com SFME forneceu rendimento comparável aquele obtido após 4 h por HD. A injeção de O₂ durante a extração de OE pelo aquecimento com micro-ondas apresentou um OE com maiores quantidades de compostos oxigenados, uma maior atividade antioxidante em relação as extrações com injeção de argônio e ar sintético. Este estudo mostra que diferentes métodos de preparo de amostra podem impactar a qualidade de OEs.

Palavras-chave: Preparo de amostra. Secagem. Moagem. Extração. Óleos essenciais.

ABSTRACT

Master of Science Dissertation
Postgraduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

EVALUATION OF DIFFERENT DRYING, GRINDING AND EXTRACTION METHODS ON THE ESSENTIAL OIL OF *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

AUTHOR: BRUNA TISCHER

ADVISER: JULIANO SMANIOTO BARIN

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 20, 2014.

Essential oils (EOs) are aromatic oily liquids obtained from vegetable materials, which present bactericidal, antioxidant and antifungal properties. Nevertheless, the composition of the EOs can be modified during sample preparation steps, changing their quality and biological activity. The aim of this study was the evaluation of different sample preparation methods – grinding, drying and atmosphere and extraction methods on the volume and composition of essential oil from *Baccharis articulata* (Lam) Pers., called as carqueja. For evaluation of grinding effect cryogenic, knives (with and without cooling) and balls mills were used. For drying four methods based on room drying, oven, freeze and microwave drying were used. For extraction the conventional hydrodistillation (HD) and solvent-free microwave extraction (SFME) were evaluated. The results showed that EO from milled plant with knives provided an EO with a profile similar to the EO from ungrounded plant, while the cryogenic mill resulted in smaller amount of EO due to the smaller particle size obtained leading to the glandular trichomes rupture and losses of EOs. Microwave drying resulted in an EO profile similar with that from fresh plant, the freeze drying provided smaller yield. The extraction time of 45 min with SFME provides yields comparable to those obtained after 4.5h by HD. The injection of O₂ during extraction of the EO by microwave heating showed an EO with higher amounts of oxygenated compounds, higher antioxidant activity in comparison to extraction with injection of argon and synthetic air. This study showed that different sample preparation methods could impact the quality of EO.

Keywords: Sample preparation. Drying. Grinding. Extraction. Essential oil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Óleos Essenciais (OEs).....	16
2.2 <i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.....	18
2.3 Etapas envolvidas na obtenção de OEs.....	20
2.3.1 Secagem	21
2.3.2 Moagem.....	24
2.3.3 Extração de óleos essenciais	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Coleta	33
3.1.1 Reagentes	33
3.1.2 Instrumentação	34
3.2 Métodos de moagem	35
3.3 Métodos de secagem	37
3.4 Métodos de extração	37
3.5 Análises no material vegetal e no OE.....	39
3.5.1 Distribuição do tamanho de Partícula	39
3.5.2 Microscopia e avaliação do rompimento do material vegetal.....	40
3.5.3 Cromatografia Gasosa	40
3.5.4 Avaliação da Atividade Antioxidante (Remoção do radical livre – DPPH).....	41
3.5.5 Avaliação da Capacidade redutora de ferro (FRAP).....	42
3.6 Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Influência da moagem no OE de <i>B. articulata</i>	44
4.1.1 Caracterização do material vegetal após a moagem.....	44
4.1.2 Composição do óleo essencial.....	49
4.2 Influência da secagem no OE de <i>B. articulata</i>	54
4.2.1 Caracterização do material vegetal	54
4.2.2 Composição do óleo essencial.....	56
4.2.3 Atividade antioxidante	63
4.3 Influência do método de extração no OE de <i>B.articulata</i>	65

4.3.1	Rendimento e tempo de extração do óleo essencial	65
4.3.2	Composição do óleo essencial.....	66
4	Influência da Atmosfera na Extração do OE por SFME de <i>B. articulata</i>	70
4.4.1	Rendimento de óleo essencial e composição do óleo essencial	70
4.4.2	Atividade antioxidante	73
5.	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos aromáticos obtidos a partir de materiais vegetais, como flores, folhas, sementes, galhos, cascas, frutos e raízes (BURT, 2004). Estima-se que cerca de 3.000 OEs são conhecidos atualmente, dos quais em torno de 300 são comercialmente importantes, principalmente para o mercado de aromas e fragrâncias (BAKKALI et al, 2008). Os OEs são considerados os agentes antimicrobianos naturais mais importantes presentes nas plantas (NYCHAS, 1995; MOUREY e CANILLAC, 2002; BAJPAI et al, 2008), porém, tem sido relatadas também propriedades antitoxigênicas (JUGLAL et al, 2002), antiparasitárias (PESSOA et al, 2002), antioxidantes (SAFAEI-GHOMI et al, 2008) e antifúngicas (DEBA et al, 2007) dos mesmos.

Os métodos convencionalmente empregados para extração de OEs de diversas matrizes vegetais envolvem a utilização de solventes orgânicos, destilação por arraste a vapor e a hidrodestilação (HD). Contudo, esses métodos geralmente envolvem altas temperaturas e longos tempos de extração, o que pode ocasionar alterações químicas, tais como a destruição de compostos termossensíveis, assim como a perda de qualidade do óleo essencial (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGUI, 2007). Dessa forma, métodos alternativos de extração têm sido desenvolvidos para melhorar a qualidade dos OEs obtidos, como por exemplo, a hidrodestilação assistida por micro-ondas (MHD – do inglês *microwave hydrodistillation*) e a extração por micro-ondas sem solvente (SFME, do inglês *solvent-free microwave extraction*), que emprega solvente apenas para umedecer o material vegetal. A extração de OEs assistida por micro-ondas (MO), tais como a MHD e a SFME, são alternativas frente aos métodos de extração de convencionais que permitem transferência de energia mais eficiente e redução do tamanho do equipamento, o que leva a uma resposta rápida ao processo de aquecimento e conseqüente menor tempo para obtenção de OEs (GARCIA e CASTRO, 2003).

Na literatura há relatos sobre diferenças na composição do óleo essencial entre a SFME e HD (LI et al, 2012; LUCCHESI et al, 2004), como observado para compostos oxigenados que são encontrados em maior proporção na SFME (OKOH et al, 2010). Cabe ressaltar que esses compostos, geralmente, conferem maiores atividades antibacteriana, antioxidante e antifúngica aos OEs (DEBA et al, 2008; SANDRI et al, 2007; SOKMEN et al, 2003), tornando esse método adequado à extração de compostos com atividade biológica. Porém, há pouca

informação disponível na literatura que possa evidenciar as causas das diferenças obtidas entre os OEs extraídos com MO e pelos métodos convencionais. Assim, outros fatores além da diferença na forma de aquecimento (p. ex., convecção, condução, radiação, irradiação), tais como temperatura, tempo de extração, uso de solvente, quantidade e umidade da amostra e a composição da atmosfera, podem influenciar também no processo de transformação dos OEs.

Entretanto, outras etapas relacionadas ao processamento de plantas além da extração, tais como a secagem e a moagem do material vegetal, podem influenciar também o rendimento de óleo extraído e a composição química do mesmo. Fatores como temperatura, tempo de processamento e pressão controladas na secagem podem influenciar qualitativamente e quantitativamente na composição do óleo, assim como o tipo de moinho, tamanho da partícula, temperatura na moagem e tempo de moagem (MARKET, 1995; SINGH e GOSWAMI, 1999; MURTHY e BHATTACHARYA, 2008).

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes métodos de preparo da amostra - moagem, secagem e extração, no volume e composição óleo essencial de *B.articulata*. O gênero *Baccharis*, popularmente conhecido como carqueja é composto por várias espécies, dentre elas: *Baccharis trimera*, *Baccharis cylindrica*, *Baccharis myriocephala* e a *B.articulata*, sendo a última espécie a que foi utilizada neste estudo. O óleo essencial dessa planta pode apresentar diversas atividades farmacológicas (GENE et al, 1996), tais como antibacteriana e antioxidante (AVANCINI et al, 2000; OLIVEIRA et al, 2004). Para a avaliação do efeito da moagem nos OEs de *B.articulata* foram utilizados três tipos de moinho: moinho de facas (com e sem refrigeração), moinho de bolas e moinho criogênico. Nesse estudo, foi analisado o tamanho de partícula e foi feita uma análise morfológica do material vegetal para verificar o rompimento das estruturas da planta ocasionadas durante a moagem. Além disso, foi efetuada uma avaliação do rendimento e análise quantitativa e qualitativa dos OEs por cromatografia gasosa. Para avaliação do efeito da secagem foram utilizados quatro métodos de secagem: temperatura ambiente, estufa, liofilização e micro-ondas. Foram verificados os rendimentos da extração de OEs e foi feita análise quantitativa e qualitativa dos mesmos por cromatografia gasosa, assim como análise da atividade antioxidante. Na avaliação dos métodos de extração, foi empregada a HD e a SFME. Foram comparados os tempos de extração, rendimento de óleo e foi realizada a análise quantitativa e qualitativa do OE por cromatografia gasosa. Após injeção de gases (argônio, ar sintético e oxigênio) durante a SFME os OEs obtidos foram analisados qualitativamente e quantitativamente por cromatografia gasosa e a análise da atividade antioxidante dos OEs foi realizada para verificar eventuais alterações da atividade biológica oriundas da modificação dos compostos durante o processo de extração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Óleos Essenciais (OEs)

A maioria dos princípios ativos extraídos de plantas provém do metabolismo vegetal secundário, como por exemplo, os óleos essenciais. A glicose formada no metabolismo primário é a precursora dos metabólitos secundários, levando à formação de Acetil-Coenzima A (acetil-COA) e posterior formação do ácido mevalônico. A produção dos compostos secundários pode ocorrer por meio de duas vias principais, a formação de derivados de terpenóides pela via do ácido mevalônico-acetato e a formação de compostos fenólicos pela via do ácido chiquímico. Para a produção de terpenóides, o ácido mevalônico (mevalonato), que é o precursor primário de todos os terpenóides e esteroides biossintetizados pelas plantas, é fosforilado, desidratado e descarboxilado para formar o isopentenildifosfato (IPP), que é a unidade isoprênica biogênica de todos os terpenoides. Através da atividade da enzima isopentenildifosfatoisomerase, o IPP é isomerizado para formar o dimetilalildifosfato (DMAPP). O DMAPP é o precursor de unidades isopreno encontradas em um grande número de compostos vegetais. Inicialmente, o IPP e o DMAPP reagem e forma o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode se ligar a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, o farnesildifosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranildifosfato (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente (DEWICK, 2009), conforme mostrado na Figura 1.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste a vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado) (BRASIL, 2007). Os OEs são concentrados aromáticos e líquidos oleosos obtidos a partir de uma variedade de materiais de plantas e especiarias, os mesmos são divididos em dois grandes grupos, os hidrocarbonetos que consistem, basicamente, de terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos) e os

compostos oxigenados, como por exemplo, ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, ácidos entre outros (KAUFMAN et al, 2002).

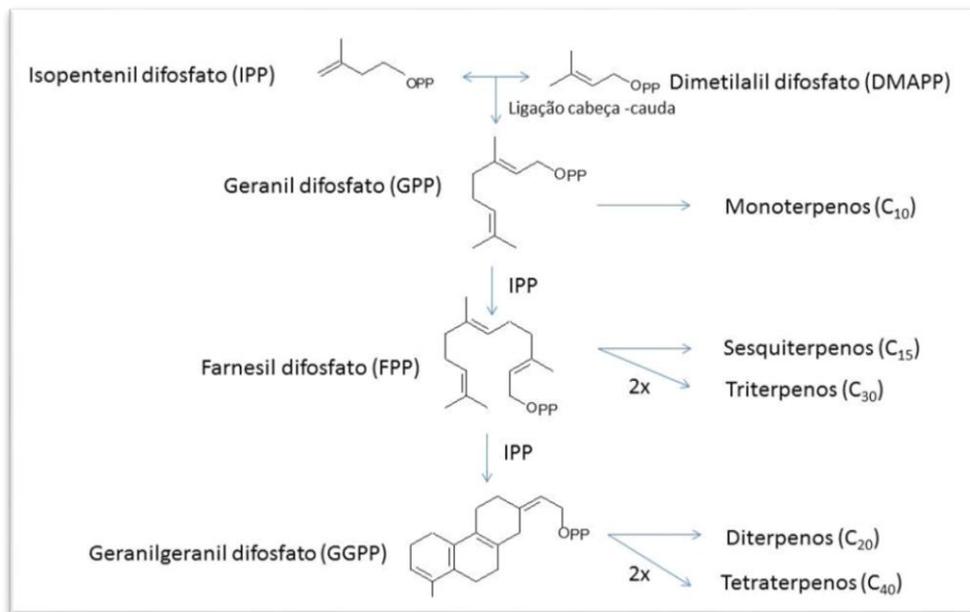


Figura 1: Síntese de terpenos a partir do IPP e do DMAPP.
Fonte: Dewick (2009).

Desde a Idade Média os OEs têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular devido a suas propriedades bactericidas, antifúngicas, medicinais e aromáticas, sendo empregados na preservação de alimentos e como antimicrobianos naturais, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e anestésicos locais (BAKKALI et al, 2008). Segundo Silva e Casali (2000), os óleos essenciais são normalmente elaborados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular. A biossíntese de OEs ocorre normalmente em estruturas chamadas tricomas glandulares que estão distribuídos em quantidades diferentes por toda a planta, mas ocorrem principalmente nas folhas e cálices (LEVIN, 1973). Apesar de todos os órgãos de uma planta poder acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a sua localização, época da coleta, condições climáticas e de solo (SIMÕES et al, 2000).

O uso de óleos essenciais em produtos alimentícios pode melhorar a qualidade do produto, realçar as características sensoriais, prevenir a deterioração por micro-organismos e por oxidação do mesmo. Os antioxidantes naturais protegem a fração lipídica da oxidação

através do bloqueio de radicais livres, seguida da conversão dos mesmos em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons (ARAUJO, 1999). Porém, o processamento da amostra pode provocar a degradação dos antioxidantes da amostra *fresca*. Por exemplo, o tratamento térmico pode ser responsável por perdas de antioxidantes naturais (MOURE et al, 2001). Entretanto Halliwell et al (1998), Wijewick e Kitts (1998) que estudaram atividades antioxidantes de diversos alimentos submetidos ao processamento afirmam que o mesmo pode melhorar o conteúdos destes compostos ativos, devido a formação de combinações novas e que têm propriedades antioxidantes, de forma que a atividade antioxidante permaneça igual ou maior que a do produto *fresco*.

Estudos demonstram que aproximadamente 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e que 35% apresentam propriedades antibacterianas (LIMA et al, 2006). Na indústria alimentícia, os OEs podem atuar como antioxidantes e antibacterianos, além de em alguns casos reproduzir o sabor e odor da planta utilizada (BUSATTA, 2006). Estudos tem demonstrado resultados satisfatórios na aplicação de óleos essenciais de diversas plantas no controle de *Salmonella* em alimentos (BAJPAI et al, 2012) e na preservação das propriedades químicas e sensoriais de queijo adicionado de óleo essencial de orégano (OLMEDO et al, 2013). Além disso, os OEs tem mostrado atividade antimicrobiana em produtos cárneos (JAYASENAA et al, 2013). Govariset al. (2010) avaliaram o efeito antibacteriano de OEs de orégano sobre a carne de ovelha picada, onde adições de 0,9% de OEs na formulação permitiram a inibição de *Salmonella enteritidis*. Resultados semelhantes também foram observados para bacalhau (TASSOU et al, 1999). A adição de 0,6% de OEs de tomilho em carne bovina picada apresentou a inibição de *E.coli*O157:H7 (SOLOMAKOS et al, 2008). Desta forma, pode-se perceber que a utilização de OEs na indústria alimentícia é uma tendência e que a avaliação dos processos envolvidos na sua obtenção (p. ex., moagem, secagem, extração) podem ser fundamentais para assegurar (ou maximizar) a atividade desejada dos mesmos.

2.2 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

O gênero *Baccharis* (família Asteraceae) está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões de maior altitude. A espécie *B. articulata* (Figura 2), é nativa em uma região

compreendida pelo Uruguai, norte da Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil (VERDI et al, 2005).

É conhecida popularmente como carqueja, carqueja amarga e vassourinha (DEGÁSPARI et al, 2002). Essa planta se caracteriza como um arbusto pequeno, por caules intensamente ramificados e bialados, com ramos sem folhas, alas interrompidas alternadamente, de forma desigual, estreita ou larga, planas e levemente onduladas, verdes, às vezes brilhantes, membranosas a levemente coriáceas (CEZAROTTO, 2009).



Figura2: *B. articulata*. (a), vista geral (b) vista ampliada das partes aéreas.

Fonte: Cezarotto, V. S. (2009).

B. articulata é utilizada na medicina popular principalmente como tônico estomáquico, anti-diarréico e anti-reumático. Sua função principal é regular o funcionamento do fígado e intestinos. Além disso, é usada como antisséptica, secante de úlceras e como vermífugo (KORBES, 1995; ALONSO, 1998, DEGÁSPARI et al, 2001). Além dos fins medicinais, há a aplicação dessa planta na fabricação de cerveja como substituintes do lúpulo, devido ao seu amargor característico (BARROSO, 1976; CEZAROTTO, 2009). Nos estudos de atividades biológicas destacam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e anti-inflamatórios (VERDI et al, 2005).

Na estrutura de *B. articulata*, podem ser encontradas unidades secretoras de OEs, como dutos secretores e tricomas glandulares. Os tricomas glandulares em *B. articulata*

consistem de células cobertas por uma cutícula espessa com citoplasma denso. Os dutos secretores apresentam epitélio uni-seriado, contendo de 4 a 10 células que apresentam citoplasma denso e armazenam produtos lipofílicos, tais como os OEs. Contudo, a maior parte dos OEs fica armazenada nos tricomas glandulares (BUDEL et al, 2013).

2.3 Etapas envolvidas na obtenção de OEs

Segundo Simões (2005), as ações de transformação da matéria prima vegetal consistem nas etapas de *coleta, seleção, limpeza, secagem, moagem e extração*. As etapas de coleta, seleção e limpeza fazem parte, normalmente, do processo de amostragem do material vegetal. Já a secagem do material é efetuada com o objetivo de reduzir a umidade para evitar a deterioração e permitir o armazenamento por maior período de tempo. Na etapa de cominuição, o tamanho de partícula é reduzido para melhorar a homogeneidade do material e facilitar o manuseio, armazenagem e extração dos OEs. Finalmente, é efetuada a etapa de extração, que pode ser realizada por diferentes métodos. A figura 3 apresenta um esquema das principais etapas envolvidas na obtenção de OEs.

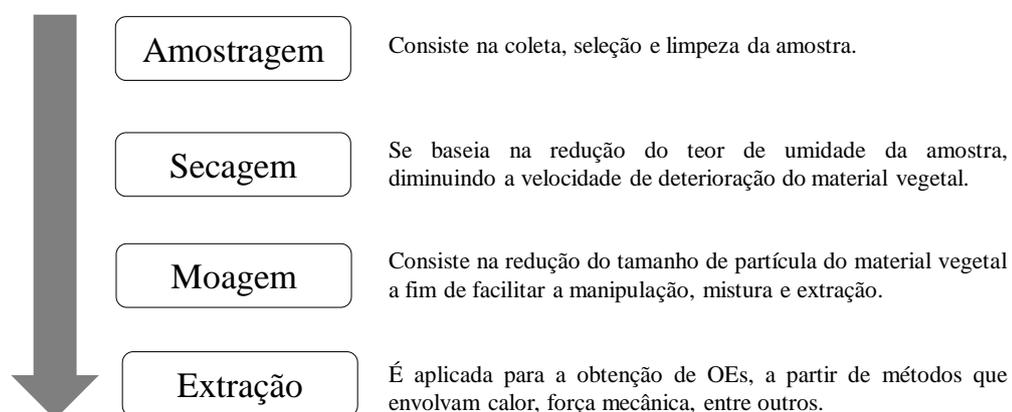


Figura 3: Etapas envolvidas na obtenção de óleos essenciais a partir de materiais vegetais.

Antes e após a coleta do material vegetal, várias alterações químicas, físicas e microbiológicas da planta acontecem, podendo levar a sua degradação em poucos dias. O grau

de umidade das folhas, a umidade relativa do ar, a temperatura e época do ano são exemplos de alguns fatores que podem afetar tanto a quantidade quanto a composição dos OEs anteriormente à coleta do material vegetal. Segundo Cezarotto (2009), o rendimento de OEs de *B. articulata* varia significativamente em diferentes épocas do ano, sendo que os maiores rendimentos são observados no inverno, com cerca de $0,43 \pm 0,05\%$ e os menores no verão, com aproximadamente $0,22 \pm 0,01\%$. Apesar da importância da avaliação das condições de cultivo da planta, após a coleta, transformações têm sido observadas nos OEs, sendo dependentes das condições de secagem e armazenamento (BAHLOUL, BOUDHRIOUA e KECHAOU, 2008). Assim, nessa seção serão abordados somente os fatores associados ao período que segue após a coleta do material vegetal (p. ex. secagem e moagem) até o processo de extração.

2.3.1 Secagem

O elevado teor de água presente nas células e tecidos das plantas, em torno de 60% a 80%, faz com que a secagem tenha importância fundamental para evitar transformações dos compostos originalmente presentes no material vegetal, causadas por processos químicos, bioquímicos e/ou microbiológicos. Desta forma, a secagem de plantas deve ser realizada após a coleta do material vegetal para preservar as características de cor, aroma e sabor, devendo ser iniciada o mais rápido possível (BRASIL, 2006). A secagem da amostra diminui a velocidade de deterioração do material, por meio da redução do teor de água, atuando regressivamente na ação das enzimas e possibilitando a conservação das plantas por maior tempo. Este processo deve ser realizado até que a planta atinja umidade entre 8% e 12%, conforme a espécie e a parte da planta utilizada (SILVA e CASALI, 2000). Com este teor de umidade, a maior parte das plantas pode ser armazenada sem que ocorra a deterioração e o desenvolvimento de micro-organismos como fungos, bactérias e leveduras, conforme recomendado na legislação brasileira sobre plantas medicinais, aromáticas e condimentares (BRASIL, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2005).

Os OEs presentes nas plantas medicinais são os componentes mais sensíveis ao processo de secagem, devido a sua elevada pressão de vapor e conseqüente possibilidade de perda por volatilização. As variações nas concentrações dos seus constituintes, durante a secagem, dependem de vários fatores como o método de secagem escolhido, temperatura

empregada, características fisiológicas da planta, além da quantidade e composição dos OEs presentes nas plantas (VENSKUTONIS, 1997). Na Tabela 1 estão apresentados alguns métodos de secagem com suas respectivas características.

Tabela 1- Características dos principais métodos de secagem de materiais vegetais

Método	Características	Vantagens	Desvantagens
Ambiente	processo lento conduzido na sombra e em local ventilado	baixo custo	variável com o clima; menos eficaz; lento
Liofilização	congelamento e subsequente sublimação da água	conservação das propriedades bioquímicas	procedimento lento e dispendioso
Estufa	transferência de calor por condução/convecção; dependente das condições de temperatura, umidade e corrente de ar	simples, utilizada em laboratórios	alteração da composição química; possíveis perdas de substâncias voláteis
Micro-ondas	geração de calor no interior do material vegetal	tempo reduzido, eliminação de micro-organismos e preservação da cor	possíveis perdas de substâncias voláteis

Fonte: Pastorini et al, (2002).

A secagem em temperatura ambiente é um processo de baixo custo, sendo necessário apenas o uso de bandejas para a desidratação e uma área adequada para o processo, normalmente à sombra. Entretanto, o desempenho desse processo sofre variações de acordo com o clima, apresentando condições de secagem que podem variar de um dia para outro. Os alimentos e plantas submetidos à secagem ambiente geralmente possuem coloração mais intensa que os submetidos à secagem por calor, além de apresentarem, geralmente, menores perdas de OEs (CELESTINO, 2010). Sellami et al (2011) observaram que a secagem de louro (*Laurus nobilis L.*) em temperatura ambiente proporcionou os maiores rendimentos de óleo essencial em relação a secagem em estufa e preservou os hidrocarbonetos monoterpênicos da amostra *fresca*. Um estudo de avaliação de OE de manjeriço (*Ocimum basilicum*) mostrou que a secagem em temperatura ambiente apresenta maiores rendimentos que a secagem em estufa e por liofilização, mantendo uma maior proporção de monoterpênicos. Contudo, no estudo de Pirbalouti et al (2013) a secagem em temperatura ambiente de *Satureja bachtiarica*

(planta da família da menta) proporcionou perdas de compostos oxigenados (monoterpenos e sesquiterpenos) com menores rendimentos de OEs que a secagem em estufa.

O processo de secagem por liofilização é um processo que consiste de três etapas, onde na primeira etapa ocorre o congelamento do produto, de modo que a água presente no material seja convertida em gelo. Após, o gelo formado durante o congelamento é removido do material pela conversão direta do estado sólido para vapor através da sublimação, conduzida em pressão reduzida. Na terceira etapa, a água que ainda permanece ligada fortemente aos solutos, denominada água adsorvida, é convertida em vapor e removida do produto por dessorção (JALES, 1999). Geralmente, a secagem por liofilização é a que menos agride o material vegetal, pois ocorre a conservação das propriedades bioquímicas do material vegetal. Entretanto, esse método é muito oneroso, pois a remoção de água é lenta, tornando o procedimento moroso (LIAPIS, 1987). Os resultados na literatura são contraditórios com relação às alterações causadas pelo processo de secagem por liofilização. Segundo Cabezudo (2003), a secagem de diversos materiais vegetais por liofilização promove a redução de compostos oxigenados e a alteração sensorial significativa em relação a amostras *frescas*. Boset al (2002) verificaram perdas significativas de compostos voláteis da planta *fresca*, principalmente de hidrocarbonetos monoterpênicos de *Antriscussylstris* (L.) quando secas por liofilização. Já Rahimmaleka e Goli observaram os maiores rendimentos de óleo essencial de tomilho (*Thymys daenensissubsp. daenensis.*) submetido à liofilização e as menores perdas de hidrocarbonetos monoterpênicos.

A secagem em estufa é um dos métodos mais comumente empregados para a redução da umidade de plantas, onde o calor é transferido para o material por condução/convecção. As condições de secagem podem ser controladas pela temperatura e umidade do ar aquecido (PAN, 1997). Contudo, esse processo pode levar a alteração dos compostos voláteis e perdas de OEs. Segundo Martins (2000), a secagem de capim limão (*Cymbopogon citratus*) em estufa a 45 °C proporcionou menores rendimentos de OE e modificações dos componentes majoritários em relação à planta fresca. Radunzet al (2002) observaram que a secagem em estufa à 60 °C de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) proporcionou algumas modificações na composição do óleo essencial, principalmente o incremento de cariofileno na amostra submetida a secagem, observando aumento de hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Rahimmalek e Goli (2013) observaram perdas significativas de hidrocarbonetos monoterpênicos no OE de tomilho (*Thymys daenensis*) submetido à secagem em estufa em relação à planta *fresca*.

Segundo Mujumdar e Menon (1995), há muitas vantagens no uso da energia micro-ondas para secagem de alimentos, como o aquecimento uniforme do material, eficiência na

conversão de energia, aumento na qualidade do produto final, menor tempo e espaço para secagem, controle do processo, entre outras. Segundo Pirbalouti et al (2013), o manjeriço (*Ocimum L.*) quando submetido à secagem em micro-ondas (60 °C), apresentou maiores perdas dos compostos oxigenados majoritários, como o estragol e linalol. O mesmo foi observado no óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), onde a secagem em micro-ondas proporcionou perdas dos compostos oxigenados como 1,8 cineol, óxido de cariofileno e α -terpineol, porém, um perfil similar de cor e aparência em relação à planta fresca foi observado. Sellami et al. (2010) não observaram diferenças significativas entre a composição do OE submetido à secagem com micro-ondas em comparação com a planta *fresca*, inclusive para compostos oxigenados. Com a utilização de MO e através da geração do calor interno, a transferência de massa ocorre devido à diferença de pressão estabelecida e como consequência ocorre rápida geração de vapor no interior do material. A maior parte da umidade é evaporada rapidamente, forçando o líquido para a superfície na forma de vapor, ocorrendo assim, uma secagem rápida sem que seja necessário superaquecimento da atmosfera, diminuindo o risco de superaquecimento do material (SOURAKI, 2009). Além disso, há uma taxa considerável de eliminação de micro-organismos e geralmente há a preservação da cor do material vegetal, porém, devido à alta interação de MO com alguns compostos, pode haver perda de algumas substâncias voláteis.

2.3.2 Moagem

O processo de moagem consiste, basicamente, na redução do tamanho da partícula através da aplicação de uma força mecânica com o objetivo de facilitar a manipulação, transporte, embalagem, armazenamento, mistura e extração dos compostos bioativos (BRANDÃO, 2007). Para a redução do tamanho aplica-se uma força sobre o material, que pode ser feita por martelos, bolas, facas, barras metálicas, entre outros, dentro de um compartimento fechado. Os moinhos podem ser classificados de acordo com o tipo de material utilizado para promover a moagem, conforme mostrado na Tabela 2. Entre os mecanismos utilizados nesses moinhos podem ser citados pressão, impacto, abrasão e corte ou combinação de vários mecanismos sobre o material vegetal. Os fatores que podem influenciar na moagem são o tipo de moinho, tempo de processo, tipo da amostra e granulometria do material (HAYES, 1999).

De acordo com Markert (1995), a cominuição de materiais da amostra é um dos passos mais importantes no processo global analítico. Se adequada, melhora a homogeneidade do analito, e impede a segregação do material como um resultado de uma ampla distribuição de tamanho de partícula no interior da amostra. Materiais vegetais não são homogêneos e a variação na concentração dos analitos nas folhas pode prejudicar a microanálise quantitativa.

Assim, para a moagem de materiais vegetais, torna-se importante conhecer a aplicação de cada tipo de moinho e o tamanho de partícula que pode ser obtido para assegurar a seleção correta do método de moagem. Para obtenção de materiais com menores tamanhos de partícula geralmente é utilizado o moinho criogênico, sendo recomendado também para moagem de materiais sensíveis ao calor devido às baixas temperaturas empregadas. Para obtenção de materiais com maiores tamanhos de partícula pode-se utilizar o moinho de bolas que pode ser aplicado para diversos tipos de materiais, porém, o processo de cominuição é mais lento e envolve o aquecimento da amostra, o que pode levar à perda de compostos voláteis. Já o moinho de facas permite efetuar a moagem de maneira mais rápida que o moinho de bolas, porém também irá proporcionar a elevação de temperatura do material vegetal. Contudo, um processo de resfriamento da cavidade de moagem pode ser utilizado para minimizar o impacto do calor sobre o material vegetal.

Tabela 2 -Classificação de moinhos utilizados para cominuição de materiais vegetais.

Tipo de moinho	Mecanismo	Granulometria (μm)	Uso (material)
facas	corde	20 a 80	fibroso
bolas	fricção	4 a 325	quase todos
rolos	pressão	20 a 200	moles
atrído	atrído	20 a 200	moles e fibrosos
criogênico	impacto	1 a 100	sensíveis ao calor

Fonte: Brandão (2007).

No moinho de facas a redução do tamanho de partícula é obtida pelo corte do material usando facas montadas em um ou dois eixos, sendo frequentemente empregados para moagem de materiais dúcteis (RON E PENEV, 1995).No moinho de bolas a moagem ocorre por fricção, podendo usar bolas lisas ou dentadas. O tamanho de partícula é definido pelo

tamanho e tipo da bola utilizada, além do ajuste da velocidade e do tempo de moagem (HAYES, 1993).

A moagem criogênica envolve o congelamento do material vegetal a temperaturas muito baixas, podendo-se utilizar nitrogênio ou argônio líquido. Nesse processo, a fragilidade do material é aumentada com o congelamento, levando a uma maior eficiência de moagem (RON e PENEV, 1995). Dessa forma, o material se torna quebradiço, sendo necessária uma menor energia para sua cominuição (IYENGAR e KASPEREK, 1977). Esta técnica é utilizada para muitas aplicações na área de alimentos, como por exemplo, para homogeneizar fígado bovino (ZEISLER et al, 1983) e amostras de peixes (MAY e KAISER, 1984), as quais apresentam menores tamanhos de partícula quando processadas nesse tipo de moinho. Devido à redução do tamanho de partícula, uma melhor homogeneidade dos materiais pode ser obtida. Mierzwa et al. e Gouveia et al.(2002), observaram que a moagem criogênica de folhas de chás e cereais matinais permitiu uma menor variação nos resultados obtidos para determinação de metais nessas amostras.

A figura 4 mostra o conjunto de moagem utilizado em alguns sistemas de moagem criogênica. O mesmo é constituído de um tubo de policarbonato, uma barra magnética e duas tampas de aço inoxidável. A amostra é introduzida junto com a barra magnética no tubo de policarbonato, o qual é vedado nas extremidades com tampas de aço. O conjunto de moagem é imerso em nitrogênio ou argônio líquido durante todo o programa de moagem. Após o período de pré-congelamento selecionado, um campo magnético alternado é aplicado fazendo com que a barra magnética atinja as tampas do tubo em alta velocidade. A cominuição é promovida pelo impacto da barra magnética com as amostras e com as tampas do conjunto de moagem (JUNIOR, 2003).

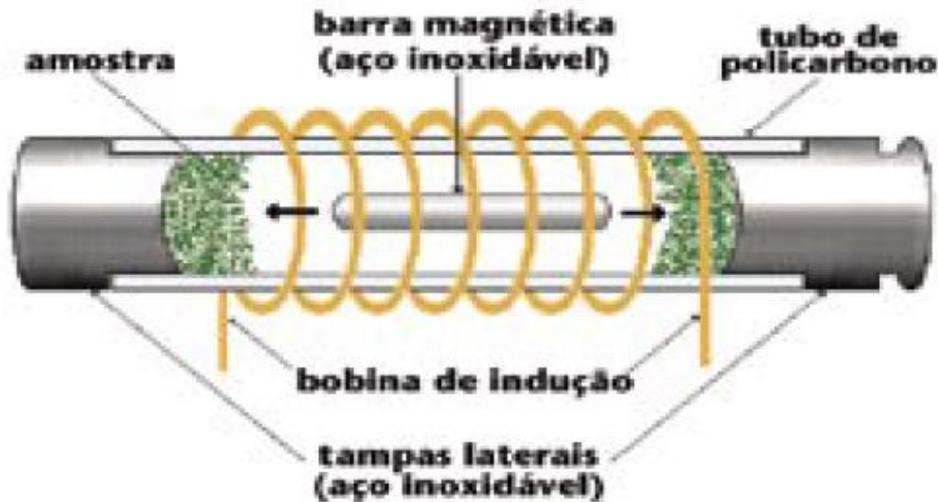


Figura4: Conjunto de moagem utilizado em alguns moinhos criogênicos.

Fonte: Junior D. (2003).

A moagem de materiais vegetais pode ser feita por diferentes maneiras empregando diversos tipos de moinhos. Os mesmos se diferenciam no tempo de moagem, p. ex., o moinho de facas e o moinho criogênico obtêm pequenos tamanhos de partícula em um curto período de tempo, porém no moinho de facas quando não há refrigeração pode haver incremento de temperatura, o que pode ser revertido facilmente com o resfriamento do equipamento ou com o uso de um moinho criogênico. No moinho de bolas é um processo de moagem mais demorado e que fornece material com maior tamanho de partícula, porém é um processo barato e fácil de conduzir, já o mesmo não ocorre no moinho criogênico. Há alguns estudos de comparações entre atributos sensoriais de materiais vegetais, como de pimenta (*Piper nigrum L*), no qual Liu et al 2013, estudaram o efeito da moagem criogênica e do moinho de martelos na pimenta moída. O moinho criogênico resultou em uma mínima alteração de cor, flavor e atributos sensoriais da pimenta e, além disso, o moinho criogênico preservou compostos que são importantes na preservação do aroma como o limoneno, α -pineno, e β -pineno, cresol e linalol, os quais foram perdidos com moinho de martelos ou em longos períodos de armazenamento (superior a seis meses). Segundo Junior et al, 2003, devido ao uso de nitrogênio líquido na moagem criogênica, ocorre a diminuição da possibilidade de perda de componentes voláteis.

Em relação à influência da moagem nos OEs há uma escassez de trabalhos na literatura, sendo que em um dos únicos encontrados foi feita a comparação dos efeitos da moagem criogênica e à temperatura ambiente nos OEs de pimenta preta (variedade Malabar).

Murthy et al. 2008, evidenciaram que o moinho criogênico preservou em maiores quantidades dos hidrocarbonetos monoterpênicos e o aroma da amostra em relação a moagem em temperatura ambiente. Entretanto não foram encontrados na literatura mais estudos sobre a influência de diferentes métodos de moagem nos OEs de plantas

2.3.3 Extração de óleos essenciais

Diferentes métodos são usados para extração de óleos essenciais, como a hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, destilação a vácuo, enfloração, extração com solventes, prensagem, extração por dióxido de carbono supercrítico, entre outros. Estas técnicas são usadas há muitas décadas, entretanto em geral consomem muita energia e requerem grandes quantidades de solvente ou elevado tempo de extração. Dentre os processos existentes para extração de óleos essenciais, a HD e a extração assistida por MO serão as técnicas enfocadas neste estudo, tendo em vista a aplicação nesse trabalho.

A HD é um método antigo e versátil, sendo o mais usado comercialmente no Brasil (SIMÕES et al., 2000). Nesse método de extração o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição aquecida, por exemplo, através de manta de aquecimento, onde o vapor faz com que as paredes celulares se abram e o óleo que está entre as células evapore junto com a água que vai para o condensador, onde é resfriado e separado por diferença de densidade. No caso das produções em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger (Figura 5), o qual é conectado a um recipiente contendo o material vegetal e o solvente. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro (SIMÕES et al., 2000).

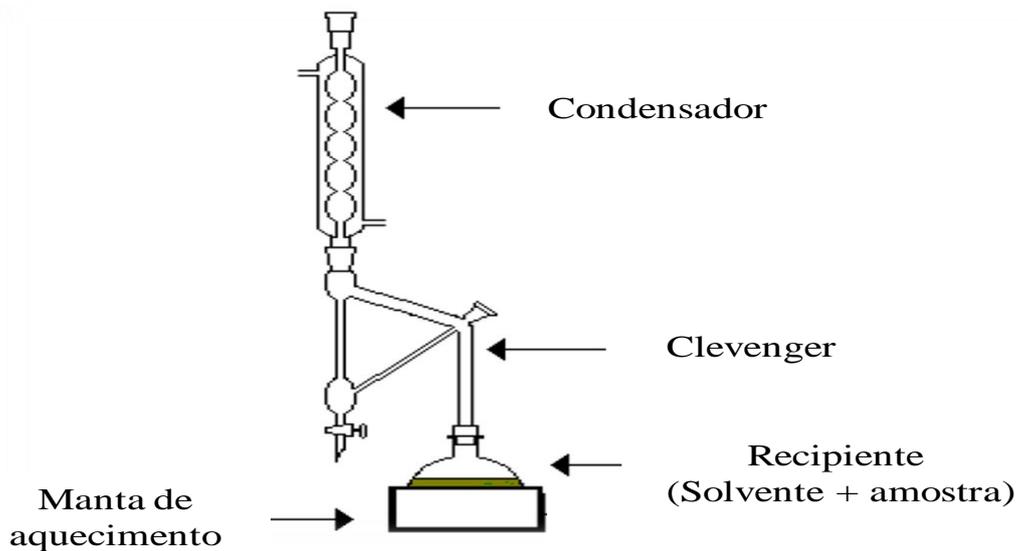


Figura5: Extração de óleos essenciais pelo método convencional (Hidrodestilação), usando sistema tipo Clevenger.

Fonte: SIMÕES et al., 2000

A radiação MO tem sido utilizada com frequência para extração de produtos naturais e processos que geralmente necessitam de horas ou dias pelos métodos convencionais (Li et al, 2013; MADEJ, 2009, AZMIR et al, 2013). Algumas vantagens são citadas no uso de MO, tais como aquecimento eficaz, rápida transferência de energia, redução do tamanho do equipamento, resposta rápida ao processo de aquecimento, aumento de produção e eliminação de etapas do processo (GARCIA e CASTRO, 2003).

A extração de OEs assistida por MO, tem sido feita de maneira similar a HD apenas com a modificação do sistema de aquecimento, onde se utiliza a hidrodestilação (com as mesmas quantidades de solvente) associada à radiação micro-ondas. Essa técnica é chamada de hidrodestilação com micro-ondas (MHD, do inglês *Microwave hydro-distillation*), (FLAMINI ET AL, 2007; JIAO ET AL, 2012). Entretanto, o procedimento mais frequentemente utilizado envolve a redução da quantidade de solvente, sendo chamado de extração assistida por MO sem solvente (SFME, do inglês *Solvent-Free Microwave Extraction*). Basicamente, a SFME envolve a colocação do material vegetal seco previamente umedecido em um reator de MO (Figura 6) e o aquecimento interno do material vegetal faz com que ocorra o rompimento das células que armazenam óleo essencial. O óleo essencial após sair da planta, passa por um sistema de condensação que fica fora do forno MO e condensa continuamente, sendo posteriormente recolhido (LUCCHESI, 2004). Nesta técnica

não é necessária à adição de solvente para extração, apenas o conteúdo de água da planta *fresca* já é suficiente para ocorrer a extração. Para materiais secos a planta pode ser umedecida antes da extração (BAYRAMOGLU et al, 2008).

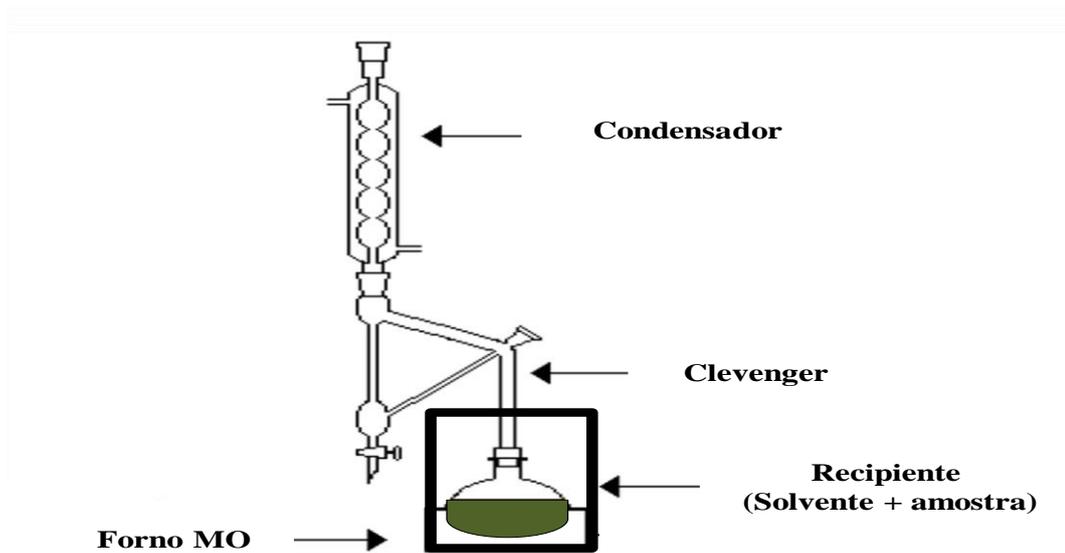


Figura 6: Equipamento para extração de OEs por SFME.

Fonte: Adaptado de Simões et al, 2002.

A utilização da SFME para a extração de compostos bioativos como os OEs é vantajosa em relação a outras técnicas, pois reduz o tempo de extração. Por exemplo, para obtenção de OEs de materiais vegetais por MO são necessários em torno de 30 a 50 min, enquanto usando a HD com aquecimento convencional cerca de 4 a 5 h de extração são necessários (LI ET AL, 2012, LUCCHESI ET AL, 2007, BAYRAMOGLU ET AL, 2008). Diferenças também são observadas na composição dos OEs. Filly et al (2014) relataram que a extração de OEs com SFME aumenta a quantidade de compostos oxigenados, os quais são mais odoríferos que hidrocarbonetos monoterpênicos. Os mesmos observaram que para OEs de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), cerca de 36,2% e 33,9% de compostos oxigenados são obtidos por SFME e HD, respectivamente. Para monoterpênicos, o oposto foi observado, com 62% e 66% de monoterpênicos obtidos para SFME e HD, respectivamente. Diferenças também são observadas na atividade antioxidante dos OEs obtidos por diferentes métodos. Ma et al. (2012) evidenciaram que os OEs extraídos por SFME apresentaram atividade antioxidante maior que aqueles extraídos por HD, sendo 31,99 $\mu\text{g/mL}$ e 85,86 $\mu\text{g/mL}$ para SFME e HD,

respectivamente. Dessa forma, pode-se observar que é necessário adicionar o dobro de OE extraído por HD para ter o mesmo efeito antioxidante em relação ao OE extraído por SFME.

Conforme citado acima muitos fatores podem influenciar na composição do óleo essencial. Por exemplo, na extração por SFME tem sido obtida maior quantidade de compostos oxigenados, os quais têm apresentado diversas atividades biológicas (DEBA et al, 2008). Apesar de vários trabalhos na literatura indicarem tal processo, nenhum estudo foi encontrado na literatura que permita indicar as possíveis causas. Um dos fatores que talvez possa influenciar na composição dos óleos essenciais é a atmosfera dentro do sistema de extração. Atualmente as extrações de OEs (pelos métodos convencionais e por SFME) são feitas na presença do ar atmosférico, o qual possui como constituintes majoritários o oxigênio (em torno de 21%) e o nitrogênio (em torno de 79%), podendo haver presença de outros gases minoritários que podem ser considerados contaminantes no ambiente como, por exemplo, dióxido de carbono, dióxido de enxofre, ozônio, entre outros (AKASOFU, 1989). Considerando a maior quantidade de compostos oxigenados nos OEs obtidos por SFME, pode ser que exista alguma relação com oxigênio presente na atmosfera interna dos frascos de extração com a radiação micro-ondas. Assim, torna-se interessante verificar a influência da fase gasosa durante o processo de extração na composição dos óleos essenciais, o que até o presente momento não foi abordado na literatura.

Outra hipótese seria a maior absorção de radiação micro-ondas por compostos oxigenados, que ocorreria pela formação de dipolos nas moléculas dos componentes oxigenados dos OEs, aumentando a interação com as micro-ondas e eficiência de extração. Um indício da maior absorção de micro-ondas desses compostos pode ser obtido na avaliação de processos de secagem, onde compostos oxigenados são perdidos em maior quantidade no processo com micro-ondas em comparação com os demais métodos, possivelmente pela maior interação com as micro-ondas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em quatro etapas para avaliação dos diferentes métodos de moagem, secagem, método de extração e atmosfera de extração por SFME nos OEs, visando assim avaliar quantitativamente e qualitativamente o OE presente nas partes aéreas de *B. articulata*, as etapas estão subdivididas e estão mostradas na figura 7.

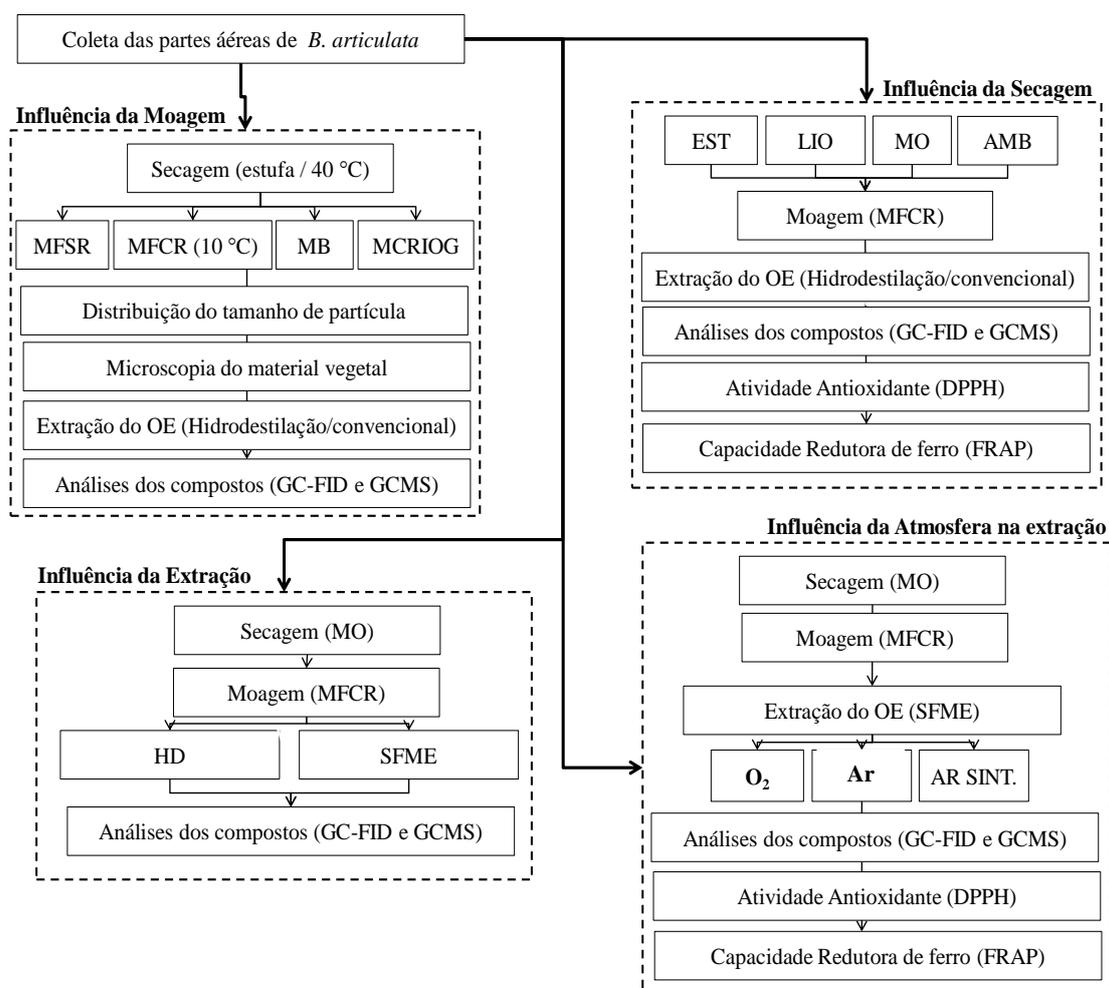


Figura 7: Fluxograma com as etapas de preparo de amostra estudadas para obtenção de OE de *B. articulata*. Legenda: MFSR (Moinho de facas sem refrigeração), MFCR (Moinho de facas com refrigeração), MB (Moinho de Bolas), MCRIOG (Moinho criogênico), MO (Microondas), EST (Estufa), LIO (liofilização), AMB (Ambiente), GC-FID (cromatografia gasosa com detector de ionização de chama), GC-MS (cromatografia gasosa com espectrometria de massa), O₂ (Oxigênio), Ar (Argônio), ARSINT (Ar sintético).

3.1 Coleta

As partes aéreas de *B. articulata* foram coletadas no período da manhã na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), localizada na cidade de Frederico Westphalen (RS), Brasil (S 27° 22'; W 53° 25', altitude 490 m). Para a avaliação da influência da moagem, secagem, extração e injeção de gases na composição do OE, as amostras foram coletadas nos meses de julho de 2012, março de 2013 e outubro de 2013, respectivamente. A identificação do material vegetal foi realizada por comparação com amostra do Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria (RS), Brasil. Um material *voucher* foi depositado no mesmo herbário com número 12062.

3.1.1 Reagentes

Argônio líquido (White Martins, Brasil) foi utilizado para moagem criogênica. Óleo mineral branco (Alpha Química, Brasil) foi utilizado como meio dispersante para a determinação da distribuição do tamanho de partícula. Água destilada foi usada como solvente para a extração do óleo essencial por HD e para umedecer a planta na extração por SFME. Hexano de grau analítico (Dinâmica, Brasil) foi utilizado para a diluição de OE antes da análise por cromatografia gasosa (GC) e sulfato de sódio anidro (Vetec, Brasil) foi utilizado para remover a umidade do OE após a extração. Metanol de grau analítico (Vetec, Brasil) foi utilizado para a diluição de OE para testes de atividade antioxidante (DPPH e FRAP). Argônio, oxigênio e ar sintético (White Martins, Brasil) foram utilizados para injeção de gases durante a extração. Para as análises de cromatografia gasosa nitrogênio e hélio (White Martins, para cromatografia) foram utilizados como fase móvel para GC-FID (cromatografia gasosa com detector de ionização de chama) e GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas), respectivamente.

3.1.2 Instrumentação

Para a avaliação da influência da moagem o material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar (modelo TE-394/3 Tecnal, Brasil) na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, *Campus* Frederico Westphalen. Para a moagem foi utilizado moinho de facas (modelo MA 630/1, Marconi, Brasil), moinho de bolas (modelo VF 30A, Bonfiglioli, Vietnam) do Departamento de Solos da UFSM e moinho criogênico (modelo 6750, Spex, Certi-Prep, EUA) do Laboratório de Análises Químico Industrial e Ambiental – LAQIA, do Departamento de Química da UFSM. A distribuição de tamanho de partícula foi realizada por difração a laser (Mastersizer 2000 ®, Malvern, Reino Unido) no mesmo laboratório e para medida do tamanho de partícula da amostra sem moer foi utilizado um paquímetro. A microscopia do material vegetal foi feita utilizando microscópio eletrônico de varredura (modelo JSM-6360LV, Jeol, Japão) do Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG.

Para a avaliação da secagem foi utilizada estufa com circulação forçada de ar (modelo TE-394/3, Tecnal, Brasil), liofilizador (modelo LS 3000, Terroni, Brasil), forno micro-ondas (modelo Perfect, Panasonic, Brasil), com dimensões internas de 22x32x30 cm, com volume de 21,1 L potência 800W e frequência 2450MHz, adaptado para secagem empregando sensor infravermelho e controle microprocessado para controle de temperatura e ajuste das variáveis de (tempo, temperatura, variação de temperatura, emissividade, rampa de aquecimento e tempo de resfriamento), conforme mostrado na Figura 8. Esse equipamento foi construído em parceria com o Grupo de Eletrônica de Potência e Controle (GEPOC) do Departamento de Engenharia Elétrica da UFSM.

A extração do óleo essencial por HD foi realizada utilizando o aparelho do tipo Clevenger usando um balão de fundo redondo de 1 L e o aquecimento com uma manta aquecedora de 1 L (EduLab, Brasil). A extração do óleo essencial por SFME foi feita em um equipamento (modelo DryDist, Milestone) do LAQIA-UFSM o qual possui frequência de 2450 MHz, potência máxima de 1200 W, dimensões internas de 35x35x35 cm, com volume de 42,8 L, utilizando um balão de fundo redondo de 1 L no qual foi adicionado a planta umedecida. Um banho ultra termostático (SL 152/10, Solab, Brasil) foi usado para a refrigeração na extração por HD, e por SFME (fixado em 5 °C) e também para o resfriamento no moinho de facas com refrigeração (10 °C). Na avaliação da influência da composição

gasosa a extração foi feita por SFME e para controle da vazão foi utilizado um fluxímetro (Key Instruments, Estados Unidos).

A quantificação de compostos voláteis foi feita por cromatografia em fase gasosa, utilizando um GC-FID (CX Varian modelo 3400, Varian, Califórnia, Estados Unidos) equipado com uma coluna de RTX-5MS (Restek Corporation, Bellefonte, Estados Unidos).

A identificação foi realizada usando um GC-MS (QP2010 Plus, Shimadzu, Columbia, MD, Estados Unidos), equipado com uma coluna ZB - 5MS (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos).



Figura 8: Forno MO adaptado utilizado no experimento. A: Vista geral do equipamento; 1: parte interna da cavidade, 2: recipiente com a amostra, 3: pirômetro óptico (sensor infravermelho) para monitoramento e controle da temperatura superficial, 4: Vista geral do sistema de controle microprocessado para ajuste de variáveis de secagem B: Vista aproximada do sistema de controle microprocessado para ajuste das variáveis (tempo, temperatura, variação de temperatura, emissividade, rampa de aquecimento e tempo de resfriamento). C: Exaustor para resfriamento do sistema, localizado na lateral esquerda do equipamento.

3.2 Métodos de moagem

Para avaliação da influência da moagem o material vegetal foi seco em estufa a 40 °C com circulação de ar, até o teor de umidade ser inferior a 12% (m / m) para posterior moagem. A moagem do material vegetal foi realizada com moinhos de facas, bolas e criogênico. No moinho de facas a moagem foi realizada com e sem uso de refrigeração. O

banho ultra - termostático foi fixado em 10 °C para a moagem com refrigeração. O moinho de bolas planetário foi usado em 70 rpm durante 120 min em rotação anti-horária, com base em experimentos preliminares. A moagem criogênica foi realizada usando tubos de policarbonato, o equipamento foi refrigerado com argônio líquida e a moagem foi feita por impacto, através de barras magnéticas. O conjunto de moagem foi constituído de um tubo de policarbonato, uma barra magnética e duas tampas de aço inoxidável. Os valores de temperatura e umidade foram monitorados antes e após a moagem das amostras em todos os processos de moagem. As principais variáveis operacionais em relação a métodos de moagem encontram-se descritos na Tabela 3. Após a moagem a amostra foi submetida à extração de OEs por HD. A amostra SM (sem moer) não passou por processo de moagem através d3 moinhos, a mesma foi apenas picada manualmente.

Tabela 3 - Condições experimentais usadas nos diferentes métodos de moagem avaliados nesse estudo.

Método de moagem	Código	Tempo de moagem (min)	Variáveis do processo
Sem moer/picado manualmente	SM	-	-
Moinho de facas com refrigeração (10 °C)	MFCR	1	5 g de amostra/ciclo; velocidade de 27.000 rpm.
Moinho de facas sem refrigeração	MFSR	1	
Moinho planetário de bolas	MB	120	5 g de amostra/ciclo/frasco; uso de 20 bolas de ágata; velocidade de 70 rpm.
Moinho criogênico	MCRIOG	1	5 g de amostra/ciclo, tempo de pré-congelamento: 2 min; moagem a uma taxa de 36 batidas por min;

3.3 Métodos de secagem

Para a avaliação dos métodos de secagem de *B. articulata* a amostra foi submetida a secagem em estufa, ambiente, liofilização e micro-ondas. Para a secagem em estufa, por micro-ondas e em ambiente as amostras foram coletadas e imediatamente secas. A secagem em ambiente foi feita em sala fechada com o uso de um climatizador fixado a uma temperatura de 25 °C. Para a secagem por liofilização, o material foi previamente congelado por 24 h à -18 °C. Foram realizados testes preliminares para verificação do tempo necessário para obter uma amostra com umidade inferior à 12%. As variáveis foram selecionadas com base em estudos que relataram estas condições de temperatura como as que tiverem menores perdas de compostos voláteis e melhores rendimentos de OE. Após a secagem a planta foi moída em moinho de facas com refrigeração a 10 °C e submetida à extração de OE por HD. As condições de secagem estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de secagem de *B. articulata*, para os quatro métodos de moagem estudados.

Método de secagem	Condições de Secagem
Sem secagem, <i>in natura</i> (IN)	amostra <i>in natura</i> , sem tratamento de secagem.
Estufa (EST)	36 °C ± 2 °C
Liofilização (LIO)	congelamento: -18 °C por 24 h, secagem primária 0 °C, secagem secundária 10 °C
Ambiente (AMB)	25 °C ± 2° C
Micro-ondas (MO)	20 g de amostra por ciclo; 50 °C

3.4 Métodos de extração

Para a avaliação dos métodos de extração a planta foi submetida à secagem com MO. Cada ciclo de secagem teve capacidade de processamento de 20 g de planta em 30 min. A

planta foi moída em moinho de facas com refrigeração a 10 °C. Cada ciclo de moagem teve capacidade de moagem de 5 g de material vegetal em um tempo de 1 min.

Para a extração por HD as amostras (cerca de 50 g) foram submetidas à extração de OEs empregando 500 mL de água destilada e aquecimento por 4 h. A extração foi conduzida até obter o máximo rendimento de OE. O condensador foi anexado a um banho ultra termostático fixado em 5 ° C. O óleo essencial foi coletado e foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção da umidade, com posterior armazenamento em congelador à -18 ° C até análise do OE por cromatografia gasosa. O rendimento do óleo essencial foi informado em % (v/m), que é o volume (mL) de óleo essencial por (g) de massa de material vegetal (Farmacopeia Brasileira, 2010; FABROWSKI, 2002).

Para a extração de OEs por SFME foram feitos testes preliminares onde foram definidos os tempos e potência que obtiverem maiores rendimentos de óleo essencial. A extração de OEs por SFME foi feita com 50 g planta previamente umedecida (1 h antes da extração) com 20% de água destilada (m/v). A extração foi feita em pressão atmosférica, onde o material vegetal foi aquecido por 15 min a uma potência de 800 W e 30 minutos por 500 W, totalizando 45 min de extração. Para o resfriamento foi utilizado um banho ultra termostático. Após a extração foi adicionado ao OE sulfato de sódio anidro para remover a umidade.

Para a avaliação da influência da atmosfera na extração por SFME a planta foi submetida à secagem em micro-ondas seguida da moagem em moinho de facas com refrigeração a 10 °C. Para a injeção dos gases foi feita uma modificação no aparato utilizado para a extração dos gases. Foi adaptada uma tampa com uma abertura que possibilitou a ligação de uma mangueira de politetrafluoretileno (PTFE), e o gás foi transportado até o fluxímetro que regulou o fluxo de gás, e do fluxímetro conduzido ao recipiente da amostra. Foram feitas extrações de OEs em diferentes composições de atmosfera. Foi injetado oxigênio, argônio e ar sintético. Antes do início da extração foi feita purga com fluxo de gás de 2 L min⁻¹ por 5 minutos. A injeção dos gases foi feita em um fluxo de gás de 0,5 L min⁻¹ durante todo o tempo de extração para todos os gases utilizados. Na figura 9A, B e C é mostrado o equipamento com a modificação para a injeção dos gases.

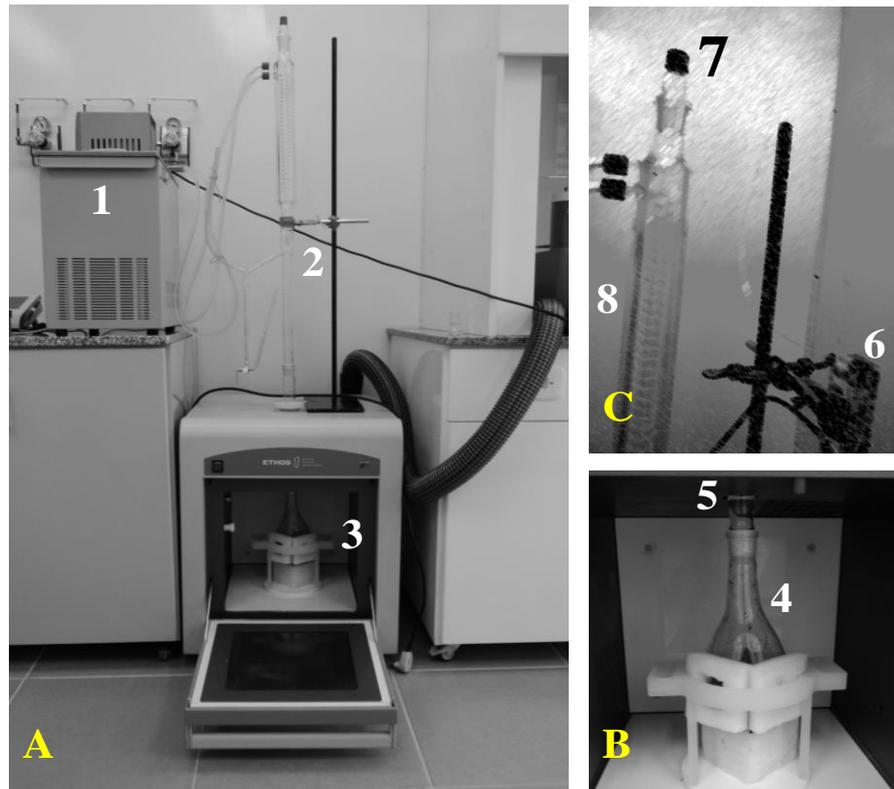


Figura 9: Equipamento utilizado para extração de OEs por SFME; A: vista geral do equipamento. 1: banho ultra termostático para resfriamento dá água de circulação; 2: aparato tipo Clevenger; 3: parte interna da cavidade do forno MO. B: vista interna do forno MO, 4: balão utilizado para extração (planta umedecida), 5: conexão entre balão de extração e Clevenger; C: Adaptação para injeção de gases, 6: fluxímetro para controle da vazão dos gases; 7: adaptação para entrada de tubulação de PTFE para injeção dos gases, 8: condensador.

3.5 Análises no material vegetal e no OE

3.5.1 Distribuição do tamanho de Partícula

A avaliação do tamanho de partícula foi realizada usando 0,5 g de amostra diluída em 200 mL de vaselina. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O parâmetro utilizado para determinar o tamanho de partícula foi o diâmetro médio da partícula ($D_{0,5}$), considerando a distribuição de volume. Como o equipamento é capaz de avaliar partículas de no máximo 2000 μm , a avaliação da planta que não foi moída (SM) foi feita utilizando um paquímetro.

3.5.2 Microscopia e avaliação do rompimento do material vegetal

Os cladódios de *B. articulata* foram analisados por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura a fim de avaliar a ruptura da planta, e, em especial, as estruturas que armazenam óleo essencial. Foram preparadas lâminas semipermanentes com o material seccionado no sentido transversal, à mão livre, submetido à coloração de azul de astra ou azul de toluidina. (ROESER, 1972). Foi usado para teste microquímico o reativo Sudam III, com objetivo de verificar a presença de compostos lipofílicos (SASS, 1951). Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias no microscópio fotônico Olympus BX 40, acoplado à unidade PM20. Foi realizada análise estrutural de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Souza, 1998), em alto vácuo. Para tal procedimento, as amostras foram fixadas em FAA70 (solução contendo 90 mL de etanol 70, 5 mL de ácido acético e 5 mL de aldeído fórmico) e desidratadas em série etanólica crescente (etanol 70, 80, 90% e PA) até o ponto crítico, no equipamento Balzers CPD 030 e, após montagem em suporte, submetidas à metalização com ouro no aparelho Balzers Sputtering SCD 030 e posterior análise.

3.5.3 Cromatografia Gasosa

Através de testes preliminares foram definidas as condições experimentais de análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa. As mesmas condições de análise foram feitas para analisar o óleo essencial obtido todas as etapas de preparo de amostra que foram estudadas.

Nas análises por GC-FID, 1 μL de OE diluído em hexano (1:100) foi injetado através de injetor *split/splitless* à 230 °C no modo *split* (1:30). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio a uma taxa de 1,5 mL min^{-1} e uma pressão constante de 15 psi. A temperatura da coluna iniciou em 50 °C (1 min), elevando para 100 °C a uma taxa de 3 °C min^{-1} , após para 125 °C a uma taxa de 1 °C min^{-1} , após para 230 °C a uma taxa de 15 °C min^{-1} e permanecendo em 230 °C por 5 min. A temperatura do detector foi fixada em 250 °C. A quantificação dos compostos voláteis foi feita através da normalização das áreas.

A identificação dos compostos de OE foi realizada por GC/MS, nas mesmas condições de temperatura e fluxo de gases descritos acima, usando hélio como gás de arraste. A interface

de GC/MS e a fonte de ionização foi mantida a 230 °C. O instrumento foi executado no modo de ionização de elétrons (70 eV) e varredura de massa de íons 35-350 m/z. Uma série homóloga de alcanos (C6-C24) foi analisada nas mesmas condições de cromatografia para calcular o Índice de Kovats (IK) dos compostos voláteis. Inicialmente, a identificação dos picos foi feita por comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa fornecida pelo National Institute of Standards and Technology (NIST 02). Posteriormente, foram comparados os índices de retenção relativos (Índice de Kovats) e a ordem de eluição dos compostos com os encontrados na literatura (Adams, 1995).

3.5.4 Avaliação da Atividade Antioxidante (Remoção do radical livre – DPPH)

Os OEs foram avaliados de acordo com a técnica descrita por Brand-Williams et al (1995), com algumas modificações. Uma alíquota de 50 µL de diferentes concentrações de óleo essencial diluído em metanol foi adicionada em 1950 µL de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 60 mmol L⁻¹. A solução de trabalho foi ajustada de modo a obter uma absorvância de 1,1±0,02. A atividade antioxidante (AA) de remoção do radical livre DPPH foi mensurada pelo decréscimo da absorvância em 517 nm após 24 h de reação em ambiente escuro e calculada pela fórmula:

$$\% \text{ AA} = ((\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{branco}}) * 100$$

O EC₅₀ (concentração capaz de promover o descoramento de 50% do DPPH) foi expresso em mg de óleo essencial. Foi confeccionada uma curva padrão com Trolox, um análogo sintético da vitamina E, e com BHT (Hidróxido de Tolueno Butilato), antioxidante sintético utilizado na indústria de alimentos. Foi calculado também o índice de Atividade antioxidante IAA (concentração de DPPH mg mL⁻¹)/(EC 50 mg mL⁻¹), onde as amostras são classificadas conforme: (IAA < 0,5), moderado (0,5 < IAA < 1,0), forte (1,0 < IAA < 2,0) e Muito forte (IAA > 2,0), (SCHERER e GODOY, 2009).

3.5.5 Avaliação da capacidade redutora de ferro (FRAP)

Baseada na metodologia descrita por Benzies e Strain (1996), o extrato (óleo essencial diluído em metanol) foi adicionado ao reagente FRAP contendo tampão acetato 300 mM (pH 3,6), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM e FeCl_3 20 mmol L^{-1} misturados na proporção 10:1:1 (v/v/v) e a absorvância foi medida em 593 nm. Foi confeccionada uma curva padrão com Trolox e os resultados foram expressos em mg de OE /mg equivalentes de Trolox.

3.6 Análise Estatística

Todas as extrações e análises foram realizadas em triplicata. Foi aplicada análise estatística em todos os compostos (picos) encontrados no GC-FID com área superior a 0,1%. Os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre algum processo foram selecionados e, a partir destes que sofreram modificações, foi feita a avaliação do efeito do processo investigado. Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para avaliar os processos que apresentaram a característica mais similar em comparação com a amostra original (que não foi submetida ao processo estudado) em cada etapa. Na moagem a amostra considerada “original” foi a amostra que não foi submetida a moagem (SM), já na secagem a amostra considerada “original” foi a amostra *fresca*.

Já para a avaliação da influência da extração e da injeção de gases foi feita análise estatística em todos os compostos com área acima de 0,1% no GC-FID, e selecionados para o estudo os que apresentaram diferença significativa na extração. Para a avaliação dos resultados dos métodos de secagem, moagem e injeção de gases na extração por MO os dados experimentais foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido pelo Tukey ($p \leq 0,05$) usando o *software* 5,1 “Statistica v 5.1” (Statsoft, 2004). A PCA (Análise de Componentes Principais) foi utilizada para avaliar os processos que apresentam a característica mais semelhante em comparação com o óleo da amostra SM (moagem) e IN (secagem). utilizando o *software* Pirouette (Infometrix, Inc., Bothell, WA). Os dados foram auto escalados para cada variável, a fim de assumir o mesmo peso durante a análise. Para a avaliação dos resultados do estudo da comparação dos métodos de extração foi aplicado o

teste Student-t ($p < 0,05$) para diferença entre duas amostras usando o *software* 5,1 “Statistica v 5.1” (Statsoft, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão dos resultados, os mesmos foram divididos em quatro partes, cobrindo a avaliação da influência da moagem, secagem, método e atmosfera de extração nos OEs. Cabe ressaltar que, conforme destacado no item 3.1 *Coleta*, a amostragem do material vegetal foi efetuada em períodos diferentes para cada estudo (influência da moagem, secagem, método e atmosfera de extração) e que, como esperado, diferenças no volume e composição dos OEs foram observadas. Contudo, como os experimentos foram realizados de forma a avaliar o efeito de cada etapa do preparo da amostra de maneira independente, a diferença do período de coleta não foi considerada nesse estudo.

4.1 Influência da moagem no OE de *B. articulata*

4.1.1 Caracterização do material vegetal após a moagem

Os materiais vegetais obtidos utilizando diferentes métodos de moagem foram avaliados quanto à umidade, temperatura, tamanho de partícula e rendimento de OE (Tabela 5). Estes resultados foram comparados com a amostra que não foi submetida à moagem (SM).

A umidade aumentou ligeiramente (menos de 1%) após a moagem em moinho de facas e no moinho de bolas, enquanto que para moagem criogênica a umidade praticamente não foi alterada. Considerando-se que o rendimento de OE é normalmente realizado em base seca, foi feita a correção do teor de umidade, mas uma variação insignificante foi observada e, por conseguinte, este parâmetro não teve influência nos resultados.

A moagem com moinho de facas sem refrigeração e com moinho de bolas planetário proporcionou um aumento da temperatura do material vegetal, a qual foi medida imediatamente após a abertura dos mesmos. O maior acréscimo de temperatura foi observado no material vegetal moído em MFSR, que aumentou para $32,1 \pm 1,2$ °C, ou seja, mais que o dobro da temperatura inicial antes de moagem ($15,0 \pm 0,8$ °C). No entanto, este aumento de temperatura não influenciou significativamente o rendimento do OE. O maior impacto da

moagem em relação ao rendimento foi observado apenas para o método que usou temperaturas extremamente baixas (moagem criogênica). Na moagem criogênica, argônio líquido foi usado e, devido às baixas temperaturas atingidas (o ponto de ebulição do argônio é de cerca de -186°C), as perdas por volatilização, pelo menos durante o processo de moagem, não seriam esperadas. Entretanto, os OEs da amostra estudada estão localizados em estruturas específicas (tricomas glandulares e dutos secretores) que podem ter sido rompidas durante a moagem liberando os OEs que podem ter ficado aderidos nas paredes do tubo de policarbonato, ou podem ter sido volatilizados quando o material atingiu a temperatura ambiente. Assim, quanto mais eficiente for o moinho, menor será o tamanho de partícula e maior será a possibilidade de ruptura dessas estruturas. De modo a avaliar essa hipótese, uma análise do tamanho de partícula foi realizada.

Tabela 5 - Caracterização do material vegetal após a moagem e rendimento dos OEs por diferentes métodos (n=3).

Método	T(°C)	Tamanho de partícula D 0,5 (µm)	Rendimento de óleo (%)
SM	15,0 ± 0,08	1550 ± 92 ^{a*}	0,52±0,04 ^{ab}
MFCR	9,2 ± 0,10	51,8 ± 1,3 ^c	0,50±0,02 ^b
MFSR	32,1 ± 0,06	56,8 ± 1,6 ^c	0,50±0,02 ^b
MB	19,2 ± 0,10	112,8 ± 9,8 ^b	0,56±0,03 ^a
MCRIOG	12,7 ± 0,05	38,3 ± 1,1 ^d	0,40±0,03 ^c

Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP).

* Valor expresso em mm

Legenda: SM (amostra não submetida a moagem em moinho/picada manualmente); MFCR: Moinho de facas com refrigeração; MFSR: Moinho de facas sem refrigeração; MB: Moinho de Bolas; MCRIOG: Moinho criogênico.

A figura 10 apresenta a distribuição do tamanho de partícula para os quatro métodos de moagem estudados. Como mostrado, o moinho de bolas foi o método que obteve os maiores tamanhos de partícula ($112,8 \pm 9,8\mu\text{m}$), enquanto que o moinho criogênico apresentou os menores ($38,3 \pm 1,1\mu\text{m}$). Com exceção do MCRIOG, não foram observadas diferenças entre os rendimentos de óleos obtidos de amostras não cominuídas (SM) e àquelas cominuídas por MFSR, MFCR e MB. Desta forma, pode-se perceber que a moagem

criogênica foi o único método de cominuição que levou a perdas de OEs e que essa perda pode ser associada aos menores tamanhos de partículas obtidos por esse método, reforçando a hipótese de ruptura dos tricomas glandulares e dutos secretores que são as estruturas armazenadoras de OEs nessa espécie vegetal. Baseado nesses resultados foi feita uma verificação do rompimento dessas estruturas através de microscopia (Figura 11).

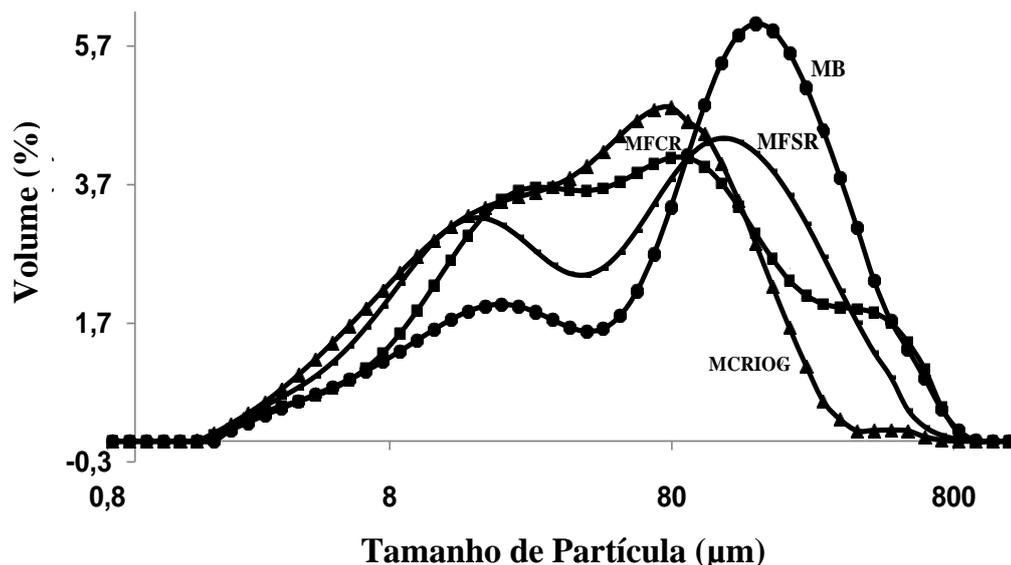


Figura 10: Distribuição do tamanho de partícula obtido por diferentes métodos de moagem.

Legenda: SM (amostra não submetida a moagem em moinho/picada manualmente); MFCR: Moinho de facas com refrigeração; MFSR: Moinho de facas sem refrigeração; MB: Moinho de Bolas; MCRIOG: Moinho criogênico.

Conforme comentado, alguns tipos de estruturas secretoras, como dutos e tricomas glandulares podem ocorrer em *Baccharis* (BUDEL; DUARTE, 2010; SOUZA et al , 2011; OLIVEIRA et al , 2011; BUDEL et al, 2013). Para *B. articulata*, os tricomas glandulares (*gt*) figura 11 (A – amostra SM) consistem de 8 células cobertas por uma cutícula espessa com citoplasma denso. Já os dutos secretores (*sd*), figura 11 (B – amostra SM) apresentam epitélio uni-seriado com 4-10 células que têm citoplasma denso e armazenam um produto lipofílico. A organização do eixo caulinar indica, epiderme (*ep*), colênquima (*co*) e dutos secretores (*sd*) . Como mostrado nas figuras 11 (A e B), a amostra que não foi submetida à moagem apresenta *sd* e *gt*, os quais armazenam os OEs. No entanto, os *gt* foram encontrados apenas em plantas que foram moídas usando moinho de facas com e sem refrigeração e moinho de

bolas (figuras 11C, 11D e 11E, respectivamente), enquanto que para a moagem criogênica não foram detectados dutos e tricomas (Figura 11F) na amostra analisada, devido à sua maior eficiência no rompimento do material vegetal. Desta forma, o menor rendimento de OE apresentado no MCRIOG pode ser explicado pela maior ruptura de *gt* e consequente liberação de OEs a partir destas estruturas, levando a perdas de compostos por volatilização ou adsorção nas paredes do recipiente de moagem.

Este é um aspecto importante da preparação de amostras para análise de OEs e, apesar de sua importância, pouca ou nenhuma especificação com relação ao grau de moagem é descrita, mesmo em compêndios oficiais (por exemplo, farmacopeias) para o controle de qualidade de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Portanto, perdas de OEs obtidos por diferentes métodos de moagem poderiam ser evitadas se o tamanho de partícula mínimo requerido fosse indicado e também condições de moagem que reduzam perdas de OEs. Efeitos semelhantes da moagem são esperados para outros materiais vegetais que armazenam OEs e possivelmente também sejam rompidos nesse processo, tornando o estudo da moagem um requisito importante e que deve ser avaliado no preparo de amostras para posterior determinação de OEs.

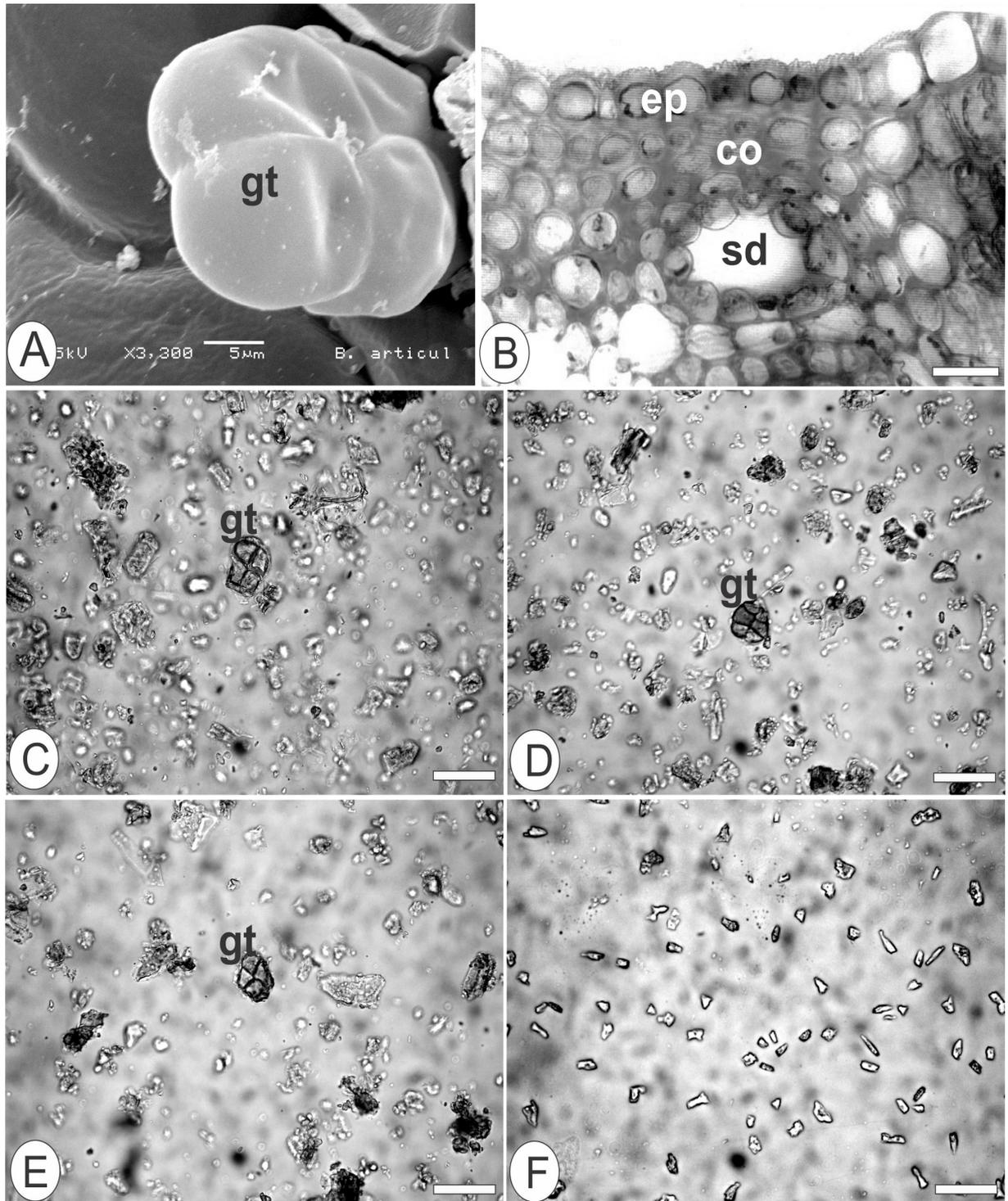


Figura 11: Microscopia do material vegetal. – (A) Superfície de cladódios em microscopia eletrônica de varredura, mostrando tricomas glandulares (gt), (B). Organização do eixo caulinar, indicando epiderme (ep), colênquima (co) e duto secretor (sd), (C). Planta moída em MFCR, (D) MFSR, (E) MB, (F) MCRIOG. A barra branca indica a escala (20 μm) de fotos (B, C, D, E, F).

4.1.2 Composição do óleo essencial

Os compostos dos OEs de *B. articulata* moída por diferentes métodos e submetida à HD foram quantificados e identificados por cromatografia gasosa (GC-FID e GCMS). Foram quantificados todos os compostos que apresentaram área superior a 0,1% e nestes foi aplicada análise estatística verificando os que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em algum método de moagem. Na figura 12 é mostrado um cromatograma contendo os picos relativos aos 21 compostos que mostraram diferenças significativas em algum método de moagem, o que corresponde entre 85,8 e 88,4% de área total do cromatograma (Tabela 6), dependendo do método de moagem utilizado.

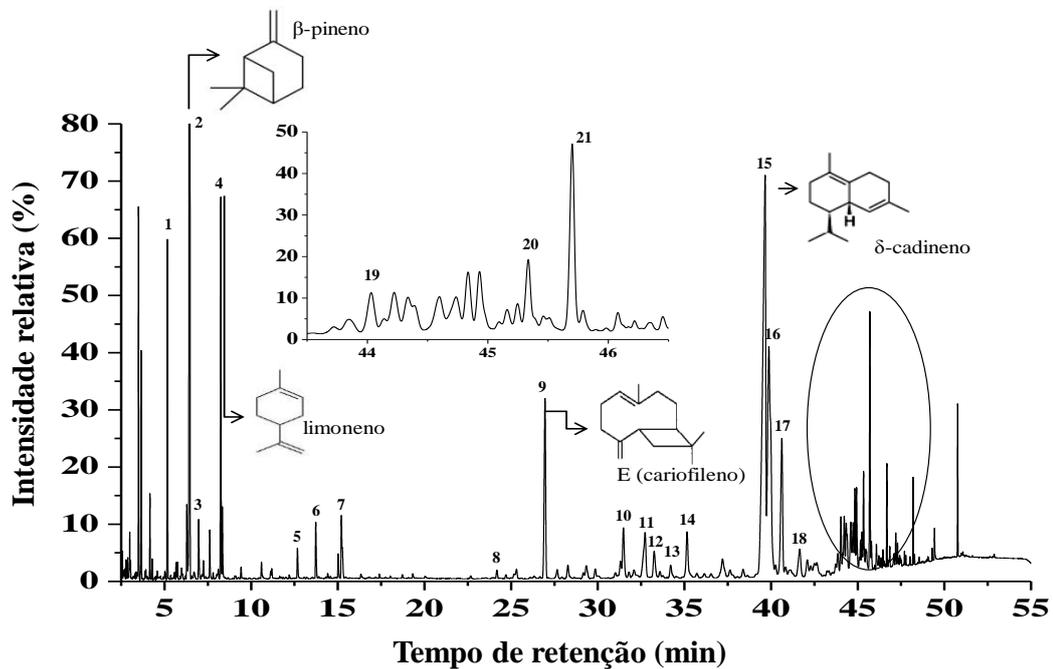


Figura 12: Cromatograma do OE obtido pelo GC-FID da planta não cominuída indicando os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação aos OEs obtidos por diferentes métodos de moagem; Vista reduzida do cromatograma do tempo 43,5 a 46,5 min para melhor visualização dos picos.

Legenda: SM (amostra não submetida a moagem em moinho/picada manualmente); MFCR: Moinho de facas com refrigeração; MFSR: Moinho de facas sem refrigeração; MB: Moinho de Bolas; MCRIOG: Moinho criogênico.

Conforme apresenta a Tabela 6, os sesquiterpenos, ambos hidrocarbonetos e compostos oxigenados, foram às classes mais representativas na composição do OE, variando de 13,47% a 48,10% e 35,75 a 50,09%, respectivamente. Os hidrocarbonetos monoterpênicos variaram de 12,73 a 34,49%. Os compostos majoritários foram β - pineno, (E)- Cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno.

Todos os processos de moagem apresentaram uma redução de monoterpênicos e sesquiterpenos oxigenados e aumento de hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Com relação ao tratamento SM, uma maior redução de monoterpênicos foi observada no tratamento MB, para os quatro monoterpênicos identificados (α -pineno, β -pineno, β -mirceno e limoneno). Limoneno teve redução em todos os processos de moagem, no entanto, em proporção menor no moinho de facas com e sem refrigeração (MFCR e MFSR). Compostos sesquiterpênicos apresentaram aumento da concentração em todos os processos de moagem, porém o processo que apresentou este aumento em menor proporção foi o MFCR. Óxido de cariofileno, espatulenol e α - cadinol mostraram diminuição na concentração em todos os métodos de moagem, sendo que as menores perdas foram observadas no tratamento MFCR.

De maneira geral, pode-se dizer que os compostos monoterpênicos são mais sensíveis a altas temperaturas que compostos sesquiterpênicos e a elevação na temperatura durante a moagem pode ter contribuído para a maior perda de monoterpênicos. Dos compostos monoterpênicos estudados os pontos de ebulição variam entre 155 -221 °C, já sesquiterpenos variam de 251-293 °C, sendo mais fixos mesmo em altas temperaturas. Na literatura (Singh e Goswami, 1999), tem sido relatado que se temperaturas elevadas forem atingidas no processo de moagem (42-95 °C), perdas de compostos voláteis podem ocorrer para diferentes especiarias, em uma proporção que pode chegar a 37% para a noz-moscada, 17% para a canela e 17% para orégano (ANDRES, 1976).

Tabela 6 - Composição química do OE (%) de *B. articulata* obtidos por diferentes métodos de moagem (n=3).

Compostos voláteis	IK GC-FID	IK GCMS	IK LIT	Método de moagem				
				SM	MFCR	MFSR	MB	MCRIOG
<i>Monoterpenos</i>								
1 α -pineno	936	934	934	3,37 ^a	1,96 ^b	1,61 ^b	1,05 ^b	1,25 ^b
2 β -pineno	980	977	981	25,60 ^a	19,24 ^b	13,46 ^b	9,5 ^b	10,86 ^b
3 β -mirreno	993	992	992	0,83 ^a	0,60 ^b	0,72 ^b	0,41 ^b	0,56 ^b
4 limoneno	1031	1029	1030	4,69 ^a	3,02 ^b	3,34 ^b	1,77 ^b	2,63 ^b
Total				34,49 ^a	24,82 ^b	19,13 ^c	12,73 ^d	15,3 ^{cd}
<i>Monoterpenos oxigenados</i>								
5 trans-pinocarveol	1140	1138	1148	0,35 ^b	1,07 ^a	0,46 ^b	0,39 ^b	0,27 ^b
6 pinocarvona	1165	1162	1162	0,72 ^b	1,21 ^a	0,46 ^c	0,43 ^c	0,30 ^d
7 mirtenol	1195	1195	1194	0,89 ^b	1,32 ^a	0,49 ^c	0,43 ^c	0,31 ^d
Total				1,96 ^b	3,6 ^a	1,41 ^c	1,25 ^c	0,88 ^d
<i>Sesquiterpenos</i>								
8 β -elemeno	1371	1400	1387	0,22 ^d	0,51 ^c	0,67 ^a	0,63 ^b	0,68 ^a
9 (E)-Cariofileno	1413	1411	1418	5,57 ^d	12,38 ^c	20,07 ^{ab}	19,42 ^b	20,09 ^a
10 allo-aromadendreno	1432	1450	1461	0,49 ^c	0,84 ^b	2,20 ^a	2,07 ^a	2,21 ^a
11 γ -cadineno	1472	1473	1519	0,81 ^c	1,12 ^{bc}	1,77 ^b	1,89 ^{ab}	2,05 ^a
12 germacreno-D	1474	1478	1480	1,31 ^d	3,15 ^c	2,83 ^c	5,99 ^a	5,07 ^b
13 γ -Elemeno	1489	1486	1480	2,11 ^d	4,78 ^c	7,54 ^{bc}	9,90 ^a	9,15 ^{ab}
14 α -muuroleno	1495	1492	1492	1,02 ^c	2,08 ^b	2,60 ^{ab}	3,00 ^a	2,70 ^{ab}
15 δ -cadineno	1519	1517	1524	1,94 ^d	3,46 ^c	6,01 ^a	5,20 ^b	5,30 ^b
Total				13,47 ^d	28,32 ^c	43,69 ^b	48,10 ^a	47,25 ^a
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>								
16 espatulenol	1571	1573	1573	24,69 ^a	22,06 ^{ab}	17,87 ^c	18,36 ^{bc}	17,84 ^{bc}
17 óxido de cariofileno	1574	1575	1577	10,89 ^a	9,95 ^b	4,56 ^d	5,01 ^c	4,79 ^c
18 globulol	1574	1578	1578	3,90 ^c	3,49 ^d	5,32 ^b	5,56 ^a	5,51 ^a
19 viridiflorol	1582	1586	1568	5,46 ^b	4,87 ^d	5,13 ^c	5,47 ^b	5,57 ^a
20 α -cadinol	1669	1657	1656	1,66 ^d	0,85 ^c	0,59 ^c	0,51 ^b	0,63 ^a
21 α -germacrol	1683	1683	1680	3,49 ^a	2,06 ^c	2,28 ^{bc}	2,99 ^{ab}	2,23 ^{bc}
Total				50,09 ^a	43,28 ^b	35,75 ^d	37,90 ^c	36,57 ^d
Total da composição (%)				86,7	88,4	85,9	85,8	86,9

Letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

Legenda: SM (amostra não submetida a moagem em moinho/picada manualmente); MFCR: Moinho de facas com refrigeração; MFSR: Moinho de facas sem refrigeração; MB: Moinho de Bolas; MCRIOG: Moinho criogênico.

Como mostrado na Tabela 6, monoterpênicos e compostos oxigenados em geral apresentaram menores concentrações no OE obtido a partir da planta cominuída, já para sesquiterpênicos a moagem favoreceu a concentração ou transformação de compostos em hidrocarbonetos sesquiterpênicos. A figura 13 mostra esta variação, bastante acentuada para as diferentes classes de compostos.

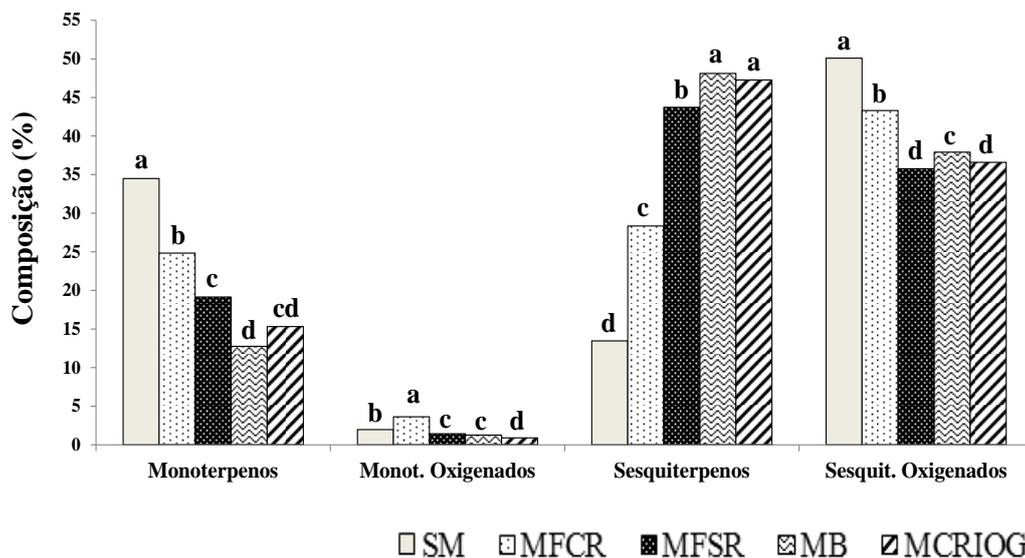


Figura 13: Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados para óleo essencial de *B. articulata* submetida a diferentes métodos de moagem. * Letras iguais não diferem entre si.

Legenda: SM (amostra não submetida a moagem em moinho/picada manualmente); MFCR: Moinho de facas com refrigeração; MFSR: Moinho de facas sem refrigeração; MB: Moinho de Bolas; MCRIOG: Moinho criogênico.

Para verificação das similaridades dos OEs obtidos por diferentes métodos de moagem e a amostra SM, foi aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA) para a composição normalizada das 21 variáveis analíticas (compostos voláteis) e 5 objetos (tratamentos). Dois componentes (PC1 e PC2) foram extraídos, explicando 84,98% dos dados (Figura 14). O método de moagem que apresentou perfil similar com a amostra SM foi o MFCR. Os hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados e sesquiterpênicos oxigenados estão geralmente relacionados com a amostra SM e o método de moagem MFCR, já os hidrocarbonetos sesquiterpênicos com os processos MFSR, MCRIOG e MB.

Os monoterpênicos são bem conhecidos por serem susceptíveis a alterações químicas sob condições de destilação a vapor e de extração convencional, envolvendo perdas de

compostos mais voláteis devido às elevadas temperaturas (PRESTI et al, 2005). O MFCR, provavelmente, proporcionou o perfil do óleo essencial similar com o da amostra SM devido ao controle de temperatura, mantendo em maior quantidade os compostos mais sensíveis que podem ser perdidos com a elevação da temperatura durante o processo de moagem. O oposto provavelmente ocorreu com a amostra obtida por MFSR, onde a elevação da temperatura não afetou no rendimento do OE, porém proporcionou a alteração na composição do mesmo.

Já o material vegetal submetido à moagem criogênica teve rendimentos de OE mais baixos e maior transformação do OE. Essas alterações provavelmente foram causadas pelo congelamento em baixas temperaturas e também devido ao pequeno tamanho de partícula obtido, o que pode ter levado ao rompimento das estruturas armazenadoras dos OEs e consequente perda de monoterpenos e a subsequente aumento relativo de sesquiterpenos. A amostra obtida por MB também resultou num produto com grande aumento de compostos sesquiterpênicos, provavelmente, pelo maior tempo de moagem e o aumento de temperatura gerado durante o processo de moagem.

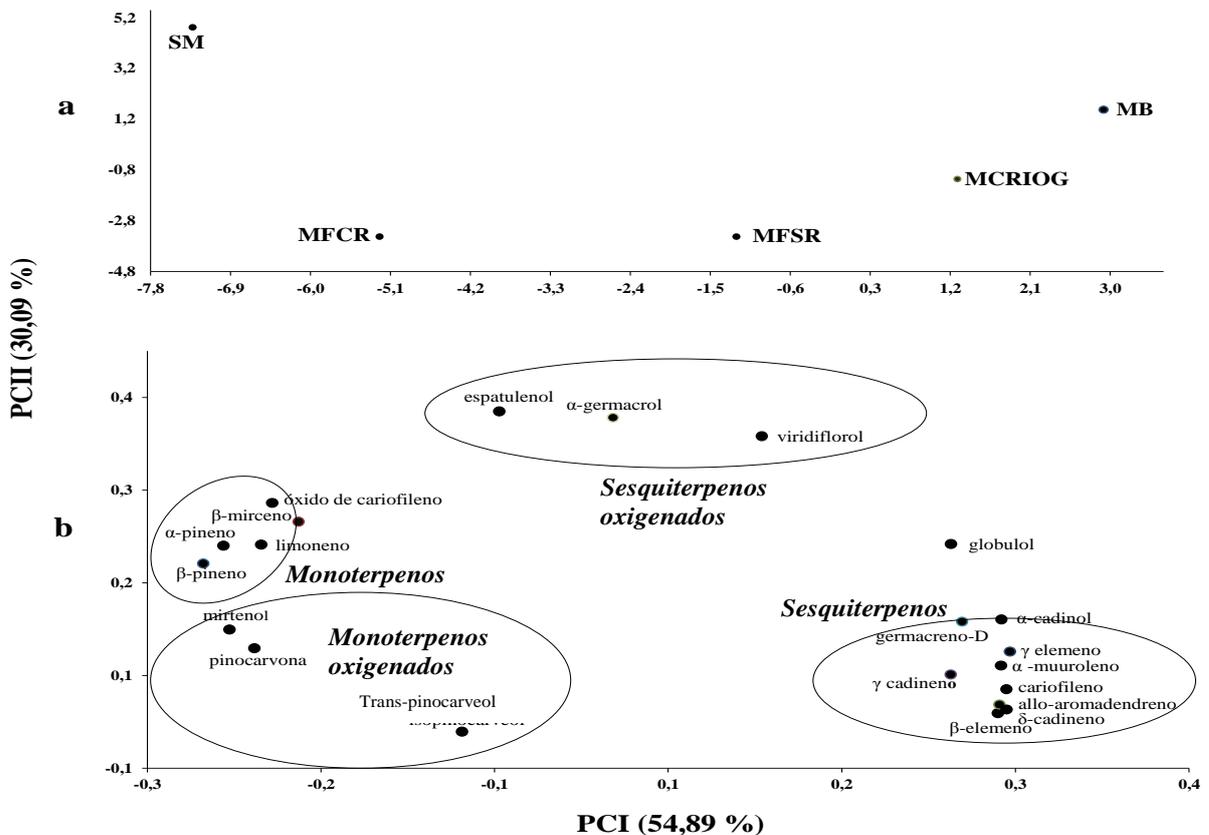


Figura 14: Análise de PCA para diferentes métodos de moagem (a);Escores (b): Pesos.

Legenda: SM (amostra não submetida a moagem em moinho/picada manualmente); MFCR: Moinho de facas com refrigeração; MFSR: Moinho de facas sem refrigeração; MB: Moinho de Bolas; MCRIOG: Moinho criogênico.

Assumindo que a moagem se faz necessária para melhor manuseio, armazenamento e extração, com este estudo foi possível verificar que a moagem exerce efeito sobre o volume e composição dos OES. Assim, se o objetivo é manter as características originais da planta, o MFCR pode ser recomendado por apresentar maior similaridade ao SM. Entretanto, se o objetivo é transformar ou alterar a composição relativa do OE, torna-se interessante utilizar os outros métodos de moagem, como MFSR e MB. Em relação à moagem criogênica, se faz necessário um estudo das condições de moagem (tempo de congelamento e tempo de moagem) que resulte em um material vegetal com maior tamanho de partícula e que proporcione um maior rendimento de OE. Para o preparo de amostra das demais etapas estudadas (secagem, extração, atmosfera na extração) optou-se pela moagem em MFCR, devido a esta ter resultado em um material vegetal moído com OE de composição mais similar com a amostra SM.

4.2 Influência da secagem no OE de *B. articulata*

4.2.1 Caracterização do material vegetal

Para seleção do tempo de secagem para cada método, primeiramente, foi feita uma avaliação de diferentes tempos de secagem com o objetivo de verificar aquele que obtivesse umidade inferior a 12% (Figura 15), conforme preconizado como umidade máxima recomendada para carqueja (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

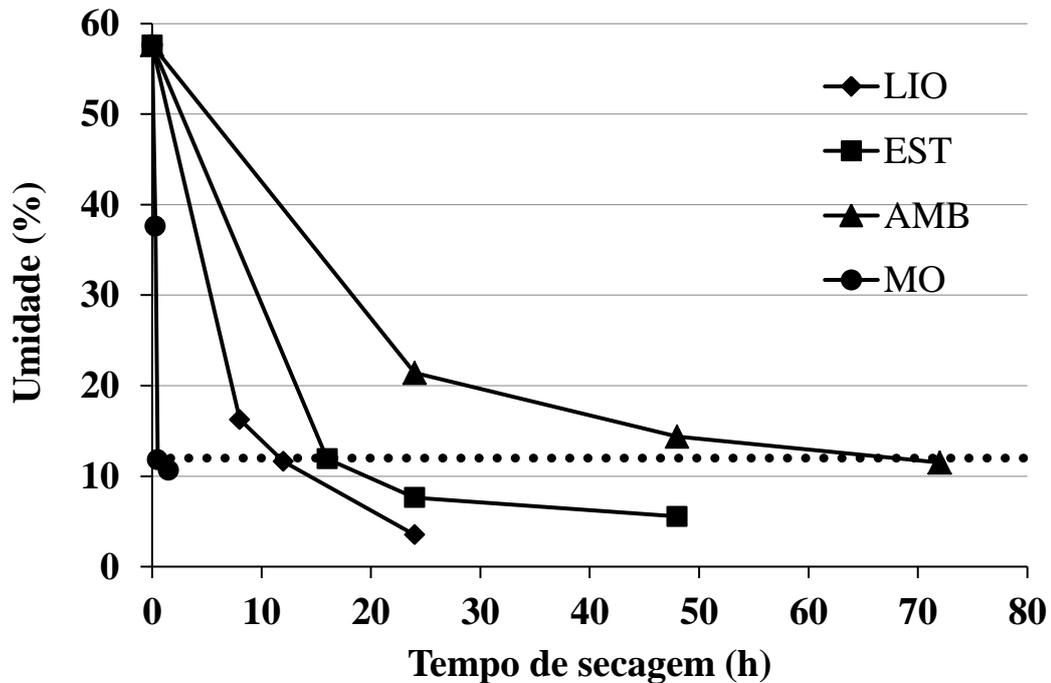


Figura 15: Avaliação do tempo de secagem por diferentes métodos. Linha Tracejada: representa o limite máximo de umidade recomendado pela Legislação Brasileira, 12%.

Legenda: LIO: Liofilização; EST: Estufa; AMB: Ambiente; MO: Micro-ondas.

O menor tempo necessário para atingir a umidade de 12% foi selecionado para os diferentes métodos de secagem, com o objetivo de minimizar as perdas de compostos voláteis durante essa etapa. Conforme mostrado na Tabela 7, para a secagem em temperatura ambiente foram necessárias 72 h de secagem, já para a secagem em MO foram necessários apenas 30 min para a amostra atingir 11,8% de umidade. Os maiores rendimentos de óleo essencial foram obtidos na amostra que não foi submetida à secagem, pois os constituintes voláteis aromáticos presentes nas plantas medicinais são os componentes mais sensíveis ao processo de secagem (VENSKUTONIS, 1997) e, provavelmente, houve perda destes compostos nos métodos estudados, diminuindo significativamente o rendimento do OE. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Omidbaigi et al. (2004), onde folhas de camomila secas em estufa apresentaram um rendimento de 0,4% e para a folhas *frescas* o rendimento obtido foi de 1,9%, resultando em uma perda significativa dos compostos ativos da amostra.

A planta seca por liofilização apresentou menores rendimentos de óleo essencial dentre todos os processos de secagem. Isso pode ser explicado pelo fato de que durante o congelamento pode ter ocorrido ruptura das estruturas que armazenam óleo essencial (tricomas glandulares e dutos secretores), os quais podem ter rompido e levado à perda de OE.

Após a ruptura dessas estruturas, a perda pode ter sido intensificada devido à utilização de baixa pressão durante o processo de liofilização, o que pode ter favorecido a volatilização dos compostos, principalmente os mais voláteis, tais como os monoterpenos.

Tabela 7 - Caracterização do material vegetal após a secagem por diferentes métodos (n=3).

Método	Tempo de secagem selecionado	Umidade (%)	Rendimento de OE (%)
IN/ <i>FRESCO</i>	-	57,6 ± 0,40	1,4 ± 0,04 ^a
AMB	72 h	11,5 ± 0,30	1,1 ± 0,03 ^b
LIO	36 h (24 h de congelamento)	11,6 ± 0,25	0,9 ± 0,02 ^c
EST	16 h	11,9 ± 0,22	1,1 ± 0,03 ^b
MO	0,5 h	11,8 ± 0,35	1,1 ± 0,03 ^b

Letras iguais não diferem entre si (p < 0,05) pelo teste Tukey.

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP).

Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

4.2.2 Composição do óleo essencial

Os compostos dos OEs de *B. articulata* submetida a diferentes métodos de secagem e extração por HD foram quantificados e identificados por cromatografia gasosa (GC-FID e GCMS). Foram quantificados todos os compostos que apresentaram área superior a 0,1% e nestes foi aplicada análise estatística verificando os que apresentaram diferença significativa (p < 0,05) em algum método de secagem. Das substâncias selecionadas 20 compostos mostraram diferenças significativas entre tratamentos (p < 0,05), conforme mostrado figura 16, o que correspondeu entre 92,7 e 95,6 de área total do cromatograma (Tabela 8), dependendo do método de secagem utilizado.

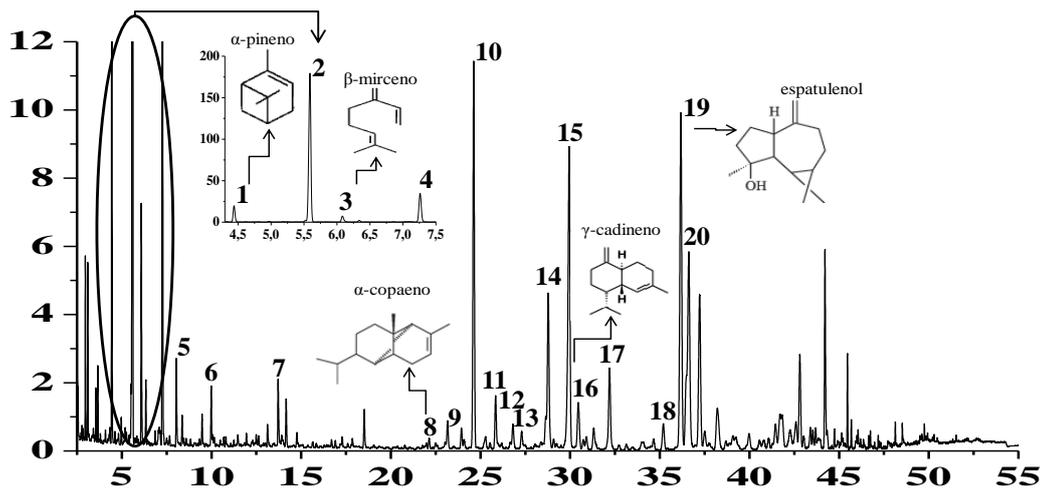


Figura 16: Cromatograma do OE obtido pelo GC-FID da planta IN indicando os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação aos OEs obtidos por diferentes métodos de secagem; Zoom do cromatograma do tempo 4,5 à 7,5 min para os picos com maior intensidade.

Conforme mostrado na Tabela 8, os hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos foram às classes mais representativas na composição do OE, variando de 58,6% a 81,0% e 6,5% a 28,4%, respectivamente. Os compostos oxigenados variaram de 0,4% a 0,6% e 8,7% a 12,8% para monoterpênicos e sesquiterpênicos, respectivamente. Os principais constituintes foram β - pineno, (E) - cariofileno, espatulenol, germacreno-D e biciclogermacreno.

Todos os OEs obtidos de amostras secas por diferentes métodos apresentaram redução de hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpênicos oxigenados e um aumento de sesquiterpênicos. Em comparação ao tratamento IN, a maior redução de monoterpênicos foi observada no óleo essencial obtido da planta seca por liofilização. Diaz-Maroto et al, (2002), estudaram a secagem de folhas (*Laurus nobilis*) por estufa à 45 °C e por liofilização, onde também verificaram que a liofilização causou redução de monoterpênicos. Monoterpênicos oxigenados e sesquiterpênicos oxigenados apresentaram redução em todos os tratamentos, porém com maior intensidade na secagem com MO e por liofilização. Cabezudo et al. (2003) observaram que na secagem de hortelã perdas significativas de compostos oxigenados ocorrem para plantas submetidas à liofilização. O estudo comparou secagem por liofilização, temperatura ambiente e por estufa a 45 °C, onde foi observado que as secagens em estufa e em temperatura ambiente proporcionaram maior preservação dos compostos oxigenados e também as características sensoriais da hortelã. A secagem a temperatura ambiente preservou

mais os compostos voláteis oxigenados de salsa (*Petroselinum crispum* L.) do que a secagem em estufa à 45 °C e por liofilização (DIAZ-MAROTO et al, 2002). Feng et al, (1999) verificaram perdas significativas de monoterpenos oxigenados de mirtilo (*Vaccinium spp.*) na secagem por liofilização, incluindo o 1,8 - cineol e também alterações no aroma.

Nesse trabalho, os compostos oxigenados apresentaram maiores perdas na secagem com micro-ondas, provavelmente devido ao fato de compostos oxigenados poderem absorver MO, devido à presença de dipolos, que podem interagir com a radiação. Assim estes compostos podem ter atingido energia cinética maior e podem ter sido volatizados durante a secagem em maior proporção quando comparados com os compostos não oxigenados. Trans-pinocarveol provavelmente foi formado ou concentrado durante o processo, porém em menor intensidade por MO.

Hidrocarbonetos sesquiterpênicos apresentaram uma concentração em todos os métodos de secagem, porém em maior proporção em EST, AMB E LIO. A secagem em estufa utilizou temperaturas amenas, porém por maior tempo de processamento, e essa exposição pode ter ocasionado transformações como a perda de monoterpenos e a transformação ou concentração de sesquiterpenos. O mesmo pode ter ocorrido para a liofilização, onde as diversas etapas de secagem podem ter levado a perdas de monoterpenos e concentração dos demais compostos.

A secagem ambiente foi conduzida por três dias, o que pode ter favorecido a alteração da composição da amostra. A secagem com MO, por ter tido o menor tempo de aquecimento, provavelmente não permitiu que maiores modificações acontecessem na amostra. Huopalahti et al, (1985) verificaram que a secagem de endro (*Anethum graveolens*) em estufa à 80 °C e por liofilização causaram a perda de cerca de 80% do principal componente responsável pelo aroma (benzofuranóide). Cerca de 50% das substâncias encontradas no OE após a secagem resultaram de transformações oriundas do processamento (compostos secundários).

Em geral as maiores modificações na composição da amostra em relação à planta *fresca* ocorreram no OE obtido da planta seca em liofilização, seguido de estufa e temperatura ambiente. Estes métodos de secagem afetam os compostos voláteis de plantas, e frequentemente estas mudanças são significativas formando compostos secundários e/ou de degradação (ABASCAL et al, 2005).

Tabela 8 - Composição química do óleo essencial (%) de *B. articulata* submetida a cinco métodos de secagem diferentes.

Compostos voláteis	IK GC-FID	IK GCMS	IK LIT	Método de secagem				
				IN	AMB	LIO	EST	MO
<i>Monoterpenos</i>								
1 α -pineno	934	935	934	1,7 ^{ab}	0,6 ^c	0,5 ^c	0,7 ^c	1,1 ^b
2 β -pineno	975	977	979	19,8 ^a	6,0 ^d	4,4 ^e	7,8 ^c	13,4 ^b
3 β -mirceno	992	992	992	1,2 ^a	0,4 ^c	0,3 ^d	0,4 ^c	0,9 ^b
4 limoneno	1028	1029	1029	5,2 ^a	1,5 ^{cd}	1,1 ^d	1,5 ^{cd}	3,4 ^b
5 β -ocimeno	1051	1051	1050	0,5 ^a	0,2 ^d	0,2 ^d	0,3 ^c	0,4 ^b
Total				28,4 ^a	8,7 ^d	6,5 ^d	10,7 ^c	19,2 ^b
<i>Monoterpenos oxigenados</i>								
6 trans-pinocarveol	1138	1138	1139	0,1 ^c	0,3 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,2 ^b
7 α -terpineol	1190	1189	1185	0,5 ^a	0,2 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b	0,2 ^b
Total				0,6 ^a	0,5 ^b	0,5 ^b	0,5 ^b	0,4 ^c
<i>Sesquiterpenos</i>								
8 α -copaeno	1369	1369	1378	1,1 ^b	0,7 ^d	1,2 ^a	1,3 ^a	0,9 ^{cd}
9 (E)-Cariofileno	1410	1410	1414	17,1 ^d	19,3 ^b	21,5 ^a	21,7 ^a	18,9 ^c
10 aromadendreno	1429	1429	1438	1,8 ^c	1,9 ^c	2,0 ^{bc}	2,8 ^a	2,0 ^{bc}
11 α -humuleno	1443	1443	1467	0,9 ^c	1,0 ^b	1,1 ^a	1,0 ^b	0,9 ^c
12 allo-aromadendreno	1451	1450	1452	0,5 ^c	0,6 ^b	0,7 ^a	0,7 ^a	0,6 ^b
13 germacreno-D	1471	1471	1480	11,5 ^e	20,6 ^a	17,9 ^{bc}	15,9 ^d	14,9 ^c
14 biciclogermacreno	1487	1486	1486	17,3 ^c	23,6 ^a	24,0 ^a	21,1 ^b	21,3 ^b
15 α -muuroleno	1494	1492	1499	2,7 ^d	3,6 ^a	3,8 ^a	3,5 ^{bc}	3,2 ^c
16 γ -cadineno	1503	1504	1512	1,1 ^d	1,3 ^c	1,7 ^b	1,8 ^a	1,4 ^c
17 δ -cadineno	1511	1519	1519	0,9 ^d	1,1 ^c	1,5 ^b	1,6 ^a	1,2 ^c
18 α -cadineno	1534	1532	1534	3,7 ^c	4,3 ^b	5,6 ^a	5,8 ^a	4,4 ^b
Total				58,6 ^c	78,0 ^a	81,0 ^a	77,2 ^a	69,7 ^b
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>								
19 espatulenol	1562	1572	1575	8,6 ^c	9,5 ^a	8,1 ^d	9,0 ^b	5,6 ^e
20 globulol	1568	1580	1584	3,8 ^a	3,3 ^c	3,9 ^a	3,6 ^b	3,1 ^d
Total				12,4 ^{bc}	12,8 ^{ab}	12,0 ^c	12,6 ^{bc}	8,7 ^d
Total da composição (%)				92,7	94,3	94,3	94,5	95,2

Letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

Como citado anteriormente, monoterpenos apresentaram redução durante todos os processos de secagem, compostos oxigenados tiveram redução principalmente com MO e sesquiterpenos tiveram incrementos na concentração em todos os processos de secagem, as diferenças são mostradas na figura 17. A figura 18 mostra os cromatogramas dos OEs obtidos por diferentes métodos de secagem, que apresentaram perdas para β – pineno (a) e espatulenol (c) e aumento de germacreno-D (b), os quais fazem parte das classes dos monoterpenos, sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos, respectivamente.

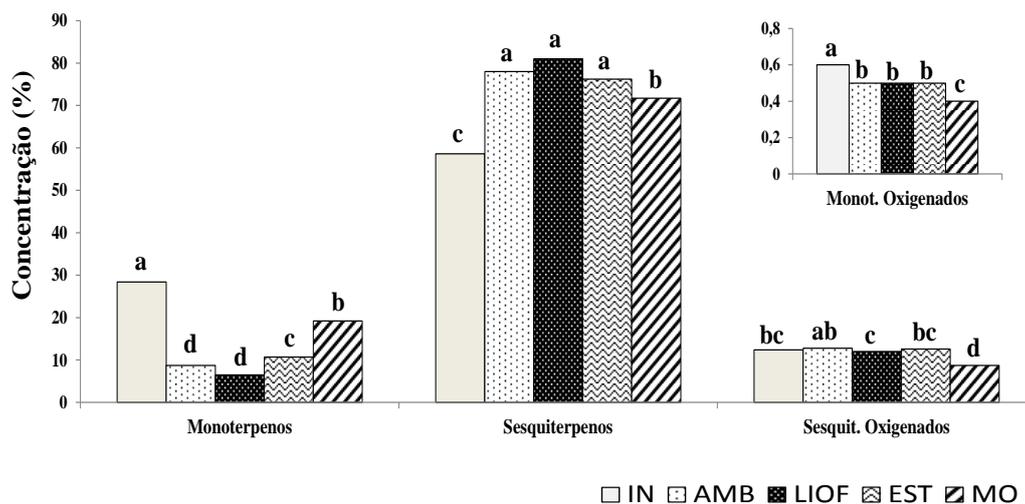


Figura 17: Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados para óleo essencial de *B. articulata* submetida a diferentes métodos de secagem. * Letras iguais não diferem entre si.

Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

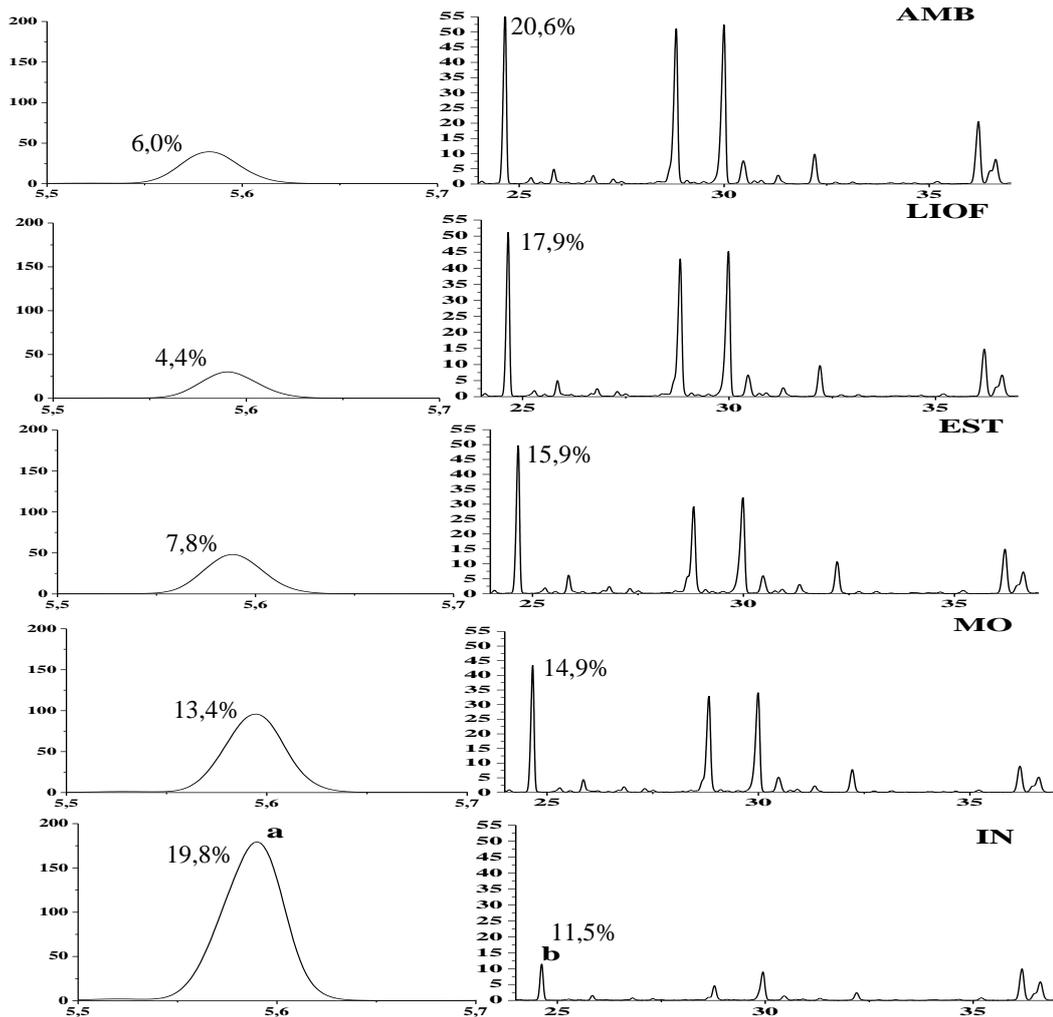


Figura 18: Porções selecionadas dos cromatogramas obtidos por GC-FID dos OEs de plantas secas por diferentes métodos para visualização de alterações na concentração dos compostos. Pico a = β -pineno, b = germacreno-D.

Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

Para melhor entendimento das similaridades entre os processos, foi aplicada a PCA, (Figura 19), para a composição normalizada das 20 variáveis analíticas (compostos voláteis) e 5 objetos (tratamentos). Duas componentes foram extraídas, explicando 84,97% dos dados.

O método de secagem que apresentou perfil similar com a amostra *fresca* foi o MO. Hidrocarbonetos monoterpênicos foram mais relacionados com os tratamentos IN e MO, já compostos oxigenados estão relacionados com os demais tratamentos. Hidrocarbonetos sesquiterpênicos estão fortemente relacionados aos tratamentos AMB, EST e LIO, que proporcionaram as maiores alterações.

Para escolha de método que proporcione uma composição similar a da amostra *fresca* pode-se optar pela secagem com MO, mantendo as características originais da planta. Porém, se o objetivo é obter compostos que através do processamento por LIO, EST e AMB possam ser concentrados, se torna interessante usar estes métodos. Para o preparo de amostra utilizado para avaliação da influência da extração, optou-se a secagem em MO, devido a esta ter fornecido OE com composição similar a IN, e o objetivo foi preparar uma amostra com as menores modificações possíveis em relação à amostra “original” para verificar o efeito da extração e da injeção dos gases.

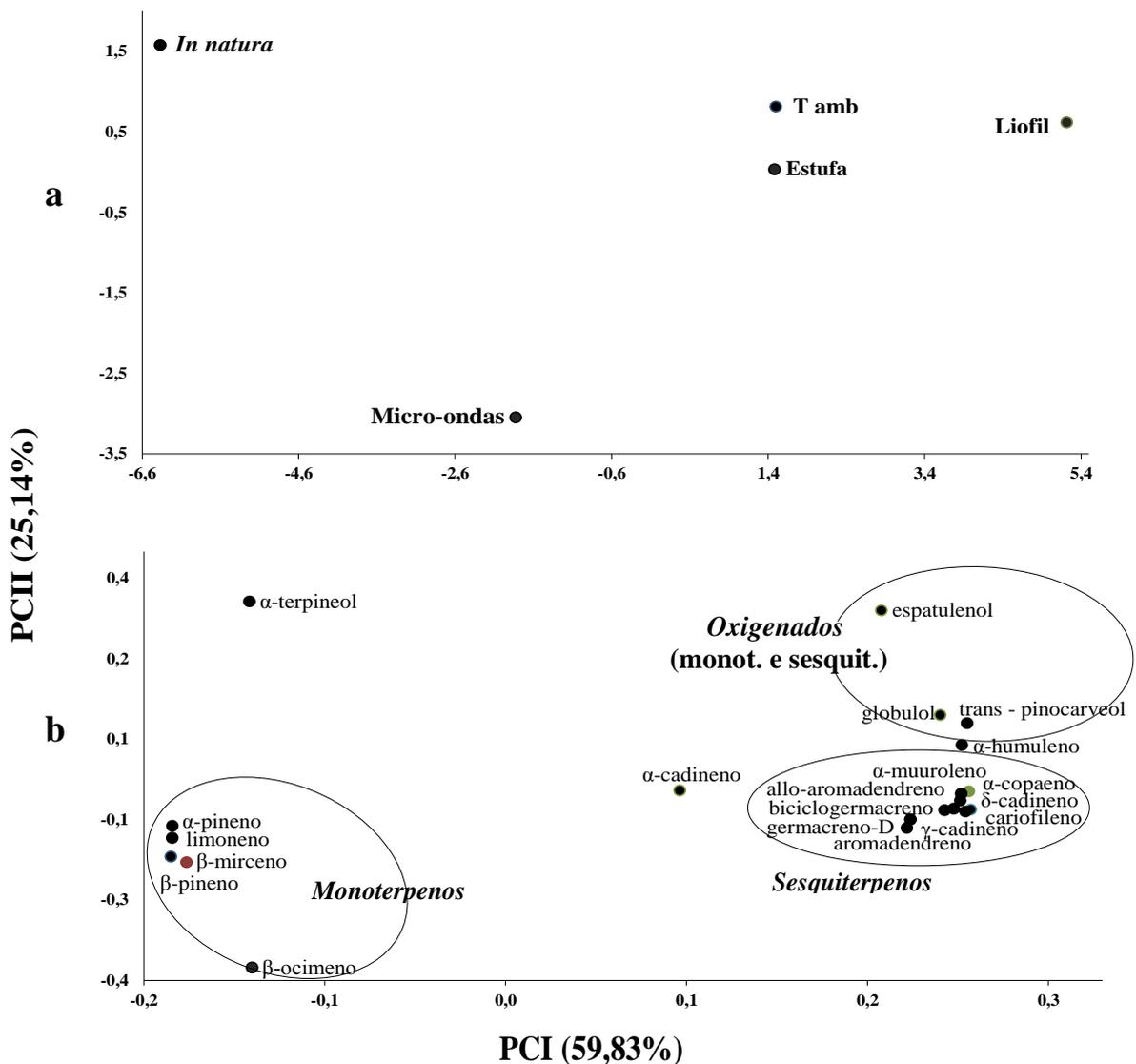


Figura 19: Análise de PCA para diferentes métodos de secagem (a); Escores (b): Pesos.
 Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

4.2.3 Atividade antioxidante

Na tabela 9 estão mostradas os resultados para atividade antioxidante (DPPH) do OE de *B. articulata*, submetida a diferentes métodos de secagem e para BHT e Trolox, e o IAA (Índice de Atividade Antioxidante), onde as amostras são classificadas conforme: (IAA < 0,5), moderado (0,5 < IAA < 1,0), forte (1,0 < IAA < 2,0) e muito forte (IAA > 2,0) (SCHERER e GODOY, 2009).

A amostra *fresca* apresentou atividade antioxidante inferior em relação aos métodos de secagem estudados. O OE obtido de carqueja seca em estufa foi o que apresentou maior atividade antioxidante, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) que os demais métodos de secagem. A amostra submetida à secagem em MO teve menor capacidade antioxidante em relação às demais, isso pode ser devido a menor quantidade de compostos oxigenados. Em relação ao IAA todos os métodos de secagem apresentaram um índice moderado. Esses valores de atividade antioxidante podem ser considerados importantes, uma vez que são mais elevados do que aqueles observados para outras plantas, como os OEs de sementes de aipo, citronela, salsa e, que apresentaram valores de 10,04; 1,18; 7,23 mg mL⁻¹, respectivamente. Entretanto, o EC 50 dos OEs obtidos da carqueja foram inferiores ao do tomilho cravo e orégano que foram de 0,25, 0,04 e 0,05, respectivamente Teixeira et al, (2013). Sartor et al (2013) verificaram atividade antioxidante de OEs de *Baccharis dentata*, a qual apresentou valores de EC50 em torno de 2,30 mg mL⁻¹, valor próximo ao obtido nesse estudo para o OE da planta fresca.

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos OEs obtidos de plantas secas por diferentes métodos, expressa em concentração eficiente (EC50) e Índice de Atividade Antioxidante (IAA) (n=3).

Método de Secagem	DPPH		IAA
	EC50 (mg ml ⁻¹)		
IN/FRESCO	2,450 ± 0,03 ^c		0,040 ± 0,001 ^c
MO	1,216 ± 0,02 ^b		0,192 ± 0,01 ^b
EST	0,992 ± 0,01 ^b		0,242 ± 0,02 ^b
LIOF	1,266 ± 0,02 ^b		0,190 ± 0,01 ^b
AMB	1,257 ± 0,02 ^b		0,191 ± 0,01 ^b
BHT	0,003 ± 0,00 ^a		69,220 ± 0,5 ^a
TROLOX	0,006 ± 0,00 ^a		39,560 ± 0,3 ^a

Letras iguais não diferem entre si (p <0,05) pelo teste de Tukey.

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP).

Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

Em relação à capacidade redutora do ferro (Figura 20), a qual está apresentada em mg de óleo equivalentes a mg de Trolox, os tratamentos que apresentaram menores quantidades de óleo equivalentes para ter o mesmo efeito que 1 mg de Trolox foram estufa e MO ($66,14 \pm 1,12$ e $73,75 \pm 1,87$ mg óleo mg Trolox⁻¹), seguidos de secagem em ambiente ($106,03 \pm 1,98$ mg óleo mg Trolox⁻¹), liofilização ($118,28 \pm 2,09$), e o óleo extraído da planta fresca foi o que apresentou menor capacidade redutora de ferro ($253,92 \pm 2,13$ mg óleo mg Trolox⁻¹).

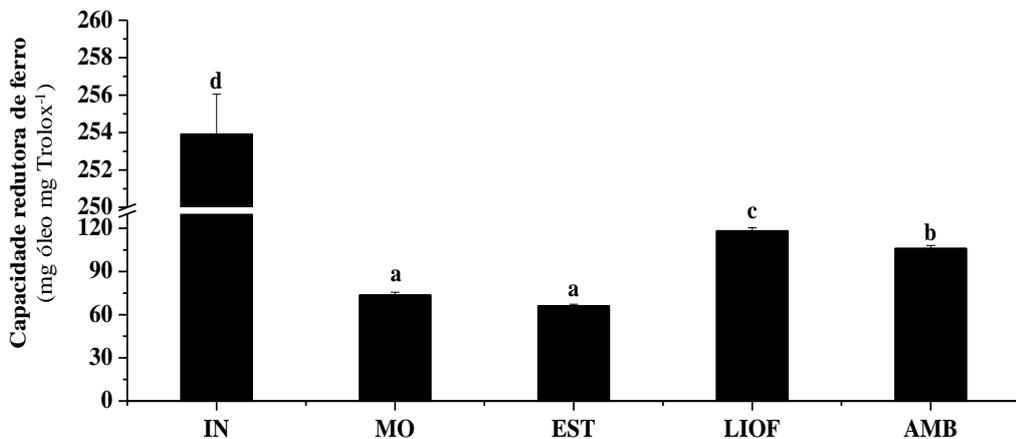


Figura 20: Capacidade redutora de ferro (FRAP) para óleo essencial de *B. articulata* submetida a diferentes métodos de secagem.

Legenda: IN/Fresco (*In natura*); AMB: Ambiente LIO: Liofilização; EST: Estufa; MO: Micro-ondas.

Nos dois métodos de avaliação de atividade antioxidante (DPPH e FRAP), o OE extraído do material vegetal fresco apresentou menor atividade antioxidante do que os demais métodos de secagem avaliados neste estudo. Estes resultados mostram que além da influência dos compostos oxigenados no potencial antioxidante, os compostos sesquiterpênicos, que são encontrados em maior quantidade nos OEs obtidos de plantas secas, podem também ter contribuído para tal atividade. Os resultados obtidos por DPPH não mostraram diferença significativa entre as atividades antioxidantes dos OEs obtidos por diferentes métodos de secagem, enquanto que pelo método FRAP foi possível fazer esta distinção entre os métodos. Os OEs obtidos de plantas secas por MO e EST apresentaram as maiores capacidades de redução de ferro, seguidos da liofilização e ambiente.

4.3 Influência do método de extração no OE de *B. articulata*

4.3.1 Rendimento e tempo de extração do óleo essencial

O rendimento de óleo essencial obtido por HD e SFME foi de 0,5%. A planta foi extraída nos dois métodos de extração até a liberação total de OE. Uma das vantagens da extração utilizando a energia MO é a rapidez da extração do OE. Para ambas as extrações a temperatura é equivalente à temperatura de ebulição da água a pressão atmosférica (100 °C). Para a extração de mesmas quantidades de OE são necessários apenas 45 min utilizando a SFME, já com aquecimento convencional são necessários 240 min, conforme mostrado na figura 21. Esses resultados estão de acordo com os relatados na literatura, como no estudo de extração de OEs de flores de lavanda (*L. angustifolia* Mill), onde na extração por HD foram necessárias 2 h, já para SFME 30 min (CHEMAT ET AL, 2006). No estudo de obtenção de OEs de *R. officinalis*, OKOH et al, 2010 obteve o máximo rendimento de OEs de por SFME em 40 min, já por HD foram necessárias 3 h de extração. Li et al, 2012 obteve tempos de extração de OEs de *Dryopteris fragans* (L.) de 34 min e 5 h para SFME e HD respectivamente.

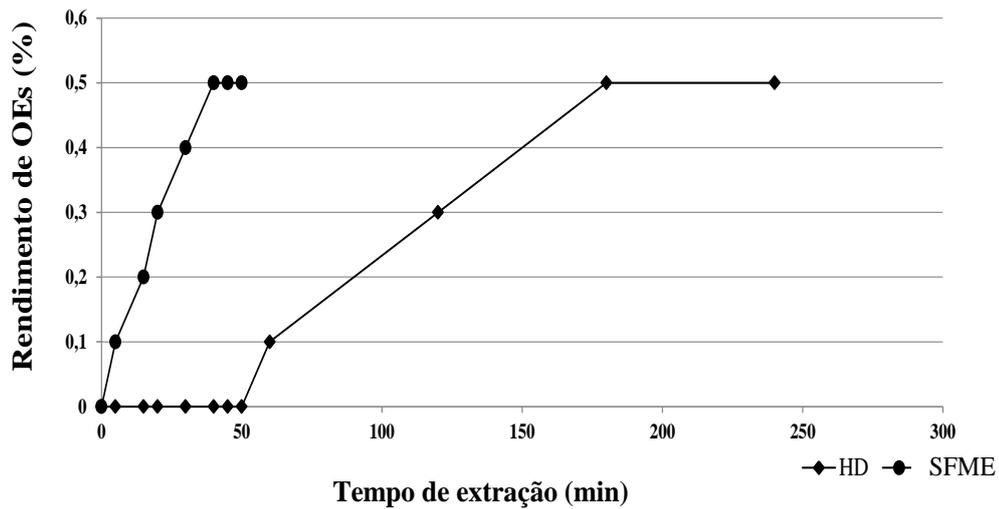


Figura 21: Rendimento do OE em função do tempo de extração.

4.3.2 Composição do óleo essencial

Conforme apresentando na tabela 10, a extração por SFME proporcionou a obtenção de OEs com maiores concentrações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados, ao contrário da HD, onde maiores concentrações de hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram encontradas nos OEs.

Esses resultados estão de acordo com o observado por Okoh et al. (2010), que estudaram extrações de OE por SFME e HD de *Rosmarinus officinalis* L., tendo encontrado maiores quantidades de compostos oxigenados por SFME. Provavelmente esta maior concentração destes compostos por SFME se dê devido ao menor gradiente de temperatura e menores efeitos hidrolíticos quando comparados com HD, a qual usa maiores volumes de solvente e longo tempo de extração. (LUCCHESI ET AL, 2004). Assim, pode-se inferir que a irradiação com MO acelera o processo de extração, diminuindo as alterações nos compostos voláteis (PARE e BELANGER, 1997). Conforme Okoh et al. (2010), o OE obtido pela extração por SFME apresentou maior atividade contra micro-organismos que o óleo obtido por HD. Li et al (2012) verificaram maior atividade antioxidante para OE obtido por MO. Este fato pode ter ocorrido pela maior quantidade de compostos oxigenados no OE obtido por SFME. Na comparação de métodos de extração de OEs de *Dryopteris fragans*, Li et al (2012) verificaram maiores quantidades de hidrocarbonetos sesquiterpênicos na HD.

Ferhat et al, (2007) verificou maiores quantidades de sesquiterpenos oxigenados na extração por SFME.

Tabela 10 - Composição química do óleo essencial (compostos que apresentaram diferença significativa pelo teste t) (%) - de *B. articulata* submetido à extração com aquecimento convencional e com micro-ondas (n=3).

Compostos voláteis	IK	IK	IK	Extração	
	GC-FID	GCMS	LIT	HD	SFME
<i>Monoterpenos</i>					
1 α -pineno	932	935	934	0,24	0,40
2 β -pineno	972	974	973	0,46	0,57
3 limoneno	1023	1025	1027	1,92	2,07
Total				2,62	3,04
<i>Monoterpenos oxigenados</i>					
4 trans-pinocarveol	1140	1135	1139	0,20	0,43
5 pinocarvona	1162	1163	1163	0,12	0,17
6 terpinen-4-ol	1189	1178	1177	0,22	0,40
7 mirtenol	1194	1194	1194	0,15	0,20
8 eugenol	1352	1355	1351	0,15	0,18
Total				0,99	1,64
<i>Sesquiterpenos</i>					
9 α -copaeno	1363	1366	1375	0,29	0,33
10 β -borboneno	1368	1374	1380	0,56	0,83
11 β -elemeno	1379	1381	1375	19,10	23,89
12 (E) Cariofileno	1411	1410	1414	0,85	0,93
13 β -cubebeno	1421	1419	1390	0,60	0,42
14 aromadendreno	1432	1432	1438	2,58	3,14
15 α -humuleno	1445	1446	1442	0,31	0,48
16 allo-aromadendreno	1452	1450	1452	27,04	25,45
17 Germacreno-D	1475	1478	1487	19,70	14,85
18 biciclogermacreno	1491	1489	1486	3,90	2,66
19 α -muuroleno	1494	1493	1499	0,94	0,73
20 dehidro-aromadendreno	1501	1490	1456	0,80	0,56
21 γ -cadineno	1508	1504	1512	2,48	0,62
22 δ -cadineno	1515	1516	1524	0,29	0,33
Total				79,16	74,88
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>					

23 ledol	1558	1559	1563	0,50	1,14
24 espatulenol	1571	1574	1575	7,58	9,93
25 óxido de cariofileno	1573	1576	1573	2,48	2,14
26 globulol	1575	1573	1576	1,82	1,86
27 viridiflorol	1583	1585	1590	3,55	3,44
28 Biciclo [7.2.0] undecan-3-ol	1635	1634	1639	0,17	0,27
29 α -elemol	1652	1645	1639	0,36	0,71
30 Cadin-4-en-10-ol	1658	1654	1646	0,61	0,68
31 Muurola-4,10(14)-dien-1-beta-ol	1672	1678	1686	0,15	0,26
Total				17,23	20,44
Total da composição (%)				93,43	92,09

*Compostos que apresentaram diferença significativa pelo teste t.

Legenda: HD: Hidrodestilação SFME: Extração assistida por micro-ondas sem solvente

Conforme mostrado na figura 22, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) para monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados (em maior quantidade no OE obtido por SFME) e para hidrocarbonetos sesquiterpênicos (em maior quantidade no OE obtido por HD). Este estudo confirmou as diferenças relatadas em estudos de comparação entre os métodos de extração. Como citado, o OE obtido por SFME resulta em um produto com maior atividade biológica que o OE obtido pela extração convencional, porém, pouca informação é encontrada na literatura acerca das razões que podem levar a tal diferença. Assim, outras variáveis não controladas durante a extração, como por exemplo, a composição dos gases da atmosfera, pode ter influenciado nesse processo.

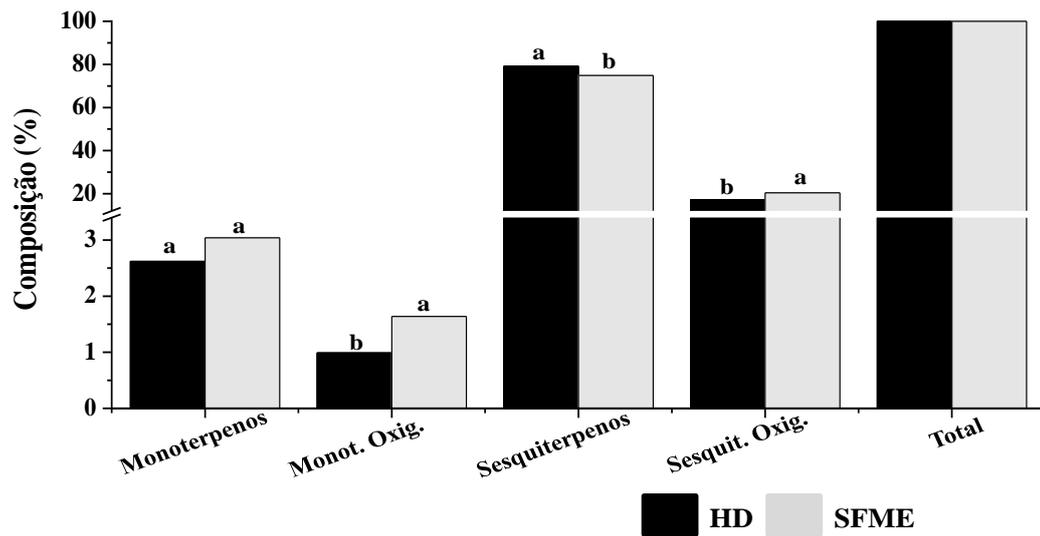


Figura 22: Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados para óleo essencial de *B. articulata* extraída por SFME e por HD. * Letras iguais não diferem entre si pelo teste t.

Legenda: HD: Hidrodestilação SFME: Extração assistida por micro-ondas sem solvente

Além da obtenção de OEs com maior quantidade de compostos oxigenada sendo assim com maior atividade biológica, a SFME apresenta outras vantagens frente à HD. Em geral a energia necessária para a extração por HD e SFME são 4,5 kWh e 0,25 kWh, respectivamente, o que faz com que haja uma economia de energia de até 18 vezes com o uso da SFME. Se o consumo de energia for transformado em quantidades de dióxido de carbono liberados para o ambiente, os resultados ficariam em torno de 3600 g CO₂ gOE⁻¹ para HD e 200 g CO₂ g OE⁻¹ para SFME (LUCCHESI et al, 2004). Além disso, enquanto a HD necessita de 500 mL de água a extração, a SFME necessita de apenas 10 mL de água apenas para umedecer a planta.

4.4 Influência da Atmosfera na Extração do OE por SFME de *B. articulata*

4.4.1 Rendimento de óleo essencial e composição do óleo essencial

O rendimento de óleo essencial obtido pela extração por SFME com injeção de oxigênio, argônio e ar sintético foi de 0,5%, não havendo diferença entre os tratamentos. A planta foi extraída nos dois métodos de extração até a liberação total de OE. Para ambas as extrações a temperatura é equivalente à temperatura de ebulição da água a pressão atmosférica (100 °C). Conforme apresentando na tabela 11, cerca de 30 compostos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à atmosfera da extração e os mesmos estão mostrados na figura 23.

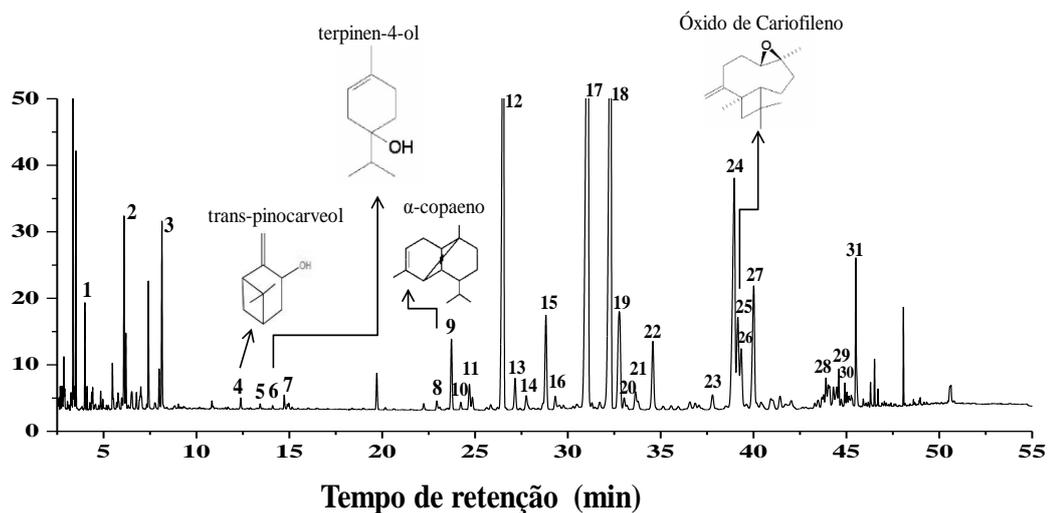


Figura 23: Cromatograma do OE obtido no GC-FID indicando os compostos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação aos OEs obtidos em diferentes atmosferas na extração.

Conforme mostrado na Tabela 11, monoterpêneos apresentaram maiores concentrações na injeção de AR SINT, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) para o OE obtido com injeção de O₂. Em relação aos monoterpêneos oxigenados, a injeção de O₂ e AR SINT proporcionaram concentrações de trans-pinocarveol quatro vezes maior que na injeção de N₂.

Sesquiterpenos apresentaram maiores concentrações no OE submetido à injeção de AR SINT, e menores concentrações com O₂, já sesquiterpenos oxigenados apresentaram maiores concentrações na injeção com O₂. As diferenças das classes de compostos estão mostradas na figura 24.

Tabela 11- Composição química do óleo essencial (%) de *B. articulata* submetida à injeção de gases durante a extração pelo método SFME (n=3).

Compostos voláteis	RT	RT	RT	Gás injetado (SFME)		
	GC-FID	GCMS	LIT	O ₂	AR SINT	Ar
<i>Monoterpenos</i>						
1 α -pineno	931	935	934	0,23 ^{ab}	0,18 ^b	0,31 ^a
2 β -pineno	971	976	973	2,01 ^{ab}	2,44 ^a	1,75 ^b
3 limoneno	1020	1029	1027	1,11 ^a	1,18 ^a	0,89 ^b
Total				3,35 ^a	3,81 ^a	2,95 ^b
<i>Monoterpenos oxigenados</i>						
4 trans-pinocarveol	1139	1138	1139	0,19 ^a	0,20 ^a	0,05 ^b
5 pinocarvona	1164	1162	1163	0,09 ^a	0,11 ^a	0,12 ^a
6 terpinen-4-ol	1191	1177	1177	0,20 ^a	0,21 ^a	0,22 ^a
7 mirtenol	1194	1194	1194	0,07 ^a	0,10 ^a	0,09 ^a
8 eugenol	1350	1354	1351	0,19 ^a	0,17 ^a	0,19 ^a
Total				0,76 ^a	0,78 ^a	0,67 ^b
<i>Sesquiterpenos</i>						
9 α -copaeno	1361	1369	1375	1,50 ^b	1,73 ^a	1,62 ^{ab}
10 β -borboneno	1368	1377	1380	0,16 ^b	0,17 ^b	0,20 ^a
11 β -elemeno	1377	1386	1375	0,28 ^a	0,30 ^a	0,31 ^a
12 (E) Cariofileno	1413	1411	1414	16,85 ^c	18,42 ^{ab}	17,64 ^{bc}
13 β -cubebeno	1422	1420	1390	0,82 ^a	0,83 ^a	0,80 ^a
14 aromadendreno	1431	1429	1438	0,48 ^a	0,47 ^a	0,48 ^a
15 α -humuleno	1445	1444	1442	2,55 ^c	2,67 ^{ab}	2,64 ^b
16 allo-aromadendreno	1452	1451	1452	0,39 ^a	0,38 ^a	0,38 ^a
17 Germacreno-D	1475	1473	1487	25,22 ^b	26,33 ^a	25,70 ^b
18 biciclogermacreno	1490	1488	1486	19,86 ^b	20,22 ^a	20,42 ^a
19 α -muuroleno	1495	1493	1499	3,90 ^b	4,03 ^a	4,04 ^a
20 dehidro-aromadendreno	1500	1497	1456	0,13 ^b	0,33 ^a	0,33 ^a
21 γ -cadineno	1506	1504	1512	0,74 ^a	0,52 ^b	0,23 ^c
22 δ -cadineno	1518	1517	1524	2,13 ^a	1,95 ^b	2,08 ^a
Total				75,01 ^c	78,32 ^{ab}	76,86 ^{bc}

<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>						
23 ledol	1556	1559	1563	0,53 ^a	0,49 ^a	0,52 ^a
24 espatulenol	1569	1572	1575	9,20 ^a	7,46 ^b	8,35 ^{ab}
25 óxido de cariofileno	1571	1575	1573	3,07 ^a	2,72 ^b	2,90 ^{ab}
26 globulol	1573	1578	1576	2,14 ^a	1,64 ^b	1,72 ^b
27 viridiflorol	1581	1585	1590	4,15 ^a	3,60 ^b	3,98 ^a
28 Biciclo [7.2.0] undecan-3-ol	1636	1633	1639	0,27 ^a	0,20 ^a	0,23 ^a
29 α -elemol	1653	1649	1639	0,54 ^a	0,41 ^b	0,48 ^{ab}
30 Cadin-4-en-10-ol	1659	1656	1646	0,64 ^a	0,49 ^b	0,57 ^{ab}
31 Muuro-la-4,10(14)-dien-1-beta-ol	1673	1678	1686	0,34 ^a	0,08 ^c	0,19 ^b
Total				20,88 ^a	17,09 ^b	18,94 ^{ab}
Total da composição (%)				90,7	91,2	89,3

Letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

Legenda: O₂: Oxigênio Ar: Argônio ARSINT: Ar sintético

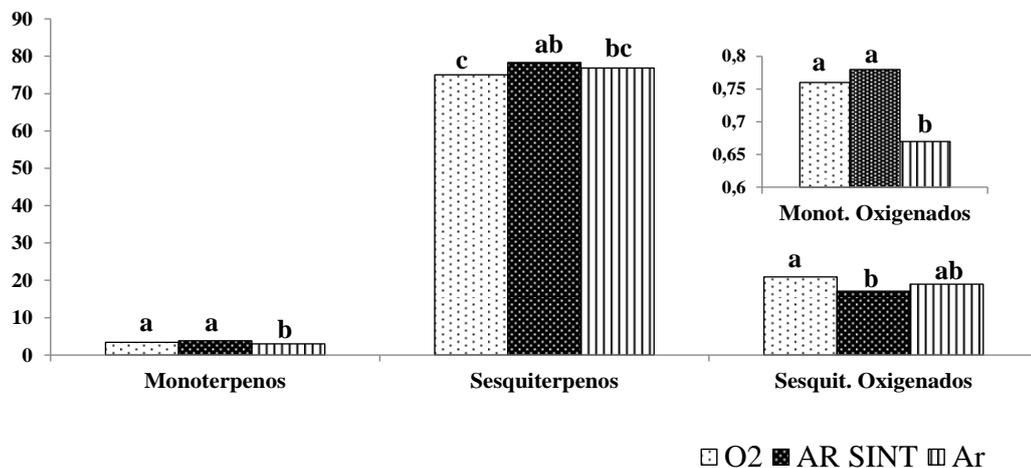


Figura 24: Variações de hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados para óleo essencial de *B. articulata* extraída por SFME submetida a injeção de diferentes gases. Letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

Legenda: O₂: Oxigênio Ar: Argônio ARSINT: Ar sintético

A injeção de ar sintético e oxigênio resultaram em quantidades de limoneno com diferença significativa em relação à injeção de argônio. Trans-pinocarveol apresentou quantidades superiores no OE submetido à injeção de O₂ e AR SINT quatro vezes maiores que para o OE submetido a injeção de argônio. Cariofileno- (E) e germacreno-D apresentaram

quantidades menores com diferença significativa no OE submetido a injeção de O₂ para a injeção com AR SINT, que proporcionou maiores quantidades de sesquiterpenos. Epatulenol, óxido de cariofileno, globulol, viridiflorol, α - elemol, cadin-4-en-10-ol e muuro-la-4,10(14)-dien-1-beta-ol apresentaram maiores concentrações no OE submetido a injeção de O₂ diferença significativa em relação a injeção de AR SINT.

Conforme Tryteka et al, 2011, na transformação ou degradação de pinenos, na presença de luz, pode ocorrer a formação de monoterpenóides, como de trans-pinocarveol, pinocarvona e mirtenal (Figura 25). Essa transformação ocorre na presença de luz, onde as clorofilas atuam absorvendo a energia luminosa necessária para esta transformação. Esta transformação é mostrada na figura 23. Levando em consideração que a extração tanto por HD quanto SFME ocorre em condições muito mais drásticas que somente a presença de luz, ou seja, há o envolvimento de altas temperaturas, transformações como esta podem acontecer mais facilmente, ainda mais quando a quantidade de oxigênio for aumentada.

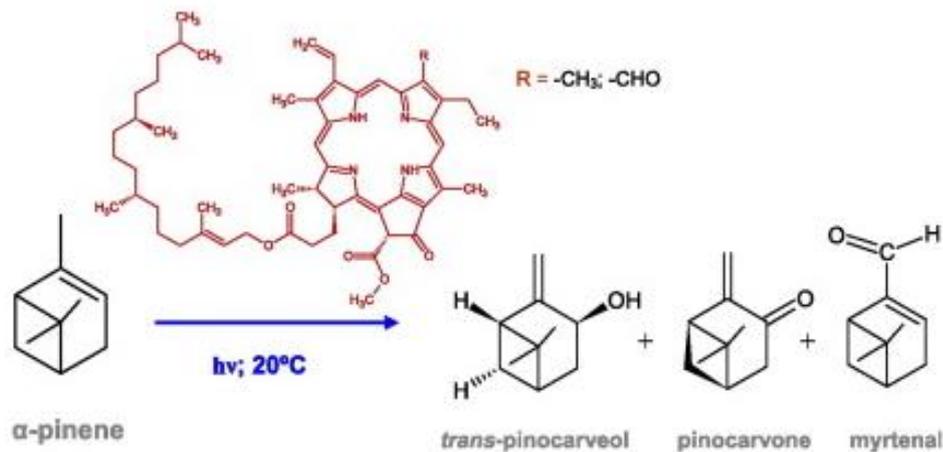


Figura 25: Compostos que podem ser formados a partir de α -pineno durante a transformação ou degradação.

4.4.2 Atividade antioxidante

Na tabela 12 estão mostradas os resultados para atividade antioxidante de *B. articulata* submetida a injeção de gases na extração por SFME e para BHT e Trolox, e o IAA (Índice de Atividade Antioxidante), onde as amostras são classificadas conforme: (AAI < 0,5),

moderado ($0,5 < \text{AAI} < 1,0$), forte ($1,0 < \text{AAI} < 2,0$) e muito forte ($\text{AAI} > 2,0$) (SCHERER e GODOY, 2009).

O OE obtido por extração por SFME e submetido a injeção de O_2 apresentou a maior atividade antioxidante do que os demais OEs, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) para a injeção com ar sintético. Assim, pode-se perceber que a injeção de oxigênio no balão contendo a amostra durante a extração pode levar à formação de um OE com maior atividade biológica, o que pode ser considerada uma vantagem. Porém, esse efeito pode ser ainda maior se vazões maiores desses gases forem utilizadas, podendo maximizar a concentração de compostos responsáveis pelas atividades biológicas do OE e, quem sabe, até mesmo aumentar o valor dos OEs de outras plantas que são comercializados.

Tabela 12- Atividade antioxidante expressa em concentração eficiente (EC50) e Índice de Atividade antioxidante.

Gás injetado	DPPH	IAA
	EC50 (mg ml^{-1})	
O_2	$0,787 \pm 0,03^b$	$0,304 \pm 0,04^b$
Ar sint	$0,812 \pm 0,03^{bc}$	$0,296 \pm 0,03^b$
Ar	$0,902 \pm 0,02^c$	$0,266 \pm 0,01^c$
BHT	$0,004 \pm 0,00^a$	$55,23 \pm 0,5^a$
TROLOX	$0,005 \pm 0,00^a$	$45,28 \pm 0,3^a$

Letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

Legenda: O_2 : Oxigênio Ar: Argônio Ar sint: Ar sintético

Em relação à capacidade redutora do ferro (Figura 26), a qual está apresentada em mg de óleo equivalentes a 1 mg de Trolox, a injeção de oxigênio foi a que proporcionou ao óleo uma maior capacidade redutora de ferro, seguida do ar sintético e argônio ($49,17 \pm 1,5$; $53,65 \pm 1,8$ e $74,13 \pm 1,8$ mg óleo mg Trolox⁻¹). Esses resultados corroboram aqueles obtidos pela avaliação da atividade antioxidante por DPPH, mostrando que a modificação da atmosfera durante a SFME pode ser um caminho para a obtenção de OEs com maior atividade biológica e conseqüentemente maior valor comercial.

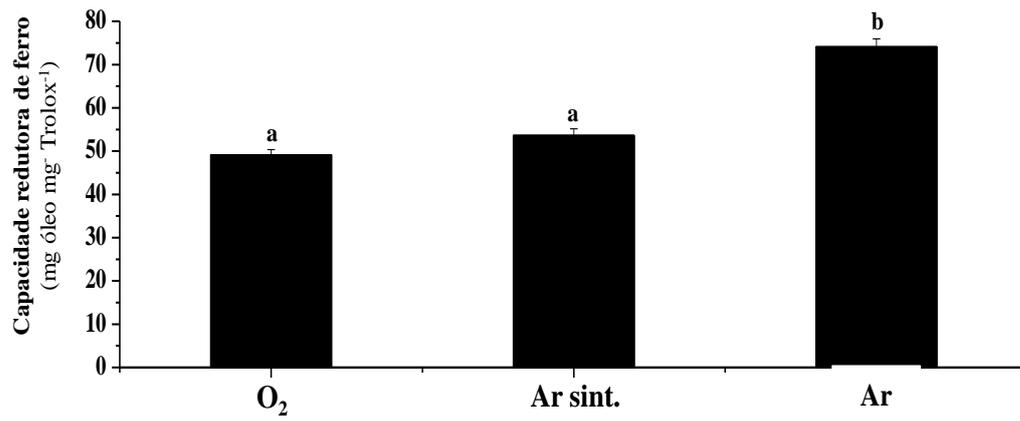


Figura 26: Capacidade redutora de ferro (FRAP) para óleo essencial de *B. articulata* submetido à injeção de diferentes gases durante a extração por micro-ondas.

Legenda: O₂: Oxigênio Ar: Argônio ARSINT: Ar sintético

5 CONCLUSÃO

Da moagem

- Menores rendimentos de OEs de *B. articulata* são obtidos a partir da planta submetida à moagem criogênica, devido às condições de moagem (congelamento da amostra e reduzido tamanho de partícula) resultantes, que levam ao rompimento mais acentuado de estruturas armazenadoras de OEs na planta (tricomas glandulares e dutos secretores).
- A PCA demonstrou uma separação da planta não submetida à moagem com relação as demais moídas, principalmente frente aos métodos de moagem que envolveram elevação da temperatura da amostra durante a moagem e longos períodos de processo e redução do tamanho de partícula. A amostra que apresentou maiores similaridades com a amostra não cominuída foi à moída em moinho de facas com refrigeração, a qual apresentou menor concentração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e menores perdas de monoterpenos.
- Se o objetivo for manter as características originais da planta, o MFCR pode ser recomendado por apresentar maior similaridade ao SM. Entretanto, se o objetivo for transformar ou alterar a composição do OE, torna-se interessante utilizar os outros métodos de moagem, como MFSR e MB.

Da secagem

- A secagem do mesmo material vegetal (com idênticas características iniciais) por diferentes métodos de secagem apresentou grandes diferenças no tempo de secagem, onde o MO apresentou os menores tempos e a secagem em temperatura ambiente os maiores.

- O material vegetal seco por liofilização apresentou menores rendimentos de OEs resultantes de plantas submetidas aos demais métodos de secagem.
- A PCA demonstrou uma separação entre o OEs da planta fresca e dos demais métodos de secagem, principalmente dos que envolveram exposição/manuseio da planta por maiores tempos. A secagem em micro-ondas foi a que apresentou a maior similaridade com a planta fresca, tendo tido as menores perdas de hidrocarbonetos monoterpênicos e os menores ganhos de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, tendo sido diferenciada da IN apenas pelo composto α -terpineol.
- A liofilização apresentou as maiores perdas de hidrocarbonetos monoterpênicos e a maior concentração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos que os demais métodos de secagem.
- A planta fresca apresenta os menores potenciais de atividade antioxidante, sendo que todos os métodos de secagem proporcionaram um incremento desta atividade.
- Sugere-se para escolha de método de secagem, se o objetivo for manter as características da planta fresca, a secagem com MO. Porém, se o objetivo é obter compostos que através do processamento por LIO, EST e AMB possam ser concentrados, se torna interessante usar estes métodos.

Da extração

- Extrações de OEs de *B. articulata* por SFME foram conduzidas em tempos reduzidos em relação a HD, que foi 5,33 vezes mais lenta que a SFME.
- A extração por SFME resultou em uma composição de OEs com maiores quantidades de monoterpênicos e monoterpênicos oxigenados e sesquiterpênicos oxigenados, já a HD resultou em um OE com maiores concentrações de hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Da atmosfera na extração por SFME

- A extração com a injeção de argônio resultou em menores quantidades de hidrocarbonetos monoterpênicos na composição dos OEs.
- A extração com O₂ proporcionou maiores quantidades de sesquiterpenos oxigenados na composição dos OEs.
- Maiores atividades antioxidantes foram observadas no OE obtido na extração por SFME com injeção de O₂.

REFERÊNCIAS

AKASOFU, S. I. (1989). **The dynamic aurora. Scientific American**, v. 260, n. 5, p. 54-63.

ALONSO, A. M. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5832-5836.

ARAUJO, J. M. A. (1999). **Química de Alimentos: teoria e prática**. Editora da Universidade Federal de Viçosa, n.2, p. 416.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. (2000). Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera*(Less.) DC. – Compositae, decocto, as desinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, p. 230-234.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMANA, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMEDA, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436.

BAHLOUL, N.; N.; BOUDHRIOUA, N.; KECHAOU. (2008). Moisture desorption-adsorption isotherms and isosteric heats of sorption of tunisian olive leaves (*Olea europaea* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 2, p. 162–176.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. U.; KANG, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722–734.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb to control food-borne pathogenic and spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.117-122.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. (2008). Biological effects of essential oils- a review. **Food Chemical. Toxicological**, v. 46, p. 446-475.

BARITAU, O.; RICHARD, H.; TOUCHE, J.; DERBESY, M. (1992). Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 267-271.

BARROSO, G. M. (1976). Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v. 28, n. 40, 273 p.

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

BENZIE, I. F. F; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay.(1996). **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76.

BOS, R.; KOULMAN, A.; WOERDENBAG, H. J. (2002). Volatile components from *Antriscus sylvestris* (L.) Hoffm. **Journal Chromatography**, v. 966, p. 233-238.

BRANDÃO, T. B.C. (2007). Caracterização da qualidade da Farinha de mandioca produzida no agreste alagoano. Dissertação (mestrado em nutrição). Universidade Federal de Alagoas.

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

BRASIL, (2007). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 20/06/2012.

BRASIL.(2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de c, MAPA/SDC, 48.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M. (2005). O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, *Asteraceae*: estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15 (3), 268-271.

BUDEL, J.M.; FARAGO, P.V.; DUARTE, M.R. (2013). Pharmaco botanical study of *Baccharis cognata* DC. (*Asteraceae*: *Astereae*). **Latin American Journal of Pharmacy** , v. 32, p. 550-554.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. (2010). Macro and microscopic characters of the aerial vegetative organs of carqueja: *Baccharis usterii* Heering. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 123-131.

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

BUSATTA, C. (2006). Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona. Dissertação (Mestrado em química) EA/URI, Campus Erechim, Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

CABEZUDO, M. D.; DIAZ-MAROTO, M. (2003). Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha picata* L.). **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p. 1265-1269.

CELESTINO, S. M. C. (2010). Princípios de Secagem de Alimentos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2176-8051. Distrito Federal, Brasil.

CEZAROTTO, V. S. (2009). Influência da Sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. E *Acrhyrocline satureioides* (Lam.) DC. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

CHEN, X.; ZHANG, Y.; ZU, Y.; FU, Y.; WANG, W. (2011). Composition and biological activities of the essential oil from *Schisandra chinensis* obtained by solvent-free microwave extraction. **Food Chemistry**, n.55, p. 123-131.

CZYEWSKI, E.; ROSA, R. L. D.; CANSIAN, R. L.; EMMERICH, D. J.; MOSSI, A. J.; PAROUL, N. (2010). Atividade Antioxidante do Óleo Essencial e Extratos Aquoso e Etanólico de Carqueja (*Baccharis trimera*). Sociedade Brasileira de Química.

DEBA, F.; XUAN, T. D.; YASUDA, M.; & TAWATU, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. **Food Control**, v. 19, p. 346–352.

DEGÁSPARI, C.H.; LEITE, B. Z.; BALSINI, I. D. A.; GUERRA, A. S. (2002). Obtenção de extrato de carqueja (*Baccharis articulata* (Lam.) Pers.) por diferentes processos de concentração. **Ciência e Cultura**, n. 29, p. 119-130.

DEWICK, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. **Wiley**, v. 2.

DIAZ-MAROTO, M.; PEREZ-COELLO, M.S.; CABEZUDO, M.D. (2002). Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). **European Food Research Technology**, v. 215, p. 227-230.

DIAZ-MAROTO, M.; PEREZ-COELLO, M.S.; CABEZUDO, M.D. (2002). Effect of different drying methods on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.). **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 4520-4524.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Fundação Osvaldo Cruz, v. 2, ed. 5, p. 745.

FENG, H. N.; CROMM, E. M.; EL-KASHOURY, E. A. (1999). Microwave and spouted bed drying of frozen blueberries: the effect of drying and pretreatment methods on physical properties and retention of flavor volatiles. **Journal Food Proc Preserv**, v. 23, p. 463-479.

FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: Cold pressing, hydrodistillation and microwave "dry" distillation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 1558-1564.

FILLY, A.; FERNANDEZ, X.; MINUTI, M.; VISINONI, F.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. (2014) Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. **Food Chemistry**, v. 150, 193-198.

FLAMINI, A. G.; TEBANO, M.; CIONIA, P. L.; CECCARINI, L.; RICCI, A.S.; LONGO, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. **Journal of Chromatography**, n.143, p. 36-40.

FUKUDA, M. (2006). Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 10, p. 1465-1468.

GENE, R.M.; CARTARIA, C.; ADZET, T. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*. **Planta Medica**, v. 6, p. 232-235.

GOUVEIA, S. T.; LOPES, G. S.; FATIBELLO, F.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. (2002). **Journal Food Engineering**, p. 51 - 59.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; AUROMA, O. I. (1998). Free radicals and antioxidants in food and vivo. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 35, p. 7-20.

HAYES, P. C. (1993). *Process Principles in Minerals and Materials Production*. Hayes Publishing, v. 29.

HUOPALAHTI, R.; KESALAHTI, E.; LINKO, R. (1985). Effect of hot air and freeze drying on the volatile components of dill *Anethum graveolens* herb. **Journal Agric Sci**, v. 57, p. 133-138.

IYENGAR, G. V.; KASPEREK, K. (1977). **Journal Radioanal. Chemistry**, v. 39, p. 301.

JALES, S. T. L. (1999). Avaliação da atividade microbiológica e tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas cápsulas e flaconetes à base de *Zymomonas mobilis*. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Produção e Controle de Medicamentos).

JAYASENAA, D. D.; J, O, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, p. 96-108.

JIAO, J.; LI, Z.; GAI, Q.; LI, X.; WEI, F.; FUA, Y.; MAA, W. (2012). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. **Food Chemistry**, n.147, p.17–24.

JUNIOR, D. S.; TOMAZELLI, A. C.; KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A. (2003). Moagem Criogênica para o Preparo de Amostras em Técnicas Analíticas. **Revista Analítica**, v. 2, p. 234-255.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. (2002). Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 105–113.

KORBES, C. V. (1995). **Manual de plantas medicinais**, n. 48.

LI, X. J.; WANG, W.; LUO, M.; PAN, S, M. (2012). Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, n. 133, p. 437–444.

LIAPIS, A. L.; MUJUMDAR, A. S. (1987). Freeze Drying. **Handbook of Industrial Drying**, n., p. 3-45.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O. (2006). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201.

LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; SOBRAL, M.; NTALANI, H.; VERIN, P.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; HENRIQUES, A. T. (2002). Chemical composition of the essential oils from southern Brazilian *Eugenia* species. **Journal Essential Oil Res**, v. 14, p. 259-262.

LIU, H.; ZENG, F.; WANG, Q.; OUC, S.; TANA, S. (2013). The effect of cryogenic grinding and hammer milling on the flavour quality of ground pepper (*Piper nigrum* L.). **Food Chemistry**, v. 141, p. 3402–3408.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, n. 1043, p. 323–327.

MA, C.; YANG, L.; ZU, Y.; LIU, T. (2012). Optimization of Conditions of Solvent-free Microwave Extraction and Study on Antioxidant Capacity of Essential Oil from *Schisandra Chinensis*. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2532–2539.

MADEJ, K. (2009). Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 4.

MARKET, B. (1995). Sample preparation (cleaning, drying, homogenizing) for analysis of trace elements in vegetable matrices. **Sci Total Environment**, n. 176, p. 45-61.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. (2000). **Plantas medicinais**, v. 2, p. 220.

MATTOSO, E. (2007). O mercado de óleos essenciais: Desafios e Oportunidades. IV Simpósio Brasileiro de óleos essenciais.

MAY, T. W.; KAISER, M. L. (1984). Evaluation of cryogenic impact grinding technique for powdering whole fish for metal determinations: **Association of Official Analytical Chemists Journal**. v. 67, n. 3, p. 589-593.

MIERZWA, J.; SUN, Y. C.; CHUNG, Y. T.; YANG, M. H. (1998). Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electro thermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 47, 1263.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237.

MOREIRA, I. J. A.; SERAFINI, M. R.; JUNIOR, W. L.; RIBEIRO, A. N.; FILHO, V. J. S.; ARAÚJO, A. A. S.; JÚNIOR, L. J. Q.; SANTOS, M. R. V. (2013). Prospecção tecnológica da utilização do beta-pineno, **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 2, p.186-194.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. (2000). **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, p. 501.

MUJUMDAR, A. S.; MENON, A. (1995). Drying of solids: Principles, Classification, and Seletion of dryers. **Handbook of industrial drying**, n. 2, p. 139.

NYCHAS, G.J.E. (1995). Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. **Blackie Academic and Professional**, p. 58 – 89.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J.(2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, n. 120, p. 308–312.

OLIVEIRA, A.C.P. (2004). Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 102, p. 465–469

OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; GROSSOA, N. R. (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **Food Science and Technolgy**, v. 53, p. 409-417.

OMIDBAIGI, R, SEFIDKON F, KAZEMI F (2004). Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman chamomile. *Flavor Fragrance. J.*, 19: 196-198.

PAN, Y.K.; LI, Z.Y.; MUJUMDAR, A.S.; KUDRA, T. (1997).Drying of a root crop in vibro-fluidized beds. **Drying Technology**, v. 15, n. 1, p. 225-223.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C. M. (2002).Secagem de material vegetal em forno de micro-ondas para determinação de matéria seca e análises químicas. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 26, v.6, p. 1252-1258.

PESSOA, L.M.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUIA, C.M.L.; LUCIANO, J.H.S. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn.and eugenol against *Haemonchus contortus* . **Veterinary Parasitology**, n. 109, v.-2, p. 59-63.

- PIRBALOUTI, A. G.; MAHDADA, E.; CRAKER, L. (2013). Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2440–2449.
- PIRBALOUTI, A. G.; ORAIEC, M.; POURIAMEHRC, M.; BABADIA, E.S. (2013). Effects of drying methods on qualitative and quantitative of the essential oil of Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica Bunge.*). **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 324–327.
- POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGUI, S. H. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal Chromatography**, n. 1163, p. 2-24.
- RADUNZ, L. L.; MELO, E. C.; BERBERT, P. A.; BARBOSA, L. C. A.; ROCHA, R. P.; GRANDI, A. M. (2002). Efeitos da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides Cham*). **Revista Brasileira Armazenamento**, v. 27, n. 2, p. 9-13. [
- RAHIMMALEK, M.; GOLI, S.A.H. (2013). Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 613–61.
- RON, A., PENEV, K. (1995). Disassembly and recycling of electronic consumer products: in overview. **Technovation**, n. 15, p. 363-374.
- SAFAEI-GHOMI, J., EBRAHIMABADI, A. H., DJAFARI-BIDGOLI, Z., BATOOLI, H. (2009). GC/MS analysis and in vitro antioxidant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 20, v.4.
- SANDRI, I. G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Journal of Ethno pharmacology**, n. 103, p. 823–828.
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, n. 112, p. 654–658.
- SELLAMI, I. H.; WANNES, W.A.; BETTAIEB, I.; BERRIMA, S.; CHAHED, T.; MARZOUK, B.; LIMAM, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. **Food Chemistry**, p. 691–697.

SHAN, YAO-SHAN; WEN-FEI GUO; YI; YUAN-XUN. (2005). Características Flavor of Lapsang Souchong e Smoked Lapsang Souchong, um chá preto com especiais chinesas defumação Pine", **Journal of Agricultural e Química dos Alimentos**, v. 53, n.22.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. (2000). Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais, 135 p.

SIMÕES, C. M. O. (2000). Farmacognosia: da planta ao medicamento, v. 5.

SIMÕES, C. M. O. (2002). Editora: Universidade UFRGS, v. 4.

SINGH, K. K., & GOSWAMI, T. K. (1999). Design of a cryogenic grinding system for spiced. **Journal of Food Engineering**, n. 39, p. 359-368.

SIQUEIRA, N. C. S.; ALICE, C. B.; THIENSEN, F. V. (1988). Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Compositae, **Cad. Farm**, v. 4, p. 63-76.

SOKMEN, A.; VARDAR, G.; POLISSIOU, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, M.; DONMEZ, E. (2003). Antimicrobial activity of essential oils and methanol extracts of *Achilleas intenisii* Hub Mor. (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, n. 17, p. 1005–1010.

SOLOMAKOS, N., GOVARIS, A., KOIDIS, P., & BOTSOGLOU, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 80, p. 159-166.

SOURAKI, B. A.; ANDRES, A., MOWLA, D. (2009). Mathematical modeling of microwave assisted inert medium fluidized bed drying of cylindrical carrot samples. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, n. 48, p. 296-305.

SOUZA, S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GUIMARÃES, L.G.L.; ANDRADE, J.; MALLET, A.C.T.; NELSON, D.L. (2011). *Baccharis tridentate* Vahl essential oil: chemical composition, and antioxidant and fungitoxic activities and morphological characterization of secretory structures by scanning electron microscopy. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.13, n. 4.

TASSOU, C. C., DROSINOS, E. H., & NYCHAS, G. J. E. (1999). Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. **Journal of Food Protection**, v. 59, p.31-34.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N. R.; NOGEUIRA, J. M. F.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties commercial essential oils. **Industrial crops and products**, v.43, p. 587-595.

TRYTEKA, M.; JANIKB, E.; MAKSYMIECB, W.; FIEDUREKA, J.; LIPKEC, A.; MAJDANC, M. (2011).The spectral and catalytic studies of chlorophylls and pheophytins in mimetic biotransformation of α -pinene. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.223, p.14-24.

VENSKUTONIS, P.R. (1997). Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris L.*) and sage (*Salvia officinalis L.*).**Food Chemistry**, v.59, n.2, p.219-227.

WIJEWICKREME, A. N.; KITTS, D. D. (1998). Oxidative reactions of model Maillard reaction products and α -tocopherol in aour-lipid mixture. **Journal of Food Science**, n. 63, p. 466-471.

WINDHOLZ, M. (1976).**The Merk Index**. 9. ed. Rahway: Merck, 1976.

YING LI, Y.;TIXIER, A.S.F.; VIAN, M.A.; CHEMAT, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 47.

YOUSIF, A. N.; DURANCE, T. D.; SCAMAN, C. H.; GIRARD, B. (2000).Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave air and freeze-dried oregano (Lippiaberlandieri Schauer).**Journal Food Science**, v.65, p. 926-930.

ZEISLER. R.; LANGLAND, J. K.; HARRISON, S. H. (1983). **Analytical Chemistry**, n. 55, p. 24 -31.