



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE COMPLEXOS DE
ÓLEOS ESSENCIAIS COM β -CICLODEXTRINAS E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A LINHAGENS
TOXIGÊNICAS DE *Aspergillus parasiticus***

MÁRCIO DOS SANTOS ROCHA

Março, 2017

Teresina, Piauí

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE COMPLEXOS DE
ÓLEOS ESSENCIAIS COM β -CICLODEXTRINAS E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE A LINHAGENS
TOXIGÊNICAS DE *Aspergillus parasiticus***

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, área de concentração Sanidade e Reprodução Animal.

Doutorando: Márcio dos Santos Rocha

Orientadora: Maria Christina Sanches Muratori

Março, 2017

Teresina, Piauí

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

R672d Rocha, Márcio dos Santos.

Desenvolvimento tecnológico de complexos de óleos essenciais com β -ciclodextrinas e avaliação da atividade antifúngica frente a linhagens toxigênicas de *Aspergillus parasiticus* / Márcio dos Santos Rocha. – 2017.
108 f.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

“Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Christina Sanches Muratori”.

1. Óleos Essenciais. 2. *Mentha arvensis*. 3. Estabilidade Térmica. 4. Monoterpenos Oxigenados. I. Título.

CDD 615.321

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE COMPLEXOS DE ÓLEOS
ESSENCIAIS COM B-CICLODEXTRINAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA FRENTE A LINHAGENS TOXIGÊNICAS DE *ASPERGILLUS*
PARASITICUS

MÁRCIO DOS SANTOS ROCHA

Tese aprovada em: 17/03/2017


Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori (Presidente) / DMV/CCA/UFPI




Profa. Dra. Maria Marlúcia Gomes Pereira Nóbrega (Externa) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Citó (Interna) / CCN/UFPI



Profa. Dra. Raizza Eveline Escórcio Pinheiro (Interna) / CPCE/UFPI



Prof. Dr. Robson Alves da Silva (Externo) / IFPI



Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Externo) / IFMA

Dedico este trabalho a Maria, Márcio Filho e João Guilherme, meus amores e parte fundamental da minha vida!

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por me conceder saúde e dar-me força durante todos estes anos!

Agradeço a compreensão dos velhos amigos por compreenderem minha ausência, e aos novos amigos conquistados, todos vocês foram essenciais durante esta caminhada.

Foram quatro anos de muita luta, quatro anos exaustivos, de longas caminhadas, mas nunca foram caminhadas solitárias, pois sempre tinha um amigo disposto a ajudar.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Geoquímica Orgânica, Iara, Lorena, André, Edy, Alek, Arkellau, Laíres, Karol, Analine, Maria, Lucinaldo, dona Fátima, Airan pelo apoio nos estudos, na execução das análises e das horas de conversa tomando aquele café. Jean, Ivan, Bóris, Eduardo, Raiane e Larisse pelas discussões e as loucas viagens que tivemos sobre a complexação e especialmente ao professor Sidney, meu orientador de mestrado e chefe, por ter permitido e incentivado o uso de diversas técnicas analíticas e pelos sábios conselhos que sempre me ajudaram a seguir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos – NUEPPA e da PPGCA Julliet, Aline Dourado, Aline Monte, Humberto, Rafael, George, Karol e Tony, pelos ensinamentos recebidos e pelas horas de conversa.

À professora Dra Antônia Maria das Graças Lopes Citó oportunidade de usufruir de uma longa convivência, pela paciência com a minha formação e de todos os seus alunos. Pelos ensinamentos como pessoa, sua retidão e apoio nos momentos difíceis.

À professora Dra. Maria Christina Sanches Muratori, a quem tenho o prazer de chamar carinhosamente de professora Chris, que mesmo sem referências, aceitou me orientar, sempre me apoiou e incentivou a fazer mais e mais, aliás, isto não foi privilégio meu. É um privilégio de todos os seus orientandos! Às horas de discussão, sobre política, gramática, ciência, família e sobre mim... Quase uma psicóloga!

Aos membros desta banca que aceitaram em contribuir com o trabalho, pois suas sugestões foram essenciais para o engrandecimento e valorização deste trabalho.

À UFPI e ao PPGCA por permitirem que eu pudesse me qualificar.

E, especialmente agradeço aos meus familiares, pela compreensão durante a ausência, durante estes anos. Minha mãe que teve que terminar a criação e a formação de seis

filhos, sozinha, viúva aos 37 anos. Ao meu pai Francisco que mesmo tendo nos deixado muito cedo, formou homens e mulheres de bem. À Vânia e à Socorro que tiveram que morar sozinhas, longe de casa e que não puderam ter às mesmas condições que eu tive, esta vitória também é de vocês. Vera, Marcelo e Márcia, obrigado por vocês também sempre me apoiarem. Aos sobrinhos João Pedro (meu filho mais velho), Amoriel, João Marcelo, Eloisa e Ágape vocês são muito importantes para mim.

Enfim, agradeço a todos que ajudaram na conclusão desta tese e espero um dia retribuir a amizade de todos.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVOS	19
REFERENCIAL TEÓRICO	20
CAPÍTULO 1	29
Prospecção científica e tecnológica como ferramenta de identificação de óleos essenciais com atividade antifúngica e seus complexos de inclusão com ciclodextrinas	30
Resumo	30
Abstract	30
Introdução	31
Metodologia	33
Resultados e discussão	33
Considerações finais	37
Referências bibliográficas	37
CAPÍTULO 2	42
Influência do aumento da temperatura da coluna cromatográfica na caracterização de óleos essenciais de plantas aromáticas	43
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e métodos	45
Material vegetal	45
Extração dos óleos essenciais	46
Caracterização dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas	47
Avaliação da temperatura da coluna cromatográfica na caracterização dos óleos essenciais através de cromatógrafo em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas	

de alta resolução	47
Resultados e discussão	48
Conclusões	55
Referências bibliográficas	56
CAPÍTULO 3	60
Avaliação da estabilidade do complexo de inclusão do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> com β -ciclodextrina	61
Resumo	61
Abstract	62
Introdução	62
Material e métodos	63
Extração do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	63
Caracterização dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas	64
Preparo do complexo de inclusão	65
Caracterização dos complexos de inclusão	66
Resultados e discussão	67
Conclusões	75
Referências bibliográficas	76
CAPÍTULO 4	80
Potencial antifúngico contra <i>Aspergillus parasiticus</i> dos complexos de inclusão de óleos essenciais das de plantas medicinais e aromáticas.	81
Resumo.	81
Abstract	82
Introdução	83
Material e métodos	84
Material vegetal	84
Extração dos óleos essenciais	85
Caracterização dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução	85
Preparo do complexo de inclusão.	86
Caracterização dos complexos.	86
Atividade antifúngica	87

Resultados e discussão	88
Conclusões.	95
Referências bibliográficas	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
PERSPECTIVAS.	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	105

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Formatação dos capítulos da Tese conforme Classificação Qualis Periódicos na área Zootecnia e Recursos Pesqueiros.	18
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 01. Número de patentes depositadas por palavra-chave em diferentes bases de dados.	33
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Variáveis climáticas do município de Teresina, PI, Brasil, no período de setembro a outubro de 2015.	49
--	----

Tabela 2. Rendimento das extrações dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>Lippia alba</i> , <i>Ocimum basilicum</i> e <i>Cymbopogon citratus</i> por hidrodestilação, coletadas no município de Teresina, PI.	50
---	----

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa dos constituintes química dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> (OEOM), <i>Mentha arvensis</i> (OEMA), <i>Lippia alba</i> (OELA), <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) coletadas em Teresina, PI.	52
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Relação entre a massa do óleo essencial obtido das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB) e a massa da β -ciclodextrina (β -CD) utilizadas para preparo do complexo de inclusão.	65
--	----

Tabela 2. Composição do óleo essencial das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> analisado por CG-EMAR, coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.	69
--	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa dos constituintes química dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> (OEOM), <i>Mentha arvensis</i> (OEMA), <i>Lippia alba</i> (OELA), <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) coletadas em Teresina, PI.	89
--	----

Tabela 2. Eficiência de complexação e rendimento dos complexos de inclusão dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> (OEOM), <i>Mentha arvensis</i> (OEMA), <i>Lippia alba</i> (OELA), <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC) coletadas em Teresina-PI, com β -Ciclodextrina.	92
--	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Representação esquemática do acoplamento cabeça-cauda de duas unidades de isopreno.	21
Figura 2. Derivados do ácido chiquímico.	21
Figura 3. Rotas biossintéticas alternativas dos óleos essenciais: Reações de condensação de policetídeos, degradação de lipídios e ciclização do ácido araquidônico.	22
Figura 4. a) Estrutura geral das ciclodextrinas (CD). Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n = 1, 2$ e 3 , respectivamente. b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD, mostrando as características estruturais definidas pelas unidades de glicose.	27
Figura 5. Representação esquemática da formação do complexo de inclusão.	28

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura química (A) e representação esquemática da estrutura espacial (B) da ciclodextrina.	32
Figura 2. Evolução anual de depósitos de patentes contendo os termos ciclodextrina e óleo essencial depositados nos escritórios da <i>World Intellectual Property Organization</i> (WIPO), <i>United States Patent and Trademark Office</i> (USPTO) e <i>European Patent Office</i> (EPO).	34
Figura 3. Número de patentes contendo os termos ciclodextrina e óleo essencial por país depositante no <i>World Intellectual Property Organization</i> (WIPO) e <i>European Patent Office</i> (EPO).	35
Figura 4. Número de patentes de acordo com o Código Internacional de Patentes contendo os termos ciclodextrina e óleo essencial depositado no <i>World Intellectual Property Organization</i> (WIPO) e <i>European Patent Office</i> (EPO).	36

CAPÍTULO 2

Figura 1. a) Visão geral do canteiro do Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal do Piauí. Partes aéreas de: b) <i>Lippia alba</i> . c) <i>Ocimum basilicum</i> . d) <i>Origanum majorana</i> . e) <i>Mentha arvensis</i> . f) <i>Cymbopogon citratus</i>	46
Figura 2. Programação do forno do cromatógrafo gasoso e perfil cromatográfico dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> (OEOM), <i>Mentha arvensis</i> (OEMA), <i>Lippia alba</i> (OELA), <i>Ocimum basilicum</i> (OEOM) e <i>Cymbopogon citratus</i> (OECC), coletados no município de Teresina, Piauí, Brasil. Constituintes majoritários: (a) L-limoneno, (b)	

linalol, (c) isomentona, (d) L-mentol, (e) estragol, (f) Z-citral, (g) L-carvona, (h) geranial.	50
Figura 3. Comparação do (A) perfil cromatográfico obtido pelo método preconizado por Adams (2007) e (B) método modificado para o óleo essencial de <i>Lippia alba</i> , coletado no município de Teresina, Piauí, Brasil.	51

Figura 4. Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>Lippia alba</i> , <i>Ocimum basilicum</i> e <i>Cymbopogon citratus</i> , coletados no município de Teresina, Piauí, Brasil.	54
---	----

CAPÍTULO 3

Figura 1. Perfil cromatográfico (TIC) do óleo essencial das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB) coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.	68
---	----

Figura 2. Eficiência de complexação dos componentes majoritários presentes no óleo essencial das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB) coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.	70
--	----

Figura 3. Perfil cromatográfico dos componentes não complexados e complexados do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> , extraídos respectivamente do sobrenadante (S-CI-OEOB) e do complexo de inclusão (CI-OEOB) com β -ciclodextrina nas proporções 5:95, 10:90 e 15:85 (massa:massa). <i>Ocimum basilicum</i> coletado no município de Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.	71
--	----

Figura 4: Espectro de Infravermelho da β -ciclodextrina (β -CD) óleo essencial extraído das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB), mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI-OEOB). <i>Ocimum basilicum</i> coletado no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.	72
--	----

Figura 5. Porcentagem de Estragol remanescente no óleo essencial das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> (OEOB), coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015, e no seu complexo de inclusão (CI-OEOB) após incubação a 45 °C em aparato de <i>headspace</i> acoplado a um CG-EMAR.	74
--	----

Figura 6. Perfil cromatográfico (TIC) dos componentes dos óleos essenciais extraído das partes aéreas de <i>Ocimum basilicum</i> extraído dos complexos de inclusão (CI-OEOB) com β -ciclodextrina submetido a estresse térmico. <i>Ocimum basilicum</i> coletado no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.	75
---	----

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Cromatograma dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) e seus complexos de inclusão com β -ciclodextrina. 91
- Figura 2.** Efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina-PI, e seus complexos de inclusão com β -Ciclodextrina sob a porcentagem de inibição do crescimento micelial (mm) de *Aspergillus parasiticus* em MEA. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28 ± 2 °C durante nove dias. 93
- Figura 3.** Efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina-PI, e seus complexos de inclusão com β -Ciclodextrina sob o crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus* em ágar MEA. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28 ± 2 °C durante nove dias. 94

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE COMPLEXOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS
COM β -CICLODEXTRINAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
FRENTE A LINHAGENS TOXIGÊNICAS DE *Aspergillus parasiticus***

RESUMO

Os óleos essenciais possuem grande importância na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, devido suas propriedades aromáticas, antioxidantes e antimicrobianas. Entretanto, sua baixa solubilidade aquosa e instabilidade térmica dificultam sua utilização, muitas vezes, fazendo-se necessário modificações tecnológicas para ampliar sua utilização, como é o caso do uso das ciclodextrinas, que permitem a microencapsulação de compostos lipofílicos, como os óleos essenciais, melhorando suas características físico-químicas. Assim, no presente trabalho, objetivou-se a extração e caracterização dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*, seguido do preparo e caracterização dos complexos de inclusão com β -ciclodextrina e avaliar seu potencial antifúngico contra *Aspergillus parasiticus*. Os óleos essenciais apresentaram rendimento variável de 0,2% a 1,1%. Destes, foram identificados 63 constituintes, dentre eles no óleo essencial de *O. majorana*: L-limoneno (8,7%), linalol (7,5%) e estragol (51,8%); na *M. arvensis* isomentona (16,6%) e L-mentol (75,5%); na *L. alba* L-limoneno (32,0%), γ -terpineno (6,1%) e L-carvona (43,5%); no *O. basilicum* linalol (18,1%) e estragol (64,4%) e no *C. citratus* Z-citral (33,3%) e geranial (41,9%). Todos os óleos apresentaram atividade antifúngica, entretanto, o óleo essencial de *M. arvensis* destacou-se, pois, apresentou maior rendimento e completa inibição do crescimento de *A. parasiticus* em todas as concentrações testadas. Os complexos de inclusão com β -ciclodextrina apresentaram rendimentos superiores à 85% para todos os óleos essenciais. A estabilidade térmica do complexo de *O. basilicum*, foi determinada à 45 °C por 120 minutos, apresentando retenção de 75% do conteúdo do óleo, devido à capacidade protetora da β -ciclodextrina. Entretanto, após a complexação, houve uma redução da atividade antifúngica de todos os óleos contra *A. parasiticus* devido ao efeito estabilizador do ágar sob os complexos de inclusão, sendo necessário a avaliação da atividade antifúngica por outro modelo experimental.

Palavras-Chave: GC-HRMS; Estabilidade térmica; Monoterpenos oxigenados; *Mentha arvensis*.

TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF ESSENTIAL OIL COMPLEXES WITH β -CYCLODEXTRINS AND EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST TOXIGENIC STRAINS OF *Aspergillus parasiticus*

ABSTRACT

The essential oils have great importance in the food, cosmetic and pharmaceutical industries, due to their aromatic, antioxidant and antimicrobial properties, however, their low aqueous solubility and thermal instability make it difficult to use them, often requiring technological modifications to increase their use, such as the use of cyclodextrins, which allow the microencapsulation of lipophilic compounds, such as essential oils, improving their physico-chemical characteristics. The aim of this work was the extraction and characterization of the essential oils of *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon citratus*, followed by the preparation and characterization of inclusion complexes with β -cyclodextrin and the evaluation of its antifungal potential against *Aspergillus parasiticus*. The essential oils presented yields varying from 0.2% to 1.1% and 63 constituents of the essential oils were identified, among them L-limonene (8.7%), linalool (7.5%) and estragol (51, 8%) in *O. majorana* essential oil; and L-menthol (75.5%) in *M. arvensis*; L-limonene (32.0%), γ -terpinene (6.1%) and L-carvone (43.5%) in *L. alba*; linalool (18.1%) and estragol (64.4%) in *O. basilicum*; and Z-citral (33.3%) and geranial (41.9%) in *C. citratus*. All the oils presented antifungal activity, however, the essential oil of *M. arvensis* was thus highlighted as presenting higher yield and complete inhibition of *A. parasiticus* growth at all concentrations tested. Inclusion complexes with β -cyclodextrin showed yields more than 85% for all essential oils. The thermal stability of the *O. basilicum* complex was determined at 45 °C for 120 minutes, with a 75% retention of the oil content due to the protective ability of β -cyclodextrin. However, after the complexation, there was a reduction of the antifungal activity of all the oils against *A. parasiticus* due to the stabilizing effect of the agar under the inclusion complexes, being necessary the evaluation of the antifungal activity through another experimental model.

Keywords: GC-HRMS; Thermal stability; Oxygenated monoterpenes; *Mentha arvensis*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas, instáveis à temperatura ambiente, à luz e ao oxigênio, que se decompõem nestas condições (BAKKALI et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; KFOURY et al., 2016). São reconhecidos por suas propriedades bactericidas, antivirais e fungicidas (BAKKALI et al., 2008). Sendo ainda utilizados na indústria de cosméticos por suas propriedades aromáticas, na indústria alimentícia como conservantes e na indústria farmacêutica como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e espasmolíticos (BAKKALI et al., 2008).

Entretanto, a aplicação industrial dos óleos essenciais, em geral, é limitada pela sua elevada volatilidade, insolubilidade em água e baixa estabilidade físico-química (CALO et al., 2015). Uma alternativa para reverter estas limitações é por meio da complexação dos óleos essenciais com ciclodextrinas, tornando-os, desta forma, mais estáveis física e quimicamente (KFOURY et al., 2015).

As ciclodextrinas naturais são carboidratos formadas por seis, sete ou oito unidades de glicopirranose, conhecidas por α , β ou γ -ciclodextrinas, respectivamente. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexo de inclusão com uma grande variedade de compostos orgânicos (LYRA et al., 2010; KFOURY et al., 2015; ABARCA et al., 2016), a partir de fracas interações como pontes de hidrogênio e força de Van der Waals (WANG et al., 2011).

Hedges (1998) postulou que a complexação de óleos essenciais com ciclodextrinas aumentaria sua estabilidade, além de aumentar sua solubilidade aquosa, protegê-los da oxidação, aumentar sua fotoestabilidade e estabilidade térmica, mascarar ou reduzir efeitos fisiológicos indesejados, além de reduzir sua volatilidade. Baseado nestas propriedades, diversos pesquisadores já estudaram a complexação dos óleos essenciais de *Cinnamomum loureirii* (JIANG; LI; JIANG, 2010), *Allium sativum* L. (WANG et al., 2011), *Croton zehntneri* (AGUIAR et al., 2014), *Satureja montana* (HALOCI et al., 2014), *O. basilicum*, *Artemisia dracuncululus* (KFOURY et al., 2015), bem como os constituintes dos óleos essenciais: timol, cinamaldeído (CEVALLOS; BUERA; ELIZALDE, 2010), estragol (KFOURY et al., 2015) e citronelal (SANTOS et al., 2016) com β -ciclodextrinas.

Desta forma, no presente trabalho objetivou-se extrair e caracterizar os óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*; preparar e caracterizar os complexos de inclusão dos óleos essenciais com β -ciclodextrina; e, avaliar o potencial antifúngico contra *Aspergillus parasiticus*. Para um melhor

entendimento optou-se pela divisão do presente trabalho em capítulos que serão submetidos como artigos científicos em periódicos indexados. No Capítulo 1 realizou-se a busca das patentes depositadas em diversas bases, relacionadas com a utilização dos óleos essenciais e seus complexos de inclusão com atividades antifúngicas. No Capítulo 2, adaptou-se o método cromatográfico para análise dos óleos essenciais. No Capítulo 3 preparou-se o complexo de inclusão entre o óleo essencial de *O. basilicum* e a β -ciclodextrina, determinando-se, ainda, sua estabilidade térmica. No Capítulo 4 avaliou-se a atividade antifúngica contra *Aspergillus parasiticus* dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* e seus complexos de inclusão com β -ciclodextrina.

Os capítulos foram organizados em artigos os quais foram formatados de acordo com o Periódico e Qualis na área Zootecnia e Recursos Pesqueiros:

Tabela 1: Formatação dos capítulos da Tese conforme Classificação Qualis Periódicos na área Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

Capítulo	Periódico	Qualis 2015
1	Ciência Rural	B2
2	Bioscience Journal	B2
3	Food Chemistry	A1
4	Industrial Crops and Products	A1

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver complexos de inclusão de óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrinas e avaliar a atividade antifúngica contra *Aspergillus parasiticus*.

2.2. Específicos

Extrair e caracterizar os óleos essenciais das partes aéreas de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*;

Avaliar a influência da temperatura da coluna cromatográfica na caracterização dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*;

Preparar os complexos de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrina;

Caracterizar os complexos de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrina, por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e por espectroscopia de absorção no infravermelho;

Determinar a melhor proporção entre os óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* e a β -ciclodextrina para o preparo do complexo de inclusão;

Determinar a eficiência de complexação dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrina;

Avaliar a estabilidade térmica dos complexos de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrina e;

Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais e dos complexos de inclusão de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*; frente a *Aspergillus parasiticus*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE) são compostos voláteis que conferem aroma e sabor característicos de uma planta aromática (PAVELA et al., 2015). São metabólitos secundários biossintetizados por plantas aromáticas (BASER, 2010; KFOURY et al., 2016) que ficam armazenados em estruturas glandulares e secretórias complexas presentes nas folhas, talos, flores, frutos, cascas ou raízes de plantas (BASER, 2010; PAVELA et al., 2015), que quando extraídos apresentam-se líquidos, instáveis à temperatura ambiente à luz e ao oxigênio, se decompõem nestas condições (KFOURY et al., 2016).

São utilizados na indústria de cosméticos por suas propriedades aromáticas, na área de alimentos como flavorizantes e conservantes e na farmácia como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e espasmolíticos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; KFOURY et al., 2016).

3.1.1. Biossíntese dos óleos essenciais

Nas plantas, os OE possuem diversas funções, agindo na atração de insetos, favorecendo a dispersão do pólen e sementes ou como repelente contra herbívoros e microorganismos (BAKALLI et al., 2008; BASER, 2010; KFOURY et al., 2016). Entretanto por serem metabólitos secundários, não são essenciais para a sobrevivência das espécies aromáticas, diferentes dos metabólitos primários que são elementos básicos para a manutenção da vida do vegetal, tais como biossíntese de: proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios, (BASER, 2010). Os OE são biossintetizados no citoplasma e plastídeos de células vegetais pela via dos terpenoides (ácido mevalônico) e ácido chiquímico (BASER, 2010; PAVELA et al., 2015).

De uma forma geral os terpenoides correspondem ao grupo mais importante na biossíntese dos óleos essenciais e são definidos como substâncias compostas por unidades de isopreno (2-metil butadieno), acopladas no sentido cabeça-cauda a partir intermediário ácido mevalônico (Figura 1). O acoplamento dessas unidades de cinco carbonos forma uma unidade de 10 carbonos e assim subsequentemente formando outros derivados múltiplos de cinco carbonos, sendo chamados genericamente de hemiterpenoides, aqueles compostos formados por cinco carbonos, monoterpenoides os compostos formados por 10 átomos de carbono, sesquiterpenoides os compostos formados por 15 carbonos e aqueles formados por 20 carbonos são chamados de diterpenoides e assim por diante.

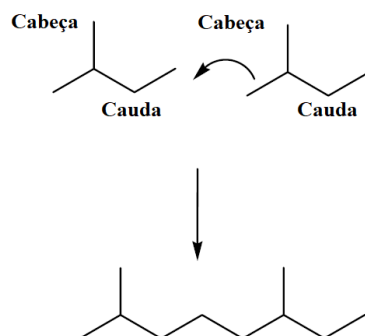


Figura 1. Representação esquemática do acoplamento cabeça-cauda de duas unidades de isopreno. Adaptado de BASER et al., 2010.

Em geral, apenas os hemiterpenoides, os monoterpenoides e os sesquiterpenoides são os constituintes suficientemente voláteis para serem componentes de óleos essenciais (BASER, 2010). Comumente, durante as etapas biossintéticas, estes compostos sofrem modificações enzimáticas com adição de grupos oxigenados, metilações, desmetilações e isomerizações, sendo grande a variedade de estruturas acíclicas, monocíclicas e bicíclicas (mircenol, elemeno e sabineno) e grupos funcionais como álcoois (linalol e mentol), aldeídos (geranial e citronelal), cetonas (carvona e pulegona), ésteres (linalil acetato), éteres (1,8-cineol), peróxidos (ascaridol) e fenóis (timol e carvacrol) (BASER, 2010; PAVELA et al., 2015).

Outra classe de constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais são biossintetizados a partir da aromatização do ácido chiquímico, formando derivados do fenilpropano (Figura 2), ou pelas reações de condensação de policetídeos, degradação de lipídios e ciclização do ácido araquidônico (Figura 3), por exemplo os constituintes: eugenol, estragol, decanal, 4-decenal e 2-nonanona (BASER, 2010; PAVELA et al., 2015).

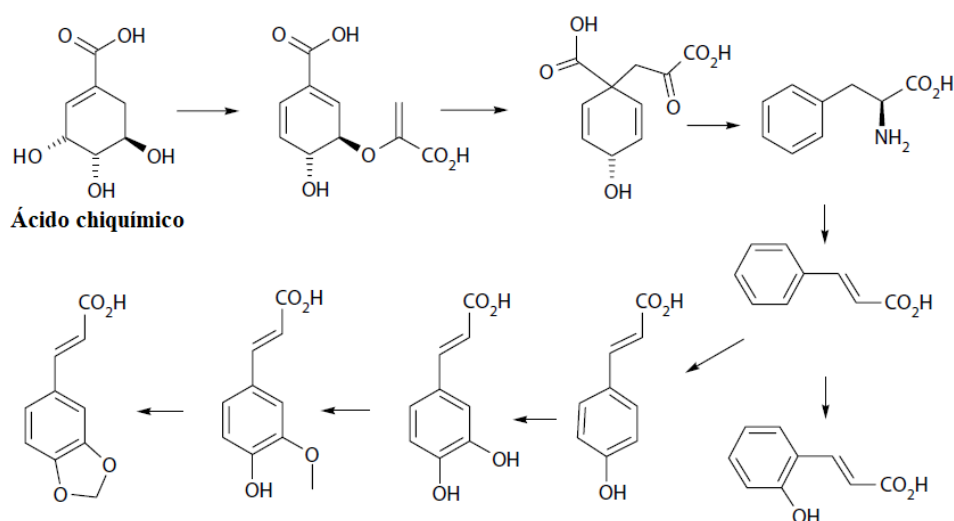


Figura 2. Derivados do ácido chiquímico. Adaptado de BASER et al., 2010.

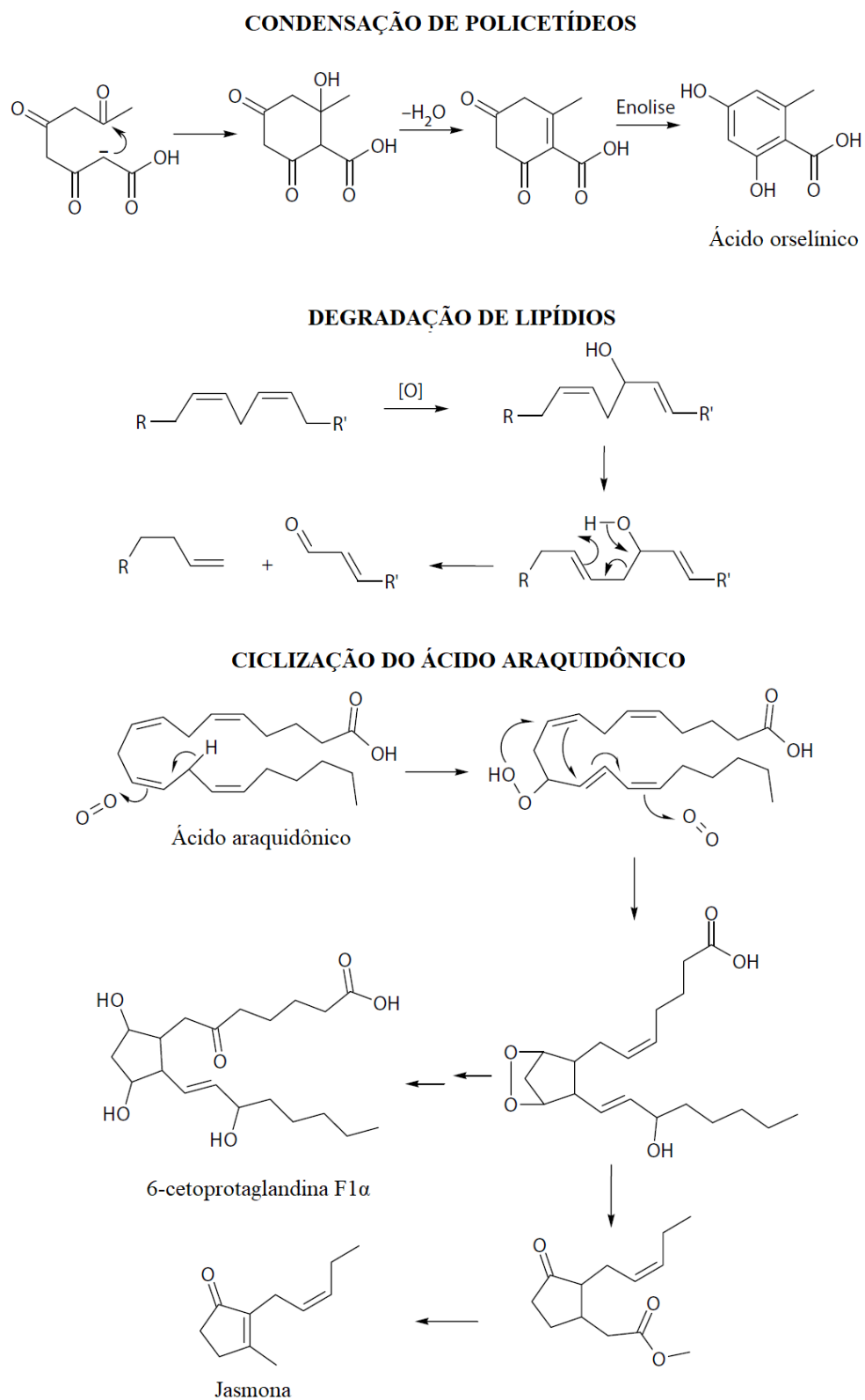


Figura 3. Rotas biossintéticas alternativas dos óleos essenciais: Reações de condensação de policetídeos, degradação de lipídios e ciclização do ácido araquidônico. Adaptado de BASER et al., 2010.

3.1.2. Importância econômica

A cadeia produtiva de óleos essenciais é complexa e fragmentada, com aproximadamente 100 países produtores (BASER, 2010) que fornecem matéria-prima para a indústria de perfumaria, cosmética, alimentos e adjuvantes em medicamentos, na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o mentol e safrol (BIZZO et al., 2009).

Cerca de 300 óleos essenciais possuem importância comercial, com produção anual de cerca de 100 mil toneladas, representado cerca de US \$ 700.000.000,00 (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Os maiores consumidores de óleos essenciais são os Estados Unidos (40%) e União Européia (30%) com crescimento anual de 11% (BIZZO et al., 2009), ocasionado pela expansão do uso dos óleos essenciais nas indústrias, devido ao desenvolvimento de novos produtos nas indústrias de alimentos e cosméticos. Os principais óleos essenciais comercializados no mercado mundial são o de *Citrus sinensis*, representando cerca de 50.000 toneladas seguido do óleo de *Mentha arvensis*, com 25.000 toneladas e *Eucalyptus globulus*, com 4.000 toneladas (BASER, 2010).

Os preços de mercado dos óleos essenciais variam de forma considerável, por exemplo, o óleo essencial de *Citrus sinensis* possui valor de € 5,50 por quilo, já o óleo de patchouli possui valor de € 115,00 por quilo. No Brasil, destaca-se a produção de óleos cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos, correspondendo cerca de 93% do volume de óleo essencial exportado pelo Brasil (BIZZO et al., 2009) e 28% da produção mundial de óleos essenciais (BASER, 2010)

3.1.3. Aplicações

Os OE possuem ampla aplicação comercial baseada nas propriedades aromática, antibacteriana, antifúngica e inseticida, em especial na indústria de alimentos, como aditivos alimentares, como agentes de sabor da indústria de cigarros, na composição de cosméticos, perfumes, purificadores de ar e desodorizadores, bem como indústria farmacêutica, na formulação de medicamentos, homeopatia e aromaterapia (BAKALLI et al., 2008; BASER, 2010; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; PAVELA et al., 2015; KFOURY et al., 2016).

Devido ao grande número de constituintes nos óleos essenciais, suas atividades biológicas não possuem um alvo celular específico. Devido a característica lipofílica, os constituintes dos OE atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, alterando a estrutura dos polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, alterando a permeabilidade membranar associada à perda iônica e redução do potencial de membrana, colapso da bomba de

prótons e depleção dos reservatórios de ATP e lise celular. Em células eucarióticas, os OE ainda provocam a despolarização das membranas mitocondriais (BAKALLI et al., 2008).

3.2. Atividade antifúngica dos óleos essenciais

A contaminação fúngica é um dos principais problemas encontrados em alimentos e grãos estocados, pois podem deteriorar estes alimentos e produzir toxinas causadoras de graves micotoxicoses em animais e humanos (PRAKASH et al., 2010). Diversos antifúngicos sintéticos são utilizados no sentido de reduzir as perdas ocasionadas pelo desenvolvimento fúngico, entretanto, o uso indiscriminado destes antifúngicos tem sido implicados como a maior causa de desenvolvimento de resistência microbiana (GUERRA et al., 2016; GUERRA et al., 2015), além disso, alguns destes compostos tem sua segurança frequentemente questionadas, levando a imposição de restrições por algumas agências regulatórias, o que reativou a busca de novas substâncias antimicrobianas obtidas a partir de compostos naturais (NGUEFACK et al., 2009).

Desta forma, compostos naturais como os OE passaram a ter seu potencial explorado devido às suas propriedades antifúngicas (NGUEFACK et al., 2009) e, em especial, pelo baixo impacto ao meio ambiente e para a saúde humana (FELIZIANI et al. 2013; GUERRA et al., 2015). Além disso, a utilização dos OE como antifúngicos de interesse comercial se deve pela facilidade de cultivo das espécies aromáticas e pela existência de técnicas extrativas eficientes que propiciam um bom rendimento na obtenção dos OE (AGUIAR et al., 2014; ALVARENGA et al., 2012; BOTREL et al., 2011; CORRÊA et al., 2010).

Entretanto, os OE possuem alguns entraves quanto à sua utilização, em especial a sua baixa solubilidade aquosa e baixa estabilidade térmica (AGUIAR et al., 2014). Estas limitações podem ser em parte, contornadas com a utilização de CD, substância classificada como estabilizante, de acordo com o *Codex alimentarius* (FAO 2007; RAUT, KARUPPAYIL, 2014), a qual também é utilizada na indústria farmacêutica e cosmética devido a sua característica de alterar as propriedades físico-químicas das substâncias insolúveis em água ou instáveis termicamente, funcionando como uma espécie de microcápsulas, alojando em seu interior, substâncias lipofílicas como os óleos essenciais (FU et al., 2016).

Os fungos fazem parte da microbiota de grãos e alimentos em geral, dependendo da espécie fúngica presente pode ocorrer à produção de metabólitos secundários denominados de micotoxinas. A capacidade micotoxigênica destes fungos é influenciada pelas práticas agronômicas, da composição dos alimentos, condições de colheita, manuseamento e armazenamento (BRYDEN, 2012; GARCÍA-CELA et al., 2012; BARANYI; KOCSUBÉ;

VARGA, 2015). Desta forma, a presença de fungos potencialmente toxigênicos não implica na presença de micotoxinas. Por outro lado, devido a sua elevada estabilidade, a presença de micotoxinas pode ser observada mesmo sem a identificação de qualquer espécie fúngica toxigênica (GARCÍA-CELA et al., 2012).

Uma vez biossintetizada, a remoção das micotoxinas do alimento é difícil de ser realizada (BRYDEN, 2012), ocasionando perdas econômicas associadas à redução da qualidade dos alimentos para humanos e animais, à redução da produção animal, aumento do custo para tratamentos de micotoxicoses e na busca por alimentos alternativos livres de contaminantes (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

A deficiência no monitoramento dos níveis de micotoxinas nos alimentos pode estar relacionada à maior incidência de câncer de fígado observado nos países em desenvolvimento (BENNETT; KLICH, 2003; BARANYI; KOCSUBÉ; VARGA, 2015). Estima-se que aproximadamente 25% dos cereais produzidos anualmente podem estar contaminados por micotoxinas (BRYDEN, 2012; MARIN et al., 2013) e que as maiores perdas financeiras são atribuíveis às aflatoxinas (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

A contaminação por aflatoxina é especialmente importante em países em desenvolvimento devido às condições climáticas favoráveis a proliferação dos fungos toxigênicos e aos métodos inadequados de processamento e estocagem dos grãos (HASSAN et al. 2010). As Aflatoxinas são produzidas principalmente por fungos do gênero *Aspergillus*, pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, mas podem ser produzidas por *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus* (BENNETT; KLICH, 2003).

O consumo de alimentos contendo aflatoxinas causa a aflatoxicose, sendo comumente ocasionado pelo consumo de quantidades relativamente pequenas de aflatoxinas durante um período prolongado, podendo ocasionar efeitos carcinogênicos, teratogênicos, mutagênicos e imunossupressores (HASSAN et al. 2010; DWIVEDY et al., 2016). A intensidade e extensão dos sintomas dependem de fatores como: idade, espécie animal, sexo, estado nutricional, dose e duração da exposição (BRYDEN, 2012; MARIN et al., 2013). As aflatoxicoses geralmente provocam a redução da conversão alimentar e do crescimento, afetam o desempenho reprodutivo e podem provocar a diminuição da resistência imunológica em mamíferos, aves e peixes (BRYDEN, 2012; MARIN et al., 2013).

Devido a estes efeitos toxicológicos é necessário identificar e prevenir a presença das micotoxinas e seus produtos metabólicos em alimentos como carnes, ovos, leite e outros produtos alimentícios (BRYDEN, 2012; MARIN et al., 2013). Ensaio analítico são necessários

para determinar a extensão da contaminação dos alimentos e rações por micotoxinas, além de permitir a realização da análise de riscos, fornecer o diagnóstico de micotoxicose e avaliar estratégias de controle da produção de micotoxinas (BRYDEN, 2012).

Dentre as técnicas de controle da produção de micotoxinas, a utilização de cultivares resistentes ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, a redução da umidade dos grãos após colheita, o uso de adsorventes para micotoxinas e o uso de fungicidas são bastante disseminados (BRYDEN, 2012; BARANYI, KOCSUBÉ, VARGA, 2015).

Além dos métodos supracitados, o uso de produtos naturais com potencial antifúngico, como os óleos essenciais despertam atenção, devido às características sustentáveis e ecologicamente viáveis (DWIVEDY et al., 2016). Neste contexto, diversos óleos essenciais foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* para o consumo como aditivos de alimentos e bebidas (CFR, 2016) e alguns conservantes à base de óleo essencial têm sido formulados por diferentes indústrias agrícolas e já estão comercialmente disponíveis (DWIVEDY et al., 2016).

3.3. Complexo de inclusão com óleos essenciais

A utilização dos óleos essenciais como alternativa aos conservantes sintéticos é limitada devido à elevada volatilidade e insolubilidade aquosa (CALO et al., 2015; KFOURY et al., 2015). Uma alternativa para melhorar estas características físico-químicas é a complexação dos óleos essenciais com as ciclodextrinas (CD), ampliando as possibilidades de aplicação tecnológica (KFOURY et al., 2015). As CD naturais são formadas por seis, sete ou oito unidades de glicopirranose (Figura 1a), conhecidas por α , β ou γ -CD, respectivamente. As CD são oligossacarídeos cíclicos, obtidas a partir da degradação enzimática do amido, capazes de formar complexo de inclusão com uma grande variedade de compostos orgânicos (LYRA et al., 2010; KFOURY et al., 2015; ABARCA et al., 2016).

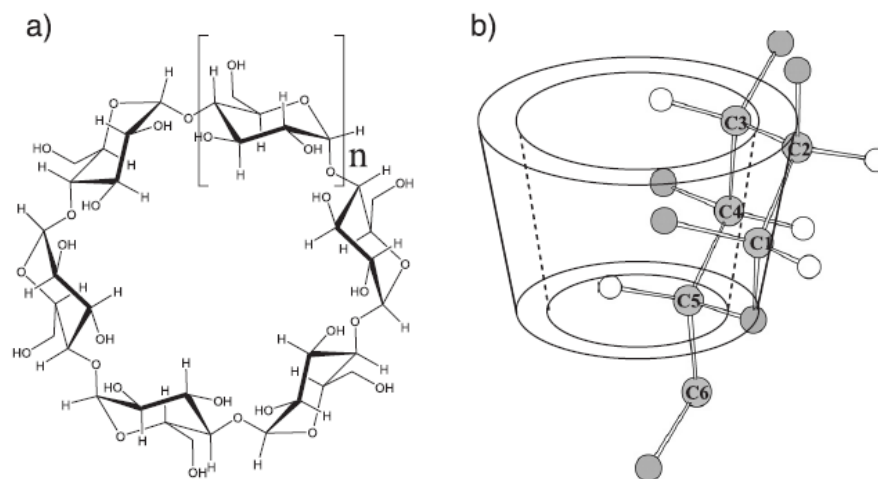


Figura 4. a) Estrutura geral das ciclodextrinas (CD). Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n = 1, 2$ e 3 , respectivamente. b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CD, mostrando as características estruturais definidas pelas unidades de glicose. Adaptado de BRITTO; NASCIMENTO-JUNIOR; DOS SANTOS, 2004.

Do ponto de vista estrutural (Figura 1b), as ciclodextrinas têm conformação em forma de cone truncado, com os grupos hidroxilos primários e secundários voltados para a face externa, delimitando respectivamente a face mais estreita e a face mais larga do cone. Os átomos de oxigênio envolvidos nas ligações glicosídicas entre as unidades de glicopiranosose e os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono da posição 3 e 5 determinam o caráter hidrofóbico do interior de sua cavidade (WANG et al., 2011; ABARCA et al., 2016). Devido a estas características físico-químicas, as CD são capazes de formar complexo de inclusão com uma grande variedade de compostos orgânicos, a partir da formação de fracas interações, do tipo pontes de hidrogênio e força de Van der Waals (LYRA et al., 2010; WANG et al., 2011; KFOURY et al., 2015; ABARCA et al., 2016), ampliando a utilização destas substâncias nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e agroquímica (ABARCA et al., 2016).

O mecanismo de formação dos complexos de inclusão ocorre de forma espontânea (Figura 2). A energia envolvida no preparo dos complexos é a repulsão existente entre as moléculas dos óleos essenciais, quando estão em solução aquosa, de forma que estas alojam-se no interior da cavidade apolar da CD (LYRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; WANG et al., 2011; AGUIAR, et al., 2014). Desta forma, o fenômeno de complexação modifica as propriedades físico-químicas das moléculas complexadas, aumentando a solubilidade aquosa, estabilidade térmica, à luz e à oxidação.

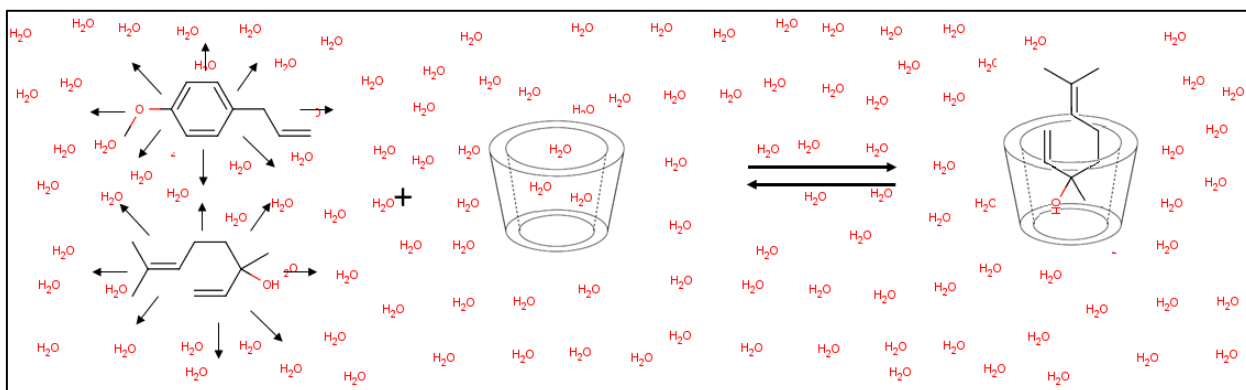


Figura 5. Representação esquemática da formação do complexo de inclusão. Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

Por fim, na literatura consultada não há registros de trabalhos científicos ou patentes depositadas que avaliem os complexos de inclusão dos óleos essenciais com β -CD como agente antimicotoxigênico, sendo este um trabalho pioneiro e inovador.

Capítulo 1

Artigo submetido ao Periódico: Ciência Rural

Prospecção tecnológica como ferramenta de identificação de óleos essenciais com atividade antifúngica e seus complexos de inclusão com ciclodextrinas.

Márcio dos Santos Rocha^{I,II*} Larisse Carneiro da Frota Brito^{II} Maria Liliâne Ximendes Azevedo^{II} Maria Christina Sanches Muratori^{III}

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

RESUMO

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos da classe dos estabilizantes utilizados para aumentar a solubilidade aquosa e a estabilidade térmica de substância lipofílicas como os óleos essenciais. Estes últimos possuem elevado potencial antifúngico, tornando-se uma alternativa sustentável aos antifúngicos sintéticos utilizados na preservação de alimentos. Entretanto, mesmo com todo o potencial observado são poucas as patentes com esta aplicação tecnológica, demonstrando o potencial inexplorado neste ramo da pesquisa científica e tecnológica. Em termos mundiais, a China representa o mercado que mais busca proteção patentária e que o Brasil, apesar da enorme biodiversidade, possui pouca relevância em termos de patentes internacionais depositadas.

Palavras-chave: patentes, ciclodextrina, óleos essenciais, complexo de inclusão, antifúngico.

ABSTRACT

The cyclodextrins (CD) are cyclic oligosaccharide of the class of stabilizers used to enhance the aqueous solubility and thermal stability of lipophilic substances such as essential oils (OE). The latter have a high antifungal potential, making it a sustainable alternative to

^(I)Departamento de Química, Laboratório de Geoquímica Orgânica, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP. 64.055-450, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: msrocha@ufpi.edu.br. *Autor para correspondência.

^(II)Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

^(III) Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br.

synthetic antifungal agents used in food preservation. However, even with all the observed potential, there are few patents with this technological application, demonstrating the unexplored potential in this field of scientific and technological research. Globally, China represents the market that most search patent protection and Brazil, despite its enormous biodiversity, has little relevance in terms of international patents deposited.

Key words: patents, cyclodextrin, essential oil, inclusion complex, antifungal.

INTRODUÇÃO

A contaminação fúngica é um dos principais problemas encontrados em alimentos e grãos estocados, pois podem deteriorar estes alimentos e produzir toxinas causadoras de graves micotoxicoses em animais e humanos (PRAKASH et al., 2010). Diversos antifúngicos sintéticos são utilizados no sentido de reduzir as perdas ocasionadas pelo desenvolvimento fúngico, entretanto, o uso indiscriminado destes antifúngicos tem sido implicados como a maior causa de desenvolvimento de resistência microbiana (GUERRA et al., 2015; GUERRA et al., 2016), além disso, alguns destes compostos tem sua segurança frequentemente questionadas, levando a imposição de restrições por algumas agências regulatórias, o que reativou a busca de novas substâncias antimicrobianas obtidas a partir de compostos naturais (NGUEFACK et al., 2009).

Neste contexto, compostos naturais como os óleos essenciais (OE) passaram a ter seu potencial investigado devido às suas propriedades antifúngicas (NGUEFACK et al., 2009), baixo impacto sob o meio ambiente e a saúde humana (FELIZIANI et al., 2013; GUERRA et al., 2015; GUERRA et al., 2016), facilidade de cultivo das espécies aromáticas e pela existência de técnicas extrativas que fornecem um bom rendimento (CORRÊA et al., 2010; BOTREL et al., 2011; ALVARENGA et al., 2012; AGUIAR et al., 2014).

Quimicamente, os OE são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Seus constituintes pertencem a uma ampla classe de compostos químicos, que possuem potenciais atividades contra diversos micro-organismos como bactérias, fungos e vírus, além de possuírem atividades repelentes, flavorizantes, antioxidantes e conservantes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Entretanto, devido sua baixa solubilidade aquosa e instabilidade térmica, os OE apresentam uma limitada utilização comercial (AGUIAR et al., 2014). Mesmo assim, o mercado mundial de óleos essenciais representa 700 milhões de dólares por ano, com uma produção anual de 40 a 60 mil toneladas (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). De acordo com a base de dados

americana *United Nations Commodity Trade Statistics Database* (2016), o Brasil exportou mais de 54 mil toneladas de óleos essenciais no ano de 2015. Entretanto, segundo Bizzo, Hovell e Rezende (2009), apesar do aumento das exportações nos últimos anos, os OE produzidos no Brasil ainda apresentam dificuldades de manutenção do padrão de qualidade.

Uma das alternativas para aumentar a utilização dos OE é melhorar suas características físico-químicas pela formação de complexos de inclusão (CI) com a ciclodextrina (CD), substância classificada como estabilizante, de acordo com o *Codex alimentarius* (FAO 2007; RAUT; KARUPPAYIL, 2014), que possui a propriedade de alterar as propriedades físico-químicas das substâncias insolúveis em água ou instáveis termicamente, funcionando como uma espécie de microcápsula, alojando em seu interior, substâncias lipofílicas como os óleos essenciais, conferindo uma maior estabilidade térmica, à luz e o incremento de sua solubilidade aquosa, levando ao aumento de sua biodisponibilidade (ASTRAY et al., 2010; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; FU et al., 2016).

As CD são polissacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido pela ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase produzida por uma série de micro-organismos, sendo os *Bacillus macerans* e o *B. circulans* os mais comuns (KFOURY et al., 2015). As principais CD naturais formadas por este processo são conhecidas por α , β e γ -CD, compostas por 6, 7 ou 8 unidades de glicopirranose. As CD possuem a superfície externa hidrofílica, devido à disposição das hidroxilas primárias e secundárias, voltadas para a face externa (Figura 1), enquanto o interior da sua cavidade possui caráter hidrofóbico, o que permite a formação de complexos de inclusão com moléculas apolares (COSTA et al., 2015).

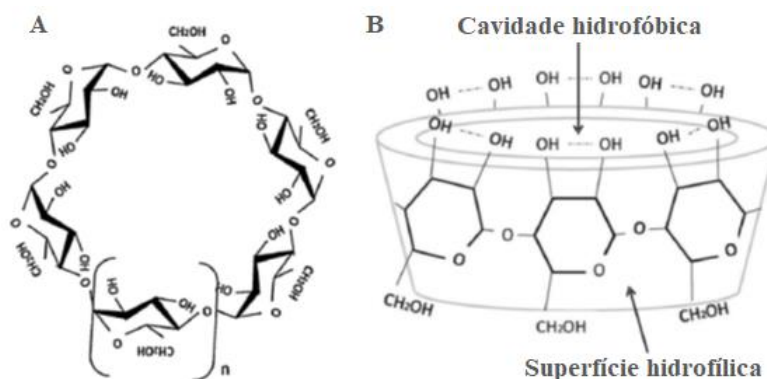


Figura 1. Estrutura química (A) e representação esquemática da estrutura espacial (B) da ciclodextrina. n representa o número de monômeros de glicose. Adaptado de COSTA et al., 2015.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a realização da busca de depósitos de patentes, relacionados com a utilização dos óleos essenciais e seus complexos de inclusão

com atividade antifúngica, como estratégia para identificar o seu potencial tecnológico e econômico.

METODOLOGIA

A prospecção tecnológica foi realizada a partir da análise dos bancos de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e *European Patent Office* (EPO), utilizando os seguintes termos: *Cyclodextrin* (CD), *Inclusion Complex* (CI), *Essential oil* (OE), *Antifungal* (AF) e suas combinações, nos campos “título” e “resumo” para patentes depositadas até julho de 2016. De forma complementar, os mesmos termos em português e suas combinações foram utilizados na prospecção realizada na base do INPI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da prospecção tecnológica nas bases de patentes utilizando apenas os termos isolados, isto é, sem correlacioná-los entre si, foram identificadas 28.508 patentes depositadas no EPO, 23.571 depositadas na WIPO, 450 depositadas na USPTO e 443 patentes depositadas no INPI. Desta forma, optou-se pela análise das patentes contendo a associação de pelo menos dois termos de busca, reduzindo o universo do estudo para 269 patentes para o escritório europeu (EPO), 248 para a WIPO, 248 para o escritório americano e 16 patentes no INPI (Tabela 1).

Tabela 01. Número de patentes depositadas por palavra-chave em diferentes bases de dados.

Palavra-chave	EPO	INPI	USPTO	WIPO
<i>Cyclodextrin and Essential oil</i>	147	-	30	106
<i>Essential oil and Antifungal</i>	67	-	39	75
<i>Cyclodextrin and Antifungal</i>	49	-	156	59
<i>Cyclodextrin, Essential oil and Antifungal</i>	2	-	6	1
<i>Inclusion Complex and Essential oil</i>	2	-	4	3
<i>Inclusion Complex and Antifungal</i>	2	-	11	4
<i>Inclusion Complex, Essential oil e Antifungal</i>	0	-	2	0
Ciclodextrina e Óleo essencial	-	9	-	-
Óleo essencial e Antifúngico	-	4	-	-
Ciclodextrina e Antifúngico	-	3	-	-
Ciclodextrina, Óleo essencial e Antifúngico	-	0	-	-
Complexo de inclusão e Óleo essencial	-	0	-	-
Complexo de inclusão e Antifúngico	-	0	-	-
Complexo de inclusão, Óleo essencial e Antifúngico	-	0	-	-
TOTAL	269	16	248	248

* EPO - *European Patent Office*; INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial; USPTO - *United States Patent and Trademark Office* e; WIPO - *World Intellectual Property Organization*.

Analisando a Tabela 1, observa-se um elevado número de patentes depositadas com os termos pesquisados, demonstrando um elevado interesse das empresas e universidades na proteção patentária das pesquisas desenvolvidas nestas áreas, pois esta busca por inovação e conhecimento são estratégias de crescimento das grandes corporações, visto que em muitos casos as ações nos mercados financeiros são baseadas não somente no valor contábil das empresas, mais considerando também o capital intelectual (JOIA, 2001).

Historicamente, a primeira patente relacionada à formação do complexo de inclusão de ciclodextrina e compostos flavorizantes foi depositada na base de patentes britânica em 1962 e posteriormente depositada na EPO em 1964 (MORRIS, 1964). Somente após 1980 novas patentes dentro deste escopo foram depositadas na EPO sendo 114 novas patentes depositadas nos últimos 10 anos (Figura 2). Provavelmente a evolução tecnológica do processo de obtenção das ciclodextrinas e o avanço das pesquisas com produtos de origem vegetal, no que tange a identificação de compostos químicos e caracterização de sua atividade biológica, aliada a estudos para melhorar a solubilidade destes compostos levou ao aumento do número de pedidos de depósitos de patentes.

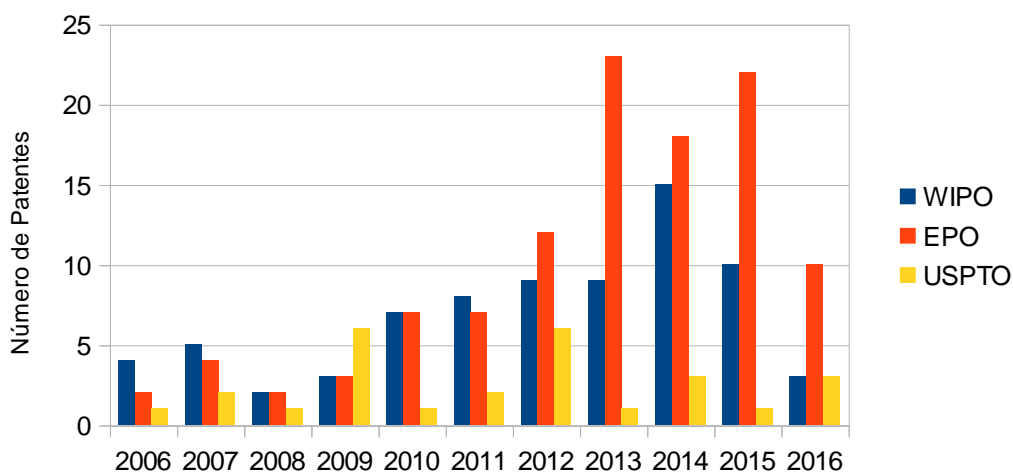


Figura 2. Evolução anual de depósitos de patentes contendo os termos ciclodextrina e óleo essencial depositados nos escritórios da *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e *European Patent Office* (EPO).

A WIPO, ao lado do USPTO representa a segunda agência em número de depósitos com os termos aplicados, ficando atrás do EPO, demonstrando que os detentores de patentes estão buscando a proteção patentária em diversos mercados.

Analisando a Figura 3, observa-se que a China representa o país com o maior número de patentes depositadas contendo os termos CD e OE ou CD e AF, com 60 e 12 patentes respectivamente. Além disto, este país possui a única patente identificada contendo a combinação dos descritores CD, OE e AF na WIPO (Tabela 1), demonstrando que este país é o mercado que mais busca inovar nesta área de pesquisa. Esta patente refere-se à tecnologia de preparo de palmilhas de algodão para calçados contendo complexos de inclusão dos óleos essenciais de limão, menta e laranja, com finalidade desodorizante e antifúngica. Tendo sido depositada pela Universidade de Ciência e Tecnologia de *Shaanxi* (TAISHENG, LUOSHA, 2015). Na tabela 1 também é possível identificar outras seis patentes depositadas no escritório americano com os termos CD, OE e AF, mas analisando o escopo das mesmas foi possível observar que estas não possuíam como principais características o uso de óleos essenciais ou a atividade antifúngica. Além disso, as duas patentes contendo os termos IC, EO e AF depositadas na WIPO são as mesmas identificadas para os termos CD, OE e AF.

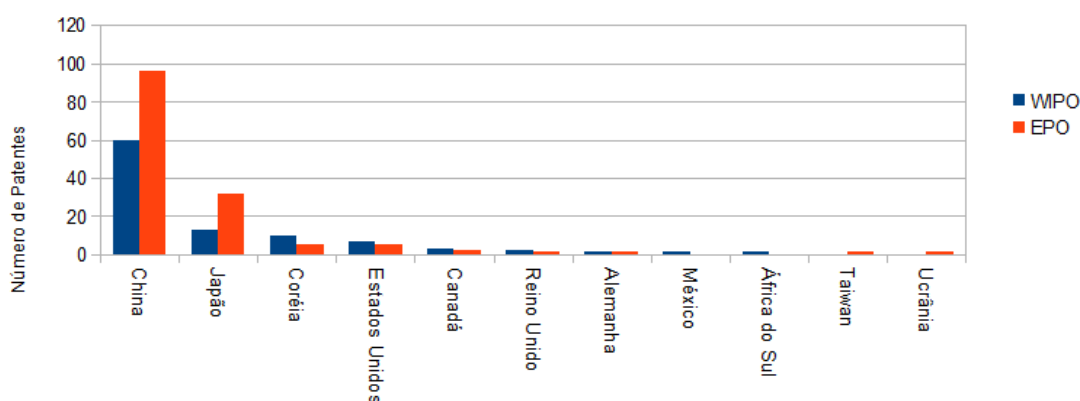
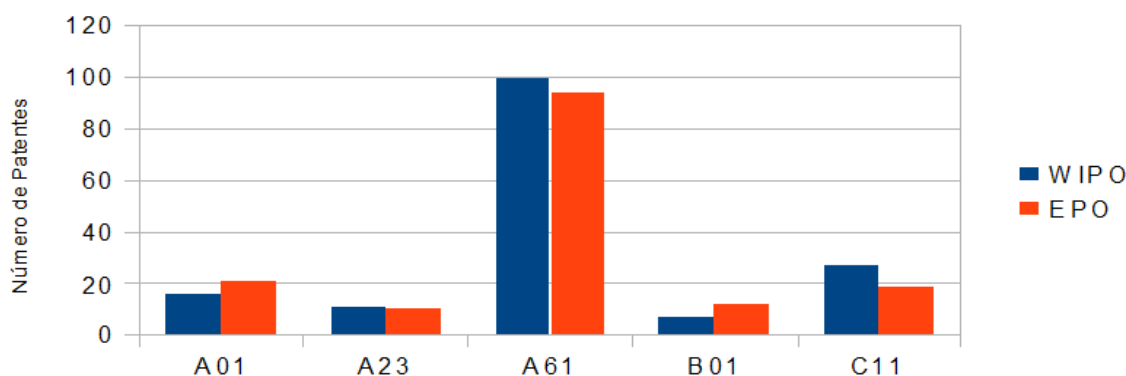


Figura 3. Número de patentes contendo os termos ciclodextrina e óleo essencial por país depositante no *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e *European Patent Office* (EPO).

Das duas patentes depositadas com os termos CD, EO e AF no escritório europeu (EPO) uma patente era de pesquisadores japoneses (NOBUYUKI, 1993), na qual descreve uma embalagem contendo ciclodextrina e o óleo essencial de *Alpinia speciosa*, com finalidade antifúngica e repelente e a outra patente foi depositada por pesquisadores chineses (XIWEN, et al.; 2013), demonstrando mais uma vez o interesse dos chineses em atuar nesta área de inovação. Esta última invenção representa um método para preparação de uma película biodegradável para computadores, com proteção contra radiação, contendo compostos bactericidas, microencapsulados em ciclodextrinas.

Outro dado importante é o número de patentes voltadas para as necessidades humanas, dentre elas, as ciências médicas e veterinária, alimentos e higiene (Figura 4), o qual é diretamente correlacionado com as atividades antimicrobianas, antifúngicas e aromáticas dos OE.



A01 – Agricultura; silvicultura; criação animal; caça; pesca.

A23 – Alimentos ou gêneros alimentícios; seu tratamento, não abrangidos por outras classes.

A61 – Ciência médica ou veterinária; higiene.

B01 – Processos físicos ou químicas ou aparelho em geral.

C11 – Óleos animais ou vegetais, gorduras, substâncias graxas ou ceras; ácidos dos mesmos; detergentes; ceras.

Figura 4. Número de patentes de acordo com o Código Internacional de Patentes contendo os termos ciclodextrina e óleo essencial depositado no *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e *European Patent Office* (EPO).

No Brasil, um país com enorme diversidade de plantas aromáticas, a maior parte das pesquisas científicas são realizadas por universidades públicas, muitas vezes sem a preocupação de proteger suas invenções por patentes, não sendo identificada nenhuma patente registrada nas bases EPO, WIPO e USPTO de inventores brasileiros, embora tenham sido encontrados 15 patentes depositadas no INPI (Tabela 1), das quais 13 destas patentes foram depositadas pela Universidade Federal de Sergipe e duas patentes depositadas pela Universidade Federal do Piauí. Embora nenhuma destas patentes descrevem a utilização de complexos de inclusão com óleos essenciais com propriedades antifúngicas. Os dados revelam, ainda, o baixo poder de inovação nacional quando comparado à China, Japão, Coreia, Estados Unidos e países europeus.

Ainda no Brasil, para normatizar e fomentar o processo de inovação nacional, o governo promulgou a Lei nº 10.973/2004 (BRASIL, 2004) que trata do relacionamento entre Universidades e Empresas, também chamadas de Lei de Inovação Tecnológica, sendo esperado dentro de alguns anos o aumento do número de pedido de depósito de patentes nacionais, aumentando sua competitividade tecnológica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais podem tornar-se uma alternativa aos antifúngicos sintéticos, especialmente após a melhoria de suas propriedades físico-químicas através do preparo de complexos de inclusão com as ciclodextrinas.

Observou-se um elevado número de patentes depositadas contendo os termos ciclodextrina, óleo essencial ou antifúngico em todas as bases de patentes. Entretanto, o número de patentes contendo a associação dos termos são bastante reduzidos, demonstrando que ainda existe um grande potencial de pesquisa e inovação nesta área.

Nas bases pesquisadas, apenas uma patente descreve a aplicação do complexo de inclusão de óleo essencial (*Alpinia speciosa*) com finalidade antifúngica para aplicação alimentícia e que os países que mais depositam patentes são a China, Japão, Coréia e Estados Unidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, U. N.; DE LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; DE FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; DE ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, p. 50-55, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v37n1/10.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422014000100010>.

ALVARENGA, I. C. A.; LOPES, O. D.; PACHECO, F. V.; OLIVEIRA, F. G.; MARTINS, E. R. Fator de resposta do alecrim-pimenta a diferentes lâminas de irrigação. **Pesq. Agropec. Trop.**, v.42, p.462-468, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632012000400006&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 29 ago. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632012000400006>.

ASTRAY, G.; MEJUTO, J.C.; MORALES, J.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. **Food Research International**, v.43, p.1212-1218, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910000773>>. Acesso em: 29 ago. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.017>.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, p.588-594, 2009. Disponível em:

<<http://submission.quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/2009/vol32n3/04-QN09038.pdf>> Acesso em: 29 ago. 2016.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIQUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.533-538, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/asagr/v32n3/a22v32n3.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2016. doi: 10.4025/actasciagron.v32i3.3415.

BRASIL. República Federativa do Brasil (2004), **Lei nº 10.973**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 3 dez. 2004. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm>. Acesso em: 16 abr. 2016.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; COSTA, L. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAN, E. S.; BRANT, R. S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.80-89, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v12n1/v12n1a12.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000100012>.

COSTA, P.; MEDRONHO, B.; GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v.70, p.341-346, 2015. Acesso em: 01 out. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.065>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Codex Alimentarius** - Cereals, Pulses, Legumes and Vegetable Proteins. Rome, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>>. Acesso em: 29 out. 2014.

FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. **Postharvest Biology and Technology**, v.78, p.133-138, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0925521412002700/1-s2.0-S0925521412002700-main.pdf?_tid=2516b236-d75d-11e6-8c9d-00000aacb35e&acdnat=1484070753_760f5b66c973cb4004e405a61a45e752>. Acesso em: 01 out. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.004>.

FU, Y.; SARKAR, P.; BHUNIA, A. K.; YAO, Y. Delivery systems of antimicrobial compounds to food. **Trends in Food Science & Technology**, v.57, p.165-177, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441630067X>>. Acesso em: 28 out. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.013>.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; PONTES, A. L. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F. BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology** v.214, p.168–178, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515300969>>. Acesso em: 24 ago. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.009>.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; SANTOS, M. M. F.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F. BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. **International Journal of Food Microbiology** v.34, p.112–121, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856416000138>>. Acesso em: 24 fev. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.01.008>.

JOIA, L. A. Medindo o capital intelectual. **Revista de Administração de Empresas**, v.41, p.54-63, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rae/v41n2/v41n2a06.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-75902001000200006>.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; RUELLAN, S.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v.118, p.156-164, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714011187>>. Acesso em: 04 dez. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.073>.

MORRIS, P. **Smoking composition and method of imparting flavour thereto**. GB963378A. 08-07-1964. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19640708&DB=EPODOC&locale=en_EP&CC=GB&NR=963378A&KC=A&ND=4#>. Acesso em: 18 abr. 2015.

NGUEFACK, J.; LEKAGNE DONGMO, J. B.; DAKOLE, C. D.; LETH, V.; VISMER, H. F.; TORP, J.; GUEMDJOM, E. F. N.; MBEFFO, M.; TAMGUE, O.; FOTIO, D.; AMVAM ZOLLO, P. H.; NKENGFACK, A. E. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi **International Journal of Food Microbiology**, v.131, p.151-156, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050900107X>>. Acesso em: 16 nov. 2015. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.009.

NOBUYUKI, S. **Resin, resin molding and coating material each containing insect-repellent antifungal substance**. JPH05202229. 10-08-1993. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19930810&DB=&locale=en_EP&CC=JP&NR=H05202229A&KC=A&ND=4#>. Acesso em: 18 abr. 2015.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P. KUMAR, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.114-119, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510003375>>. Acesso em: 28 mar. 2015. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.011.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250-264, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014005196>>. Acesso em: 11 dez. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>.

TAISHENG, G.; LUOSHA, F. **Preparation method for antifungal and deodorized insole**. CN104921406. 06-07-2015. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20150923&DB=&locale=en_EP&CC=CN&NR=104921406A&KC=A&ND=5#>. Acesso em: 28 ago. 2016.

United Nations Commodity Trade Statistics Database. Disponível em: <http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_11Code%3a34>. Acesso em 29 ago. 2016.

XIWEN, Z.; CANXIN, C.; SONGYA, P.; ZHIGANG, L.; ZHENGYU, J.; JINPENG, W.; XING, Z.; AIQUAN, J.; JIANWEI, Z.; YAOQ, T. **Preparation method of degradable and radiation-protection computer screen film with rose fragrance**. CN103265795. 28-08-2013. Disponível em:

<https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20130828&DB=&locale=en_EP&CC=CN&NR=103265795A&KC=A&ND=5#>. Acesso em: 18 abr. 2015.

Capítulo 2

Artigo que será submetido ao Periódico: Bioscience Journal

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA NA CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS AROMÁTICAS

Márcio dos Santos Rocha^{1,*}, Larisse Carneiro da Frota Brito², Francisco Rodrigues Leal³, Sidney Gonçalo de Lima⁴, Maria Christina Sanches Muratori^{1,2,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP. 64.055-450, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: msrocha@ufpi.edu.br. *Autor para correspondência.

²Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁵Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br.

RESUMO

O método padrão para análise dos óleos essenciais é a cromatografia em fase gasosa, entretanto, os métodos preconizados são de longa duração, o que aumenta os custos analíticos. Diversos fatores influenciam na duração da análise cromatográfica, como a característica da coluna cromatográfica, o fluxo do gás de arraste e a temperatura. No presente trabalho, o aumento de 1,0°C na taxa de aquecimento da coluna cromatográfica, ocasionou a redução do tempo de análise em 30 minutos, sem alterar a separação cromatográfica dos componentes

individuais dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*, permitindo a identificação dos seus constituintes com apenas 42 minutos de análise cromatográfica, utilizando um sistema cromatográfico acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução.

Palavras-chave: *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*.

ABSTRACT

The standard method for the analysis of essential oils is gas chromatography. However, the recommended methods are long lasting, which increases analytical costs. Several factors influence the duration of the chromatographic analysis, such as the characteristic of the chromatographic column, the flow of the carrier gas and the temperature. In the present work, the increase of 1.0 ° C in the heating rate of the chromatographic column, reduces the duration of the analysis in 30 minutes, without altering the chromatographic separation of the individual components of the essential oils of *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon citratus*, allowing the identification of its constituents with only 42 minutes of chromatographic analysis, using a chromatographic system coupled to a high resolution mass spectrometer.

Key words: *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon citratus*.

1. Introdução

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas, biossintetizadas por plantas aromáticas. Geralmente são odoríferos, líquidos, instáveis à temperatura ambiente, à luz e ao oxigênio, que se decompõem ou tornam-se resinosos nestas condições (KFOURY et al., 2016). Os OE desempenham um importante papel na proteção das plantas devido a suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e inseticidas, além de favorecerem a dispersão de pólenes e sementes, atração de insetos e protegê-las de herbívoros (BAKKALI et al., 2008). São utilizados na indústria de cosméticos por suas propriedades aromáticas, na indústria alimentícia como conservantes e na indústria farmacêutica como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e espasmolíticos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; KFOURY et al., 2016).

Na indústria farmacêutica, a análise dos componentes voláteis é realizada por cromatografia em fase gasosa, conforme descrito nas farmacopeias. No Brasil, os métodos preconizados pela farmacopeia brasileira possuem entre 80 e 110 minutos de duração (FARMACOPÉIA, 2010). Por outro lado, Adams (2007), padronizou a identificação de uma série contendo 2.205 compostos voláteis a partir da utilização de um método cromatográfico com 72 minutos de duração, baseado na normalização dos tempos de retenção das substâncias desconhecidas com os tempos de retenção determinados para uma série de n-alcenos, permitindo a comparação dos valores obtidos com aqueles calculados para a mesma amostra analisada em diferentes condições analíticas (ZELLNER et al., 2008). Assim, a duração de uma análise cromatográfica pode ser diminuída sem comprometer a identificação dos componentes de uma amostra, através da modificação de diversos fatores, como o comprimento e a temperatura da coluna, pressão do gás de arraste, técnicas de injeção ou a temperatura do forno (SEQUINEL et al. 2010), permitindo o aumento do número de análises cromatográficas realizadas com a diminuição do custo analítico. Pelo exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da temperatura da coluna cromatográfica na caracterização dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas as partes aéreas de *Origanum majorana* (manjerona), *Mentha arvensis* (viqui), *Lippia alba* (erva cidreira), *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e *Cymbopogon citratus* (capim cidreira, capim limão). As amostras foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e

Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Teresina PI (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W), nos meses de setembro e outubro de 2015 (Figura 1). A temperatura, insolação e a chuva acumulada durante os meses de coleta foram obtidos no sítio do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2016).



Figura 1. a) Visão geral do canteiro do Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal do Piauí. Partes aéreas de: b) *Lippia alba*. c) *Ocimum basilicum*. d) *Origanum majorana*. e) *Mentha arvensis*. f) *Cymbopogon citratus*. Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

2.2 Extração dos óleos essenciais (AGUIAR et al., 2015)

Os óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC). Os OE foram extraídos a partir de 250 g das partes aéreas frescas durante três horas um aparelho tipo *Clevenger*. Após extração foi acrescentado sulfato de sódio anidro q.s.p. ao óleo para secagem e assim permaneceu por aproximadamente 30 minutos. Na sequência, o óleo sobrenadante foi transferido e armazenado em frasco âmbar, em seguida o óleo essencial foi pesado para cálculo do rendimento e armazenado sob refrigeração (4,0°C) até o momento das análises.

2.3 Caracterização dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

Os óleos essenciais de OEOM, OEMA, OELA, OEOb e OECC foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), conforme o método proposto por Adams (2007), utilizando um cromatógrafo da marca *Shimadzu*, modelo MDGC 2010, coluna capilar apolar RTx-5MS, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 μm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1,0 mL.min⁻¹ e modo de divisão 1/100. A temperatura do injetor e do detector foi ajustada respectivamente para: 220 °C e 250 °C. A temperatura da coluna foi programada de 60 °C a 246 °C a uma taxa de aquecimento de 3,0 °C.min⁻¹, permanecendo 10 minutos na temperatura final.

Os espectros de massas foram gravados na faixa de 47 a 500 m/z, e o volume injetado foi de 1 μL . Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa e a composição percentual foi obtida a partir da medida da integração das áreas sobre os picos. O Índice de retenção linear foi determinado a partir da injeção de padrões de n-alcenos contendo de oito a 20 átomos de carbono, utilizando a equação de Van Den Dool e Dee Kratz (1963), permitindo a identificação de compostos com padrões de fragmentação muito semelhantes. Os espectros de massas foram considerados coincidentes para um índice de similaridade superior a 95% (MEDEIROS et al., 2012; AGUIAR et al., 2015).

2.4 Avaliação da temperatura da coluna cromatográfica na caracterização dos óleos essenciais através de cromatógrafo em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

Para avaliar a influência da temperatura da coluna cromatográfica na caracterização dos óleos essenciais extraídos, alterou-se o método proposto por Adams (2007) da seguinte forma: a temperatura inicial da coluna foi programada para 50 °C com taxa de aquecimento de 4,0 °C.min⁻¹ até 180 °C. Em seguida, alterou-se a taxa de aquecimento para 10 °C.min⁻¹ até 260 °C, permanecendo 10 minutos nesta temperatura. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) da marca Waters, modelo GCT Premier, utilizando uma coluna capilar apolar DB-5MS, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 μm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1 mL.min⁻¹ e modo de divisão 1/10. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas em 270 °C e 290 °C, respectivamente e o volume injetado foi de 1 μL .

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, utilizando a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI), com energia de ionização de 70 eV a voltagem do detector foi ajustada para 2.500 V. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de massa de m/z 45-650. Heptacosfluorotributilamina foi utilizado como calibrante. A resolução de massa foi ajustada para cerca de 7000 FMWH para a massa m/z 218,9856 (*lock mass*). Os dados foram adquiridos utilizando *software MassLynx*TM versão 4.1. Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massas, determinada com auxílio do *software ChromaLynx*TM.

A composição percentual foi obtida a partir da medida da integração das áreas sobre os picos (AGUIAR et al., 2015). A identificação dos picos observados nos cromatogramas foi realizada considerando os seguintes itens: (1) busca no banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (versão 11.0), e (2) comparação do valor m/z experimental para o íon molecular com o valor de m/z calculados para os compostos candidatos resultantes da pesquisa na base de dados NIST. As identificações positivas requereram uma correspondência acima de 900 (*Match*) na pesquisa da base de dados do NIST e um desvio de $\pm 1,0$ mDa entre a massa monoisotópica experimental para o íon molecular e a massa teórica monoisotópica para compostos de até 200 Daltons, compostos com massas superiores podem ter variações de $\pm 5,0$ ppm. Quando não foi possível identificar o íon molecular, o cálculo de erro de massa foi determinado para o fragmento principal (JERNBERG, PELLINEN, RANTALAINEN, 2013).

As massas exatas para os fragmentos observados foram calculadas utilizando a função *Elemental Composition* do *software MassLynx*, versão 4.1. Quando mais de um composto preencheram as condições anteriores, o pico cromatográfico foi atribuído àquele que apresentou melhor correspondência com a base de dados NIST e com melhor correspondência com o índice de retenção linear (MEDEIROS et al., 2012; AGUIAR et al., 2015).

3. Resultados e Discussão

Durante o período de coleta das amostras, pode-se observar que as condições climáticas no município de Teresina foram relativamente constantes, com predominância de elevados índices de temperaturas e de insolação e baixo índice pluviométrico (Tabela 1). Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger (2016), o município de Teresina encontra-se na grande região climática *aw* que engloba grande parte do Norte, Nordeste e Centro-Oeste brasileiro, com clima tropical de Savana (KÖPPEN-GEIGER, 2016). Nestas condições climáticas adversas, a

capacidade biossintética dos vegetais pode ser alterada. Desta forma, para reduzir o desconforto térmico e suprir as exigências hídricas, as plantas foram irrigadas diariamente em dois turnos e receberam adubação adequada às suas necessidades fisiológicas, favorecendo seu desenvolvimento e a biossíntese de metabólicos secundários, como os óleos essenciais.

Tabela 1. Variáveis climáticas do município de Teresina, PI, Brasil, no período de setembro a outubro de 2015.

Temperatura Diária (°C)		Dias observados (n)		Total
		Setembro	Outubro	
Mínima	20 a 25	29	28	57
	25 a 30	1	3	4
Médio	25 a 30	29	11	40
	30 a 35	1	20	21
	30 a 35	0	1	1
Máximo	35 a 40	30	28	58
	40 a 45	0	2	2
Insolação (horas)		Dias observados (n)		Total
		Setembro	Outubro	
10 a 12		5	22	27
8 a 10		14	7	21
6 a 8		10	1	11
4 a 6		1	0	1
2 a 4		0	0	0
0 a 2		0	1	1
Total		30	31	61
Chuva acumulada (mm)		Dias observados (n)		Total
		Setembro	Outubro	
25 a 30		0	1	1
20 a 25		0	0	0
15 a 20		0	0	0
10 a 15		0	0	0
5 a 10		1	0	1
0 a 5		29	30	59
Total		30	31	61

A extração dos óleos essenciais das partes aéreas de *O. majorana*, *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* obtiveram um rendimento bastante variado (Tabela 2). De um modo geral, a extração do óleo essencial de *M. arvensis* apresentou rendimento superior (Tabela 2) ao encontrado por Bose e colaboradores (2013) o qual obteve um rendimento de 0,7% para *M. arvensis* em condições normais de cultivo. De acordo com Castelo, Del Menezzi e Resck (2012) durante a estação seca a produção de óleos essenciais pode aumentar, devido ao estímulo fisiológico das plantas a adaptação às condições climáticas mais severas. Este resultado sugere que as condições de cultivo em Teresina (Tabela 1), mesmo com a utilização da irrigação, podem

ter favorecido a capacidade de síntese de óleo essencial das plantas *M. arvensis* e *L. alba* (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimento das extrações dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* por hidrodestilação, coletadas no município de Teresina, PI.

ESPÉCIE	RENDIMENTO (%)
<i>Origanum majorana</i>	0,2
<i>Mentha arvensis</i>	1,1
<i>Lippia alba</i>	0,7
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,4
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,5

O perfil cromatográfico dos óleos essenciais pesquisados, a programação do forno do cromatógrafo e a temperatura de eluição dos compostos majoritários estão demonstrados na Figura 2. Nesta figura é possível observar uma boa separação cromatográfica, sem coeluição, obtida em um equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

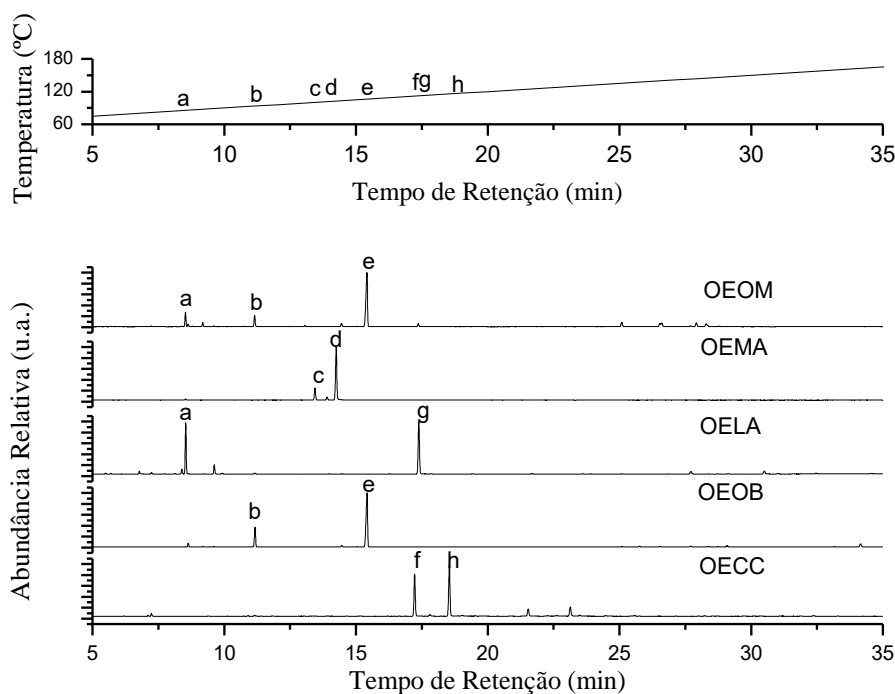


Figura 2. Programação do forno do cromatógrafo gasoso e perfil cromatográfico dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOb) e *Cymbopogon citratus* (OECC), coletados no município de Teresina, Piauí, Brasil. Constituintes majoritários: (a) L-limoneno, (b) linalol, (c) isomentona, (d) L-mentol, (e) estragol, (f) Z-citral, (g) L-carvona, (h) geranial. Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

Adams (2007) padronizou a análise cromatográfica, cujo método tem duração de 72 minutos, entretanto, pode-se constatar que em 30 minutos todos os constituintes dos óleos essenciais das plantas estudadas já haviam eluído (Figura 2). Desta forma, a duração da análise cromatográfica pode ser diminuída pela modificação do comprimento e temperatura da coluna, pressão do gás de arraste e técnicas de injeção. Entretanto, devido à facilidade técnica, as variáveis mais comumente modificadas são a temperatura do forno, o fluxo e a pressão do gás de arraste (SEQUINEL et al. 2010). No presente estudo, a alteração da taxa de aquecimento do forno de 3,0°C para 4,0 °C por minuto, reduziu a duração da análise para 42 minutos (Figura 3) sem interferir na separação cromatográfica dos compostos estudados. A redução em 30 minutos do tempo de análise favorece a diminuição dos custos em: energia elétrica, consumo de gás, vida útil de consumíveis e tempo de operação, permitindo o aumento da capacidade analítica do laboratório, sem comprometer a identificação dos constituintes analisados.

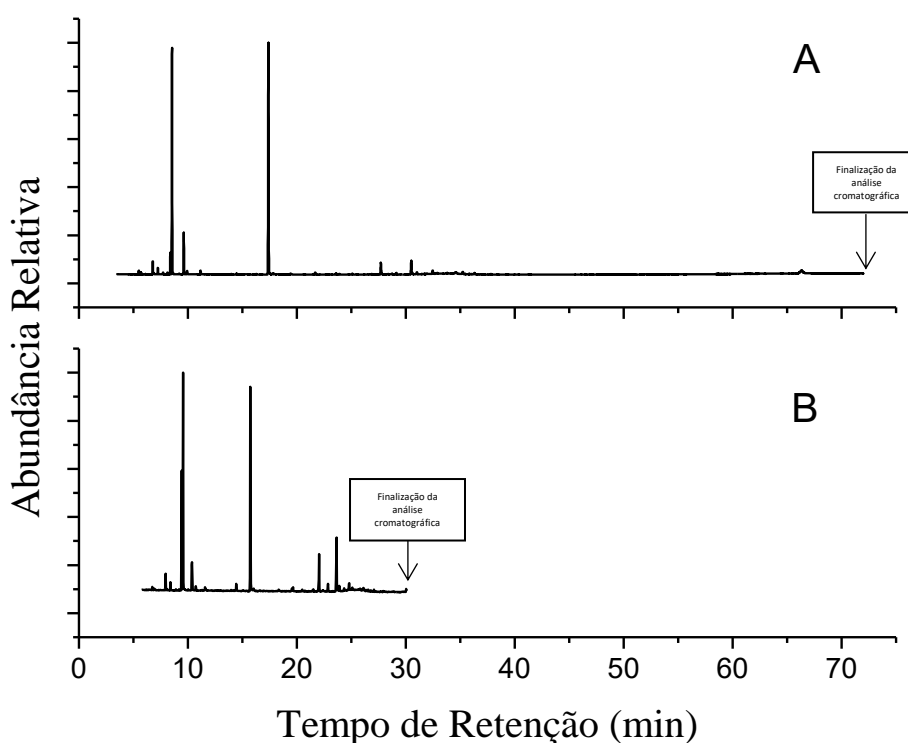


Figura 3. Comparação do (A) perfil cromatográfico obtido pelo método preconizado por Adams (2007) e (B) método modificado para o óleo essencial de *Lippia alba*, coletado no município de Teresina, Piauí, Brasil. Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

Dos 71 constituintes presentes nos óleos essenciais foi possível realizar a identificação de 63 componentes dos óleos essenciais de *O. majorana*, *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* foi realizada pela comparação dos seus índices de retenção linear, espectros de massas (CG-EM e CG-EMAR) e injeção de padrões (Tabela 3).

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa dos constituintes química dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina, PI.

Índice de Retenção	Composto	Método de Identificação	OEOM (%)	OEMA (%)	OELA (%)	OEOB (%)	OECC (%)
923	α -tujeno	1,4	0,1	-	-	-	-
930	α -pineno	1,4	0,3	0,2	0,3	0,1	-
943	Canfeno	1,4	0,1	-	-	-	-
963	Sabineno	1,4	0,1	0,1	1,7	0,1	-
968	β -pineno	1,4	0,2	0,3	-	0,3	-
-	NI	-	-	-	-	-	0,6
979	Mirceno	1,4	0,4	0,2	0,8	0,1	1,7
992	α -felandreno	1,4	-	-	0,3	-	-
1006	α -terpineno	1,4	0,1	-	0,3	-	-
1015	<i>p</i> -cimeno	1,4	0,4	-	3,1	0,1	-
1019	L-limoneno	1, 2, 3, 4	8,7	1,4	32,0	0,3	-
1023	1,8-cineol	1,4	1,7	-	0,2	2,9	-
1028	<i>cis</i> -ocimeno	1,4	0,3	-	-	-	-
1041	<i>Trans</i> -beta-ocimeno	1,4	2,5	-	-	0,3	-
1054	γ-terpineno	1, 2, 4	0,6	-	6,1	0,3	-
1061	Hidrato de <i>Cis</i> -sabineno	1,4	-	-	-	0,2	-
1068	Hidrato de <i>Trans</i> -sabineno	1,4	-	-	0,5	-	-
1088	D-fenchona	1,4	-	-	-	0,2	-
1090	α -terpinoleno	1,4	0,3	-	-	-	-
-	NI	-	-	-	-	-	0,4
1104	Linalol	1, 2, 4	7,5	-	0,7	18,1	0,7
1161	Isopulegol	1,4	-	0,2	-	-	-
1163	Cânfora	1, 3, 4	0,9	-	-	-	-
1172	Isomentona	1, 2, 4	-	16,6	-	-	-
1153	Citronelal	1,4	0,1	-	-	-	-
1186	<i>p</i> -mentona	1,4	-	4,5	-	-	-
1197	L-mentol	1, 2, 3, 4	-	75,5	-	-	-
1207	4-terpineol	1,4	2,5	-	-	1,7	-
1224	β -fenchil álcool	1,4	0,3	-	-	0,3	-
1238	Estragol	1, 2, 4	51,8	-	-	64,4	-
1249	Octil acetato	1,4	-	-	-	0,1	-
1240	Z-citral	1, 2, 4	-	-	-	-	33,3
1242	L-carvona	1, 2, 4	2,1	-	43,5	-	-
1255	<i>Trans</i> -geraniol	1,4	-	-	-	-	1,4
1282	Piperitona	1,4	-	0,43	0,21	-	-
1270	Geranial	1, 2, 4	-	-	-	-	41,9
-	NI	-	-	-	-	-	0,7
1288	Iso-bornil acetato	1,4	0,1	-	-	-	-
1296	Pregeijereno	1,4	-	-	0,1	-	-
1305	2-undecanona	1,4	-	-	-	-	0,4
1294	Iso-mentil-acetato	1,4	-	0,5	-	-	-
1315	Geranil formato	1,4	-	-	-	-	0,2
-	NI	-	-	-	-	-	5,9
1342	Piperitenona	1,4	-	-	0,4	-	-
1362	Ácido gerânico	1,4	-	-	-	-	0,3

(continua)

Tabela 3. Composição qualitativa e quantitativa dos constituintes química dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina, PI. (continuação)

Índice de Retenção	Composto	Método de Identificação	OEOM (%)	OEMA (%)	OELA (%)	OEOB (%)	OECC (%)
-	NI	-	-	-	-	-	0,8
1385	Linalil acetato	1,4	-	-	-	-	8,4
1387	β -bourboneno	1,4	0,1	-	0,3	-	-
1394	β -elemeno	1,4	0,2	-	-	0,2	-
1422	β -cariofileno	1,3,4	-	0,1	0,2	-	-
1424	<i>Trans</i> -cariofileno	1,4	3,8	-	-	0,5	-
-	NI	-	-	-	-	-	0,8
1439	α -bergamoteno	1,4	0,1	-	-	0,8	-
1441	α -guaieno	1,4	-	-	-	0,2	-
1457	α -humuleno	1,4	3,0	-	-	0,8	-
1461	β -farneseno	1,4	3,2	-	-	-	-
1466	epi-biciclo-sesquifelandreno	1,4	-	-	-	0,2	-
1487	Germacrene D	1,4	0,8	0,3	2,6	0,9	-
1493	β -selineno	1,4	3,6	-	-	-	-
1492	2-tridecanona	1,4	-	-	-	-	0,4
1501	Biciclogermacreno	1,4	-	-	-	0,7	-
1503	α -selineno	1,4	3,3	-	-	-	-
1510	δ -guaieno	1,4	0,3	-	-	0,5	-
1503	Germacrene A	1,4	-	-	0,2	-	-
1514	β -bisaboleno	1,4	0,5	-	-	-	-
1518	γ -cadineno	1,4	-	-	-	1,5	-
1527	<i>cis</i> -calameneno	1,4	-	-	-	0,1	-
1553	Elemol	1,4	-	-	3,0	-	-
1565	<i>cis</i> -nerolidol	1,4	-	-	0,4	-	-
-	NI	-	-	-	-	-	0,6
-	NI	-	-	-	-	-	0,8

Óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC). Caracterização obtida por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (1), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (2), injeção de padrões (3) e cálculo do índice de Kovat's (4).

Dentre os compostos identificados, os mais representativos foram: limoneno, linalol, estragol, *p*-mentona, isomentona, mentol, L-carvona *Z*-citrinal e geranial (Tabela 3 e Figura 4). Pode-se constatar que a composição química dos óleos essenciais estudados difere qualitativa e quantitativamente da obtida por outros pesquisadores, podendo ter sido afetada por: diferença de quimiotipos, condições geográficas e climáticas, parte da planta utilizada, ciclo vegetativo, condições de coleta e método de extração (PRAKASH, et al., 2011; MEDEIROS, et al., 2012; HÜE, et al., 2015). Esses fatores podem causar oscilações expressivas na composição dos óleos, dificultando a reprodução de alguns estudos (AGUIAR et al., 2015). A espécie *O. majorana* foi

pesquisada por Vera e Chane-Ming (1999) em *Saint-Paul*, França e os autores determinaram que esta espécie pode apresentar dois quimiotipos: um com predominância de álcoois monoterpênicos como o 4-terpineol, hidrato de *cis* e *trans*-sabineno e outro quimiotipo rico em compostos fenólicos como: timol e carvacrol. No presente estudo, o óleo essencial de *O. majorana* apresentou quimiotipo fenólico, entretanto, o componente majoritário encontrado foi o estragol (51,8%), demonstrando que embora pertença ao quimiotipo citado por Vera e Chane-Ming (1999) as variações ambientais e geográficas do local de coleta da planta podem justificar a diferença observada.

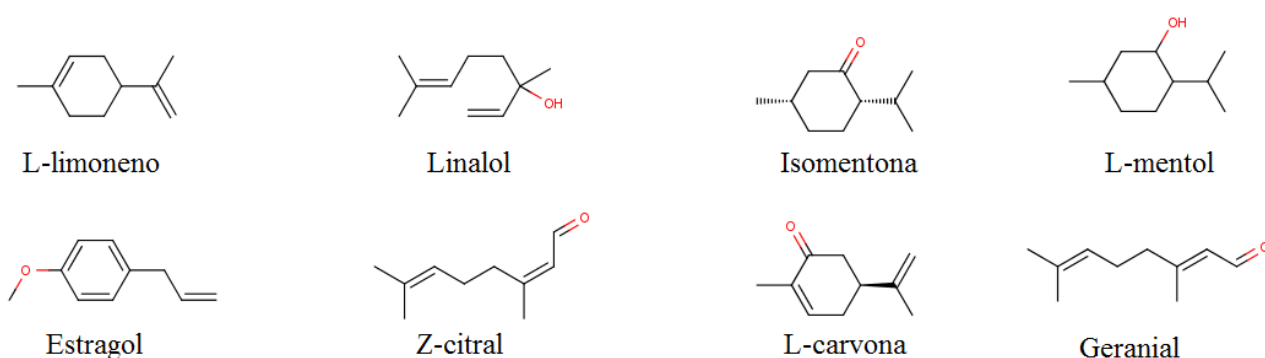


Figura 4. Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus*, coletados no município de Teresina, Piauí, Brasil. Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

A caracterização dos constituintes químicos dos óleos essenciais permite inferir seu potencial biológico e outras aplicações como repelentes, flavorizantes, antioxidantes e conservantes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Em especial os óleos essenciais extraídos das espécies *O. majorana*, *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* coletadas no horto teresinense possuem elevada porcentagem de compostos hidroxilados, aldeídos e fenólicos em suas composições (Tabela 3 e Figura 4). Estes compostos oxigenados são capazes de formar ligações de hidrogênio com enzimas das membranas bacterianas e fúngicas, alterando sua rigidez, integridade e permeabilidade, ocasionando sua ruptura e morte celular (CABRAL, PINTO, PATRICARCA, 2013; RAUT; KARUPPAYIL, 2014), permitindo inferir um potencial antimicrobiano dos óleos essenciais estudados.

Alguns constituintes dos óleos essenciais também possuem efeito antiviral, antimutagênico, hipoglicemiante, antiprotozoário e anti-inflamatório (RAUT; KARUPPAYIL, 2014), além de inibirem a proliferação de células tumorais, induzindo-as a necrose e apoptose (BAKKALI, et al., 2008). Destes compostos, o Z-citral é um componente modulador que atua como anticancerígeno para tumores de pele (PUATANACHOKCHAI, et al, 2002) e de mama (KAPUR, 2016) e foi encontrado como componente majoritário no OECC (Tabela 3) sugerindo que os óleos essenciais pesquisados também podem ser avaliados como promissores agentes anticancerígenos.

Outra possível atividade biológica das espécies aromáticas pesquisadas é seu potencial antioxidante. Esta propriedade apresenta destaque, pois as espécies do presente estudo são utilizadas como especiarias no preparo de alimentos, consistindo em uma das principais fontes de antioxidantes naturais da dieta humana. A atividade antioxidante dos óleos essenciais está relacionada principalmente a presença de compostos fenólicos e seus derivados (DEL RÉ, JORGE, 2012). Desta classe de compostos, o estragol é considerado seguro pelo Departamento de Alimentos e Medicamentos norte-americano (CFR, 2016), tendo sido, ainda, o principal componente identificado nas espécies de *O. majorana* e *O. basilicum* coletadas no horto da UFPI.

Ainda no ramo farmacêutico, o mentol, cineol e limoneno foram avaliados como adjuvantes promotores da permeabilidade cutânea para substâncias ativas farmacêuticas (AMNUAIKIT et al. 2005; RASOOL et al., 2011; VALGIMIGLI, et al., 2012). Destes constituintes, o mentol e cineol foram identificados nos óleos essenciais de *M. arvensis*, *O. majorana*, *O. basilicum* e *L. alba* e, o limoneno identificado nos óleos essenciais de *O. majorana* e *L. alba* em elevada abundância, podendo ser avaliados como veículos de formulações farmacêuticas transdérmicas, demonstrando mais uma vez o potencial farmacológico das espécies de plantas estudadas.

4. Conclusões

A composição dos óleos essenciais das plantas pesquisadas varia conforme a espécie. Para o *Origanum majorana* os componentes majoritários identificados foram o limoneno (8,7%), linalol (7,5%) e estragol (51,8%); *Mentha arvensis* possui como componentes majoritários a isomentona (16,6%) e mentol (75,6%); *Lippia alba*, L-limoneno (32,0%) e L-carvona (43,5%);

Ocimum basilicum, linalol (18,1%) e estragol (64,4%) e *Cymbopogon citratus*, Z-citral (33,3%) e geranial (41,9%). Além disso, o aumento de 1,0 °C na razão de aquecimento da coluna não alterou a identificação dos constituintes dos óleos essenciais, bem como reduziu a duração da análise em 30 minutos, sem alterar a separação cromatográfica na determinação dos óleos essenciais de *Origanum majorana*; *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum*, e *Cymbopogon citratus*, reduzindo o custo de análise permitindo a realização de um maior número de análises.

5. Referências bibliográficas

ADAMS, R.P.; **Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.

AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; CITÓ, A. M. G. L.; SOUSA, A. J. P.; SILVA, R. M.; SILVA, I. S. A.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and modulation of antibiotic activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products** (Print), v. 74, p. 165-170, 2015.

AMNUAIKIT, C.; IKEUCHI, I.; OGAWARA, K.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.289, p.167-178, 2005.

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

BOSE, S. K.; YADAV, R. K.; MISHRA, S.; SANGWAN, R. S.; SINGH, A. K.; MISHRA, B.; SRIVASTAVA, A. K.; SANGWAN, N. S. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.66, p.150-158, 2013.

CABRAL, L. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p.1-14, 2013.

CASTELO, A. V.M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two brazilian native arbustive species.

Journal of Applied Sciences, v.12, p.753-760, 2012.

CFR – **Code of Federal Regulations**. Part 182 – Substances generally recognized as safe. 2016.

<http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text->

[idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#sp21.3.182.a](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#sp21.3.182.a), acessado em 01/11/2016.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.389-399, 2012.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

HÜE, T.; CAUQUIL, L.; FOKOU, J. B. H.; DONGMO, P. M. J.; BAKARNGA-VIA, I.; MENUT, C. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Parasitology Research**, v.114, p.91-99, 2015.

INMET – **Instituto Nacional de Metereologia**, 2016. Extraído de:

http://www.inmet.gov.br/sim/abre_graficos.php, acessado em 22 de novembro de 2016.

JERNBERG, J.; PELLINEN, J.; RANTALAINEN, A. Qualitative nontarget analysis of landfill leachate using gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, v.103, p.384-391 2013.

KAPUR, A.; FELDER, M.; FASS, L.; KAUR, J.; CZARNECKI, A.; RATHI, K.; ZENG, S.; OSOWSKI, K. K.; HOWELL, C.; XIONG, M. P.; WHELAN, R. J.; PATANKAR, M. S. Modulation of oxidative stress and subsequent induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress allows citral to decrease cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v.6, DOI: 10.1038/srep27530, 2016.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. **Analytica Chimica Acta**, v.918, p.21-25, 2016.

KÖPPEN-GEIGER. **World Maps of Köppen-Geiger climate classification**. 2016. Extraído de:

<http://koeppen-geiger.vu-wien.ac.at/>, acessado em 17 de novembro de 2016.

MEDEIROS, L. B. P.; ROCHA, M. S.; DE LIMA, S. G.; SOUSA JÚNIOR, G. R.; CITÓ, A. M. G. L.; SILVA, D.; LOPES, J. A. D.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; MOBIN, M.; COSTA, J. G. M. Chemical constituents and evaluation of cytotoxic and antifungal activity of *Lantana camara* L. essential oils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, p.1259-1267, 2012.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K.; KHARWAR, R. N. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**. v.44, p.385-390, 2011.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKETKUMNUEN, U.; NAKAE, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**. v.183, p.9-15, 2002.

RASOOL, B. K. A.; AZIZ, U. S.; SARHEED, O.; RASOOL, A. A. A. Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. **Acta Pharmaceutica**. v.61, p.271-282, 2011.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250-264, 2014.

SEQUINEL, R.; HATANAKA, R. R.; GUALTIERI, C. E.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E. E. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v.33, p.2226-2232, 2010.

VALGIMIGLI, L.; GABBANINI, S.; BERLINI, E.; LUCCHI, E.; BELTRAMINI, C.; BERTARELLI, Y. L. Lemon (*Citrus limon*, Burm.f.) essential oil enhances the trans-epidermal release of lipid- (A, E) and water- (B6, C) soluble vitamins from topical emulsions in reconstructed human epidermis. **International Journal of Cosmetic Science**, v.34, p.347-356, 2012.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v,11, p.463-471, 1963.

VERA, R. R.; CHANE-MING, J. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. **Food Chemistry**, p.66, p.143-145, 1999.

ZELLNER, B. A.; BICCHI, C.; DUGO, P.; RUBIOLO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, p.297-314, 2008.

Capítulo 3

Artigo que será submetido ao Periódico: Food Chemistry

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Ocimum basilicum* COM β -CICLODEXTRINA

**Márcio dos Santos Rocha¹, Larisse Carneiro da Frota Brito², Francisco Rodrigues Leal³,
Maria Christina Sanches Muratori^{1,4}**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP. 64.055-450, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: msrocha@ufpi.edu.br. *Autor para correspondência.

²Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br.

RESUMO

O óleo essencial de *Ocimum basilicum* possui componentes com atividade antimicrobiana, que inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos e toxigênicos, mostrando ser uma alternativa aos antifúngicos sintéticos na prevenção da deterioração dos alimentos. Entretanto, sua instabilidade térmica e sua baixa solubilidade aquosa limitam sua aplicação. No presente trabalho caracterizou-se o óleo essencial de *O. basilicum*, identificando seus compostos majoritários (Linalool e Estragol), preparou-se seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina pelo método de coprecipitação caracterizando-o por métodos cromatográficos e espectroscópicos. Determinou-se a melhor relação entre a massa do óleo essencial de *O. basilicum* e a massa da β -ciclodextrina (5:95) e, por fim determinou-se o aumento de sua estabilidade térmica pelo método de *headspace*.

Palavras-chave: *Headspace*, Estragol, Conservante, β -Dextrina de Schardinger.

ABSTRACT

The essential oil of *Ocimum basilicum* has components with antimicrobial activity, which inhibit the growth of phytopathogenic and toxigenic fungi, proving to be an alternative to synthetic antifungals in the prevention of food deterioration. However, its thermal instability and its low aqueous solubility limit its application. In the present work, we characterized the essential oil of *O. basilicum*, identifying its major compounds (Linalool and Estragole), prepared the inclusion complex with β -cyclodextrin by the coprecipitation method in addition to characterizing it by chromatographic and spectroscopic methods. We determined the best relationship between the mass of the essential oil of *O. basilicum* and the mass of the β -cyclodextrin (5:95) and, finally, we determined the increase of its thermal stability by the headspace method.

Key words: Headspace, Estragole, Preservative, Stability, Schardinger β -Dextrin.

Introdução

O mercado mundial de óleos essenciais movimenta aproximadamente 700 milhões de dólares por ano nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). De acordo com a base de dados americana *United Nations Commodity Trade Statistics Database* (2016), o Brasil exportou mais de 54 mil toneladas de óleos essenciais em 2015. Estando entre os quatro maiores produtores do mundo, principalmente pela produção de óleos cítricos que são subproduto da cadeia produtiva do suco de laranja (BIZZO, et al., 2009).

A comercialização mundial de óleos essenciais está em expansão devido a busca de produtos naturais como substitutos de conservantes sintéticos (KFOURY, et al., 2015; FU et al., 2016). O *Ocimum basilicum* (manjeriço) é uma espécie aromática cultivada no Brasil, cujo óleo essencial é utilizado em indústria alimentícia. Este óleo essencial também possui efeito anti-inflamatório (RODRIGUES et al., 2016), larvicida, repelente, antibacteriano, antioxidante, ansiolítico, antidepressivo e antitumoral (BILIAL et al., 2012; KHELIFA et al., 2012; BARCELOS et al., 2013; GOVINDARAJAN et al., 2013; PANDEY, SINGH, TRIPATHI, 2014; GRADINARIU et al., 2015). O óleo essencial de *O. basilicum* (OEOB) possui ainda atividade antifúngica para fungos fitopatogênicos (VIEIRA et al., 2014) e micotoxigênicos (DAMBOLENA et al., 2010).

O OEOB, possui como constituinte majoritário o estragol, substância considerada segura pelo Departamento de Alimentos e Medicamentos americano, tendo sua utilização autorizada como conservante e flavorizante de alimentos (CFR, 2016). Entretanto, a utilização

do estragol é limitada devido sua volatilidade e baixa solubilidade aquosa (KFOURY et al., 2015). Além disso, os demais constituintes dos óleos essenciais são instáveis à temperatura ambiente, à luz e ao oxigênio (KFOURY et al., 2016). Estas limitações podem ser contornadas por meio da sua complexação com as ciclodextrinas (CD), tornando-os mais estáveis física e quimicamente, ampliando sua utilização (KFOURY et al., 2015; FU et al., 2016).

As CD são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido, capaz de formar complexos de inclusão (CI) com grande variedade de compostos orgânicos (KFOURY et al., 2016). A formação do CI ocorre normalmente em solução aquosa, onde as moléculas dos OE alojam-se no interior da cavidade apolar da CD de forma espontânea e energeticamente favorável (LYRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; WANG et al., 2011; AGUIAR, et al., 2014), provocando alterações nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes, permitindo a detecção da formação dos complexos de inclusão (LYRA et al., 2010). Baseado nesta propriedade, o estragol constituinte do OEOB (KFOURY et al., 2015) foi complexado com α -CD, β -CD, γ -CD e hidroxipropil- β -CD, sendo observado aumento da solubilidade aquosa, aumento da estabilidade à luz ultravioleta e aumento da estabilidade oxidativa, entretanto, a estabilidade térmica deste complexo de inclusão não foi determinada. Neste contexto, no presente trabalho, objetivou-se preparar o complexo de inclusão do óleo essencial de *Ocimum basilicum* com β -ciclodextrina e avaliar sua estabilidade térmica.

Material e métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica, Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, no período de maio a dezembro de 2016. Os solventes utilizados foram: hexano grau HPLC, diclorometano grau GC e sulfato de sódio anidro, adquiridos da Sigma Aldrich do Brasil, β -ciclodextrina (Roquete Pharma) foi doada pela Labonathus Biotecnologia Internacional LTDA e água ultrapura (18,2 M Ω) obtida num sistema de purificação Modelo Master All (GEHAKA).

Extração do óleo essencial de *Ocimum basilicum*

Amostras de partes aéreas de *O. basilicum* (manjeriço) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, PI (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015. A extração do OEOB foi realizada continuamente durante três horas em um aparelho tipo *Clevenger*. Após a separação das fases, a fase aquosa foi descartada e o óleo essencial resultante foi transferido para

frasco, ao qual foi acrescentado sulfato de sódio anidro para remoção da água residual, assim permanecendo por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, o óleo obtido foi transferido para frasco âmbar para cálculo de rendimento por pesagem. Na sequência o frasco foi armazenado sob refrigeração até o momento das análises (AGUIAR et al., 2015).

Caracterização dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

Os óleos essenciais de OEOB foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) da marca Waters, modelo GCT Premier, coluna capilar apolar DB-5, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 μm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1,0 mL.min⁻¹ e modo de divisão 1/10. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 270 °C e 290 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 50 °C a 180 °C a uma taxa de aquecimento de 4,0 °C.min⁻¹ e em seguida até 260 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, permanecendo 10 minutos nesta temperatura.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, utilizando a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI), com energia de ionização de 70 eV e voltagem do detector de 2.500 V. Aquisição foi realizada na faixa de massa de m/z 45-650. Heptacosfluorotributilamina foi utilizado como calibrante. A resolução de massa foi ajustada para cerca de 7000 FMWH para a massa m/z 218,9856 (*lock mass*). Os dados foram adquiridos utilizando *software MassLynx*TM versão 4.1 e os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, determinada com auxílio do *software ChromaLynx*TM.

A composição percentual foi obtida a partir da medida da integração das áreas sobre os picos (AGUIAR et al., 2015). A identificação dos picos observados nos cromatogramas foi realizada considerando os seguintes itens: (1) busca no banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (versão 11.0), (2) comparação do valor m/z experimental para o íon molecular de cada componente da amostra com o valor de m/z para a massa monoisotópica dos compostos resultantes da pesquisa na base de dados NIST e, (3) comparação do valor calculado para o índice de retenção linear para cada componente da amostra, com o encontrado na literatura. As identificações positivas requereram uma correspondência acima de 900 (*Match*) na pesquisa da base de dados do NIST e um desvio de $\pm 1,0$ mDa entre a massa monoisotópica experimental para o íon molecular e a massa monoisotópica teórica para compostos de até 200 Daltons. Compostos com massas superiores podem ter variações de $\pm 5,0$ ppm. Quando não foi

possível identificar o íon molecular, o cálculo de erro de massa foi determinado para o fragmento principal (JERNBERG, PELLINEN, RANTALAINEN, 2013).

As massas exatas para os fragmentos observados em espectros NIST foram calculadas utilizando a função *Elemental Composition* do software *MassLynx*, versão 4.1. Quando vários candidatos preencheram as condições (1) e (2), o pico cromatográfico foi atribuído àquele que apresentou melhor correspondência com a base de dados NIST e com o índice de retenção linear (MEDEIROS et al., 2012; AGUIAR et al., 2015).

Preparo do complexo de inclusão

O OEOB foi complexado com β -CD, de acordo com o método de coprecipitação (AGUIAR et al., 2014). Foram definidas três relações entre a massa do OEOB e a massa da β -CD (m:m) e estas foram identificadas como CI-OEOB:CD (5:95), CI-OEOB:CD (10:90) e CI-OEOB:CD (15:85) conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre a massa do óleo essencial obtido das partes aéreas de *Ocimum basilicum* (OEOB) e a massa da β -ciclodextrina (β -CD) utilizadas para preparo do complexo de inclusão.

Complexo-código	Massa do óleo essencial (mg)	Massa da β -ciclodextrina (mg)
CI-OEOB:CD (5:95)	50	950
CI-OEOB:CD (10:90)	50	450
CI-OEOB:CD (15:85)	50	283

CI-OEOB:CD – Complexo de inclusão entre o óleo essencial obtido das partes aéreas de *Ocimum basilicum* (OEOB) e a β -ciclodextrina (β -CD), preparado respectivamente, com as seguintes relações massa:massa: 5:95; 10:90; e 15:85.

Para preparar o complexo de inclusão na proporção 5:95 (OEOB: CD), 50 mg de OEOB foi solubilizado em 500 μ L de etanol PA e 950 mg de β -CD foi solubilizada em 40 mL de uma mistura etanol:água (1:2) aquecida a 55 °C. Após a adição da solução do OEOB à solução de β -CD, a mistura foi retirada do aquecimento e a suspensão formada permaneceu sob agitação a 150 rpm por quatro horas a 25 °C. Após este período, a suspensão foi resfriada a 4,0 °C por 12 horas. O precipitado foi recolhido, seco por liofilização, pesado e armazenado em frasco âmbar. O sobrenadante foi armazenado sob refrigeração para determinação do conteúdo de OEOB que não foi complexado. Este procedimento foi repetido para o preparo dos complexos nas proporções de 10:90 e 15:85.

Caracterização dos complexos de inclusão

- **Extração do óleo complexado**

A composição do OE presente no complexo de inclusão foi determinada pelo método de extração com solvente proposto por Harangi e Nánási (1984). Amostras equivalentes a 10 mg do OEOB dos complexos CI 5:95; CI 10:90 e CI 15:85 foram solubilizados com 8,0 mL de água destilada em um frasco fechado com tampa rosqueada de alumínio e septo de teflon e extraídas com 4,0 mL de n-hexano aquecido em banho-maria à temperatura de $80 \pm 2,0$ °C por 15 minutos, com agitação intermitente. Após o resfriamento, a fase n-hexânica contendo o OEOB, foi recolhida com auxílio de uma pipeta e a fase aquosa foi submetida a duas novas extrações sucessivas com n-hexano (2,0 x 4 mL). Os extratos combinados, foram adequadamente diluídos a uma concentração aproximada de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e analisados por CG-EMAR para determinação da eficiência de complexação (EC) através da equação 1.

$$\text{Equação 1: } EC = \frac{Al}{Ac} \times 100$$

Onde:

EC = eficiência de complexação

Al = área sob a curva determinada para o constituinte livre;

Ac = área sob a curva determinada para o constituinte complexado com β -CD.

Com a finalidade de avaliar o procedimento de extração e minimizar os erros experimentais, 10 mg do OEOB foi submetido ao mesmo procedimento de extração que os complexos de inclusão.

- **Análise do óleo livre**

A composição do OEOB não complexado, presente no sobrenadante, foi determinada pelo método de extração com solvente proposto por Harangi e Nánási (1984). Para tanto, 4,0 mL do sobrenadante dos complexos CI 5:95; CI 10:90 e CI 15:85 foram transferidos diretamente para um frasco fechado com tampa rosqueada de alumínio e septo de teflon e extraídas conforme o procedimento de extração do óleo complexado. Os extratos combinados foram analisados sem diluição por CG-EM.

- **Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (AGUIAR et al., 2014)**

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrômetro marca Agilent modelo *Cary 630*, utilizando o acessório para reflectância total atenuada (RTA). As amostras

foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de RTA, sendo os espectros obtidos na faixa entre 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4,0 cm^{-1} .

- **Estudo da estabilidade do CI-OEOB por *headspace* e CG-EM**

A melhor proporção determinada entre OEOB e a β -CD foi submetida ao ensaio de estabilidade por *headspace*, de acordo com o método proposto por Kfoury e colaboradores (2015). Foram transferidas para frascos de *headspace* 2,25mg do OEOB. Paralelamente foram transferidos 45 mg do CI 5:95, massa equivalente a 2,25mg do OEOB. Os frascos foram fechados com septo de silicone e lacre de alumínio. Em seguida, as amostras foram incubadas a 45°C nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. Após o tempo de incubação foi coletado 1,0 mL do vapor obtido de cada amostra, e analisado por CG-EM, conforme descrito anteriormente. Os CI submetidos ao estresse térmico tiveram seu conteúdo submetido ao processo de extração do óleo complexado para determinar a composição do OEOB remanescente no complexo de inclusão, após o estresse térmico.

Resultados e Discussão

Foi obtido um rendimento de 0,4 % para o óleo essencial extraído das partes aéreas de *O. basilicum*, similar ao obtido por outros pesquisadores (BARCELOS et al., 2013; GOVINDARAJAN et al., 2013). O OEOB foi analisado por CG-EMAR (Figura 1) e os principais componentes identificados foram o Linalol e o Estragol (Tabela 2). A composição química do óleo essencial de *O. basilicum* coletado no município do Cariri, CE, avaliada por Rodrigues e colaboradores (2016) também apresentou como componentes majoritários o Linalol e o Estragol. De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger (2016), o município do Cariri-CE possui clima *bs*, caracterizado por um clima semi-árido, que é diferente do clima predominante em Teresina, PI, o qual é classificado como clima *aw*, característico de uma região com clima tropical (KÖPPEN-GEIGER, 2016). Entretanto, apesar das diferenças climáticas apresentadas, as duas amostras apresentaram quimiotipos semelhantes.

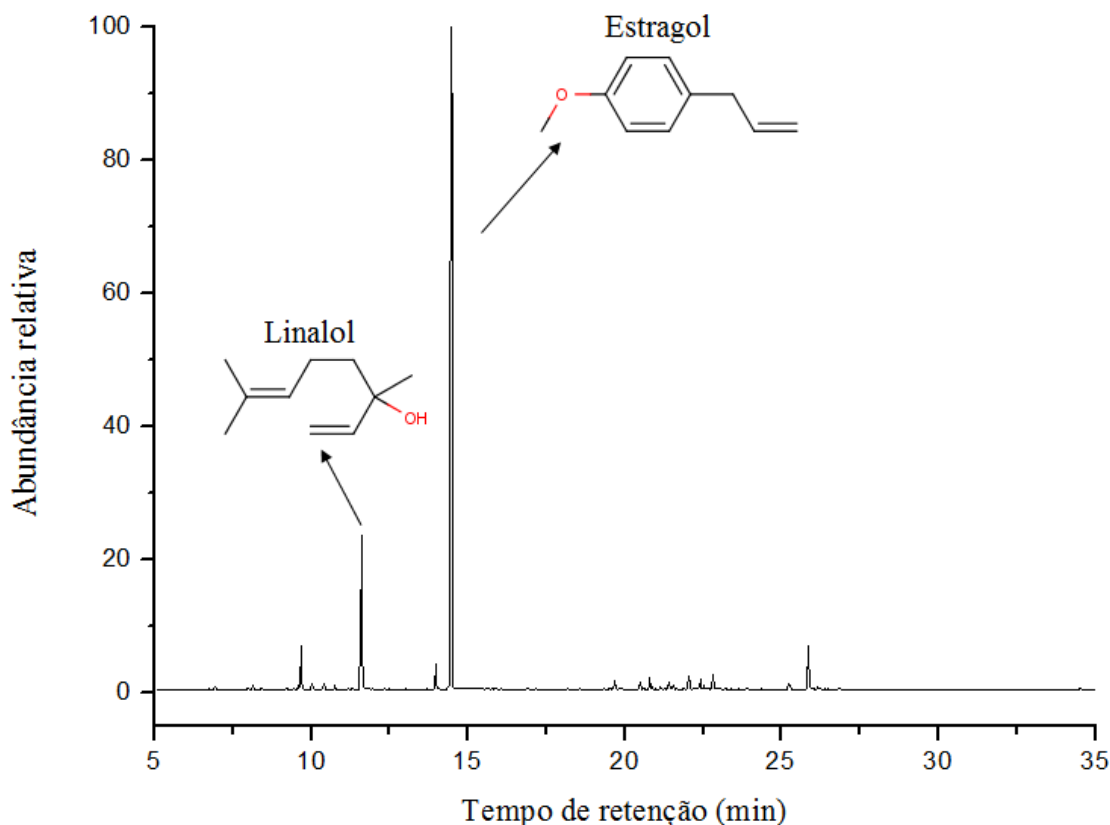


Figura 1. Perfil cromatográfico (TIC) do óleo essencial das partes aéreas de *Ocimum basilicum* (OEOB) coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015. Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

O Linalol é um composto encontrado em diversas espécies de plantas aromáticas, possui efeito sedativo, anticonvulsivante, anestésico, anti-inflamatório e antinociceptivo (COELHO et al., 2011). Duarte e colaboradores (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano do Linalol frente a linhagens de *Campylobacter* associadas a doenças transmitidas por alimentos, demonstrando seu potencial efeito antibacteriano e como um possível conservante alimentar.

O Estragol é encontrado em uma variedade de óleos essenciais de diversas espécies como a *Artemisia dracuncululus* (EISENMAN et al., 2013) e *Croton zehntneri* (ANDRADE et al., 2015). É utilizado como agente aromatizante em temperos, bebidas não alcoólicas e condimentos, podendo ser usado na preservação de alimentos devido às suas atividades inseticidas, antivirais, antibacterianos e acaricidas (KFOURY et al., 2015; CFR, 2016). O Estragol é considerado um composto seguro pelo *Department of Food and Agriculture* dos Estados Unidos (CFR, 2016), entretanto, seu uso como conservante alimentar na forma livre é limitado devido sua volatilidade e baixa solubilidade aquosa.

Tabela 2. Composição do óleo essencial das partes aéreas de *Ocimum basilicum* analisado por CG-EMAR, coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.

TR (min)	Composto	Fórmula molecular	m/z teórica	m/z calculada	Erro (mDa)	% área	IK Tab	IK Cal
6,9	(1R)- α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1248	-0,4	0,1	932	929
8,0	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1256	0,4	0,1	969	968
8,1	(1S)- β -pineno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1259	0,7	0,2	974	973
8,4	α -mirceno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1261	0,9	0,1	988	983
9,4	<i>p</i> -cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134,1096	134,1102	0,6	0,1	1020	1020
9,5	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1258	0,6	0,1	1024	1025
9,6	1,8-cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,1358	154,1359	0,1	3,4	1026	1028
10,0	<i>trans</i> - β -ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1254	0,2	0,2	1032	1042
10,4	γ -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	136,1252	136,1253	0,1	0,1	1054	1055
10,7	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	C ₁₀ H ₁₈ O	(M-H ₂ O) 136,1252	136,1251	-0,1	0,2	1065	1068
11,3	L-fenchona	C ₁₀ H ₁₆ O	152,1201	152,1212	1,1	0,2	1083	1088
11,6	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	(M-H ₂ O) 136,1252	136,1260	0,8	16,1	1095	1099
13,9	4-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154,1358	154,1365	0,7	1,9	1174	1185
14,4	Estragol	C ₁₀ H ₁₂ O	148,0888	148,0894	0,6	68,8	1195	1204
18,1	δ -elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1883	0,5	0,1	1337	1327
19,7	β -elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1892	1,4	0,6	1389	1389
20,5	<i>trans</i> -cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1896	1,8	0,5	1408	1422
20,7	α -bergamoteno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1878	0,6	0,6	1432	1434
20,8	α -Guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1892	1,4	0,2	1437	1437
21,4	α -Humuleno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1886	0,8	0,3	1452	1459
21,5	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1888	1,0	0,2	1482	1465
22,0	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1873	-0,5	0,8	1484	1484
22,4	Germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1882	0,4	0,5	1559	1500
22,5	δ -guaieno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1880	0,2	0,3	1502	1505
22,8	γ -cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204,1878	204,1882	0,4	0,9	1522	1517
23,0	<i>cis</i> -calameneno	C ₁₅ H ₂₂	202,1722	202,1737	1,5	0,1	1528	1524
25,8	δ -cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	(M-H ₂ O) 204,1878	204,1884	0,6	3,2	1644	1641

TR= tempo de retenção; IK Tab= Índice de *Kovats* tabelado; IK Cal - Índice de *Kovats* calculado; mDa = miliDalton.

Preparo e caracterização dos complexos de inclusão:

A formação do CI é favorecida pela estrutura e propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes, visto que esta deve se ajustar total ou parcialmente no interior hidrofóbico da cavidade da CD. De acordo com Aguiar e colaboradores (2014), a maioria dos compostos complexados com β -CD encontram-se dentro da faixa de massa molecular de 100 a 400 Daltons. Na Tabela 2 pode-se observar que a massa molecular dos constituintes dos OE é compatível com a capacidade de complexação pela β -CD. Estes compostos também possuem baixa solubilidade aquosa, o que favorece a formação dos CI.

O fenômeno de complexação é um processo concentração dependente, a razão molar entre a molécula hóspede e a β -CD também influencia no processo de formação dos CI (OLIVEIRA et al., 2011). A eficiência de complexação (EC) foi maior com a menor proporção de óleo essencial de *O. basilicum* em relação à CD (relação 5:95, m:m), sendo que esta proporção teve uma eficiência de complexação 2,75 vezes maior que aquela obtida na proporção óleo essencial e CD (15:85) (Figura 2). Esse aumento de EE com relação às diferentes proporções de OE e β -CD está coerente com os dados da literatura (KFOURY et al., 2015). Estes dados permitem a determinação da melhor relação entre o OE e β -CD, visto que devido ao elevado valor comercial de ambos os produtos a determinação da EC demonstrou ser uma eficiente estratégia para reduzir o custo destas formulações.

A eficiência de complexação, determinada para o complexo de inclusão entre o óleo essencial de *O. basilicum* e a β -CD, para a proporção de 5:95 (m:m) foi respectivamente 71 % e 83 % para o linalol e para o estragol.

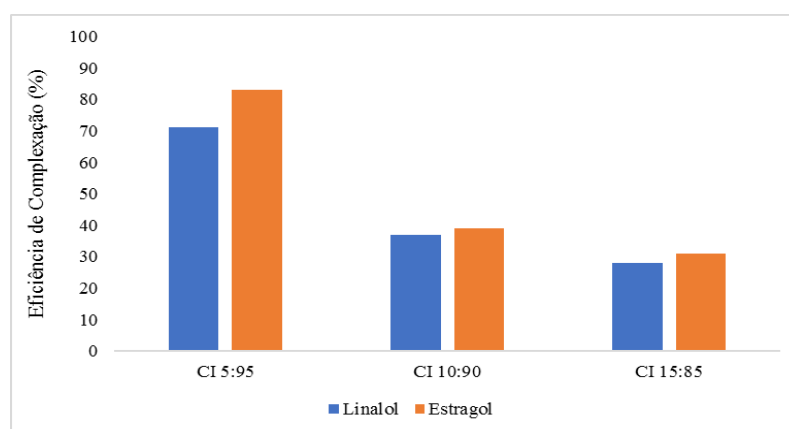


Figura 2. Eficiência de complexação dos componentes majoritários presentes no óleo essencial das partes aéreas de *Ocimum basilicum* (OEOB) coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.

Analisando-se os cromatogramas dos componentes extraídos dos CI (Figura 3), observa-se que os perfis obtidos para o CI-OEOB (5:95) apresentam uma maior abundância de todos os componentes do OEOB que as demais proporções utilizadas no preparo dos complexos de inclusão entre o OEOB e a β -CD, demonstrando que com uma maior proporção de β -CD foi obtida uma maior microencapsulação dos componentes individuais dos OEOB.

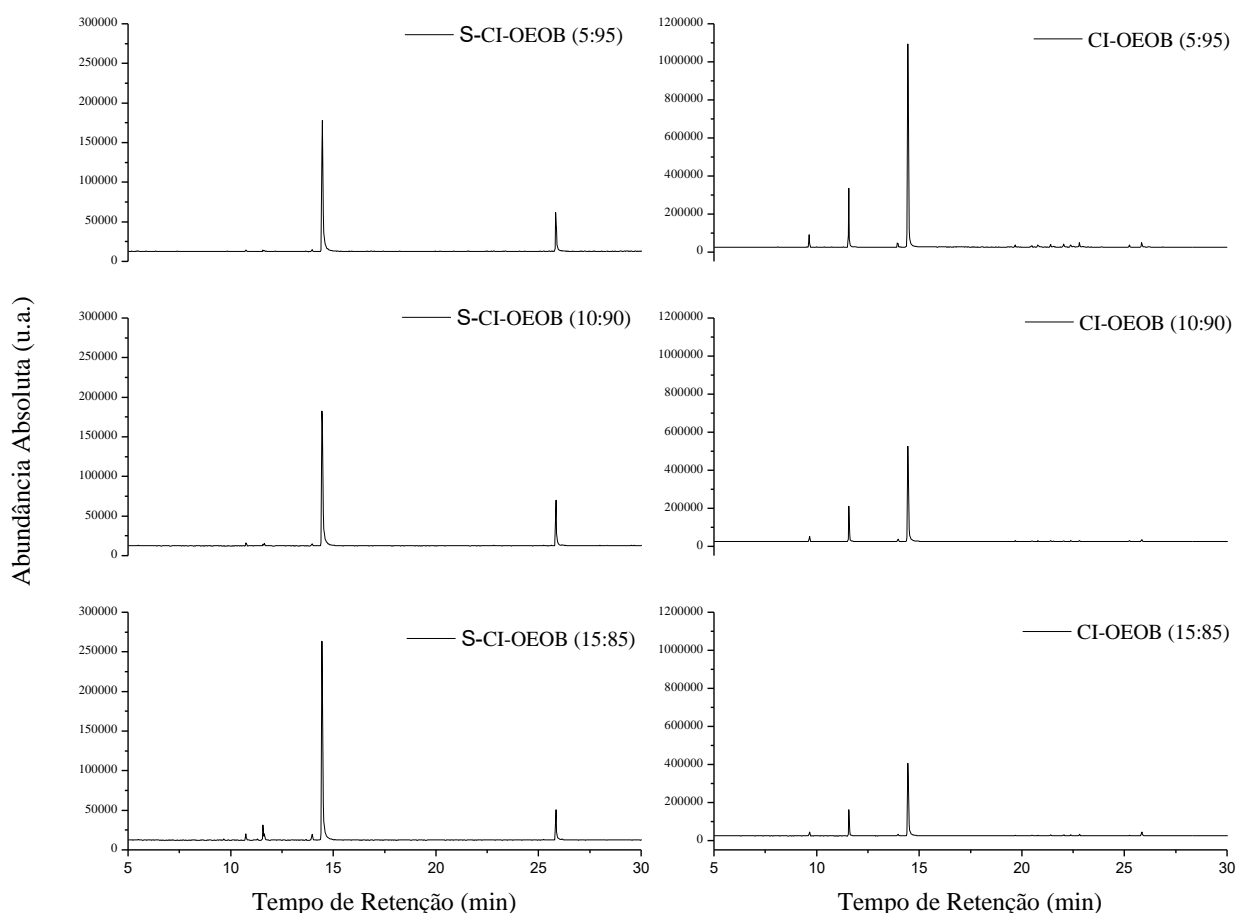


Figura 3. Perfil cromatográfico dos componentes não complexados e complexados do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, extraídos respectivamente do sobrenadante (S-CI-OEOB) e do complexo de inclusão (CI-OEOB) com β -ciclodextrina nas proporções 5:95, 10:90 e 15:85 (massa:massa). *Ocimum basilicum* coletado no município de Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.

Estes resultados são concordantes com a análise dos componentes extraídos, presentes no sobrenadante, pois neste caso, a abundância absoluta dos componentes presentes no sobrenadante obtido a partir do preparo do CI-OEOB (5:95) foi o que apresentou menor abundância absoluta, demonstrando uma baixa proporção de constituintes não complexados,

confirmando que nesta proporção houve uma maior complexação dos componentes dos OEOB. Por fim, analisando-se o perfil cromatográfico obtido a partir do sobrenadante coletado do complexo CI-OEOB (15:85), observa-se uma maior abundância absoluta dos constituintes do OEOB, demonstrando uma menor taxa de complexação, provavelmente devido à menor proporção de β -CD em relação à proporção presente na proporção CI-OEOB (5:95).

Os CI também foram caracterizados por espectroscopia de absorção no infravermelho. A Figura 4 mostra o espectro de transmitância no infravermelho da β -CD, do OEOB, mistura física (MF-OEOB) e seus complexos de inclusão (CI-OEOB 5:95; CI-OEOB 10:90 e CI-OEOB 15:85).

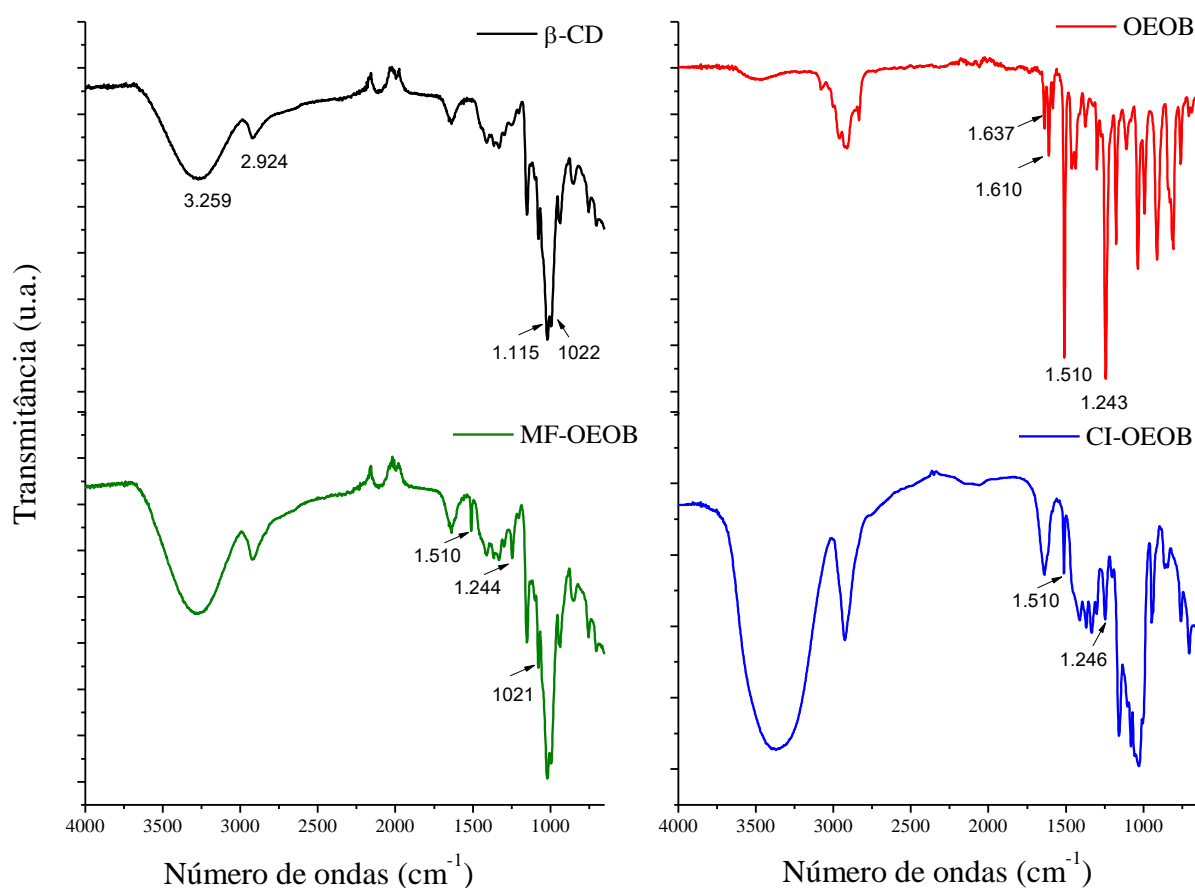


Figura 4. Espectro de Infravermelho da β -ciclodextrina (β -CD) óleo essencial extraído das partes aéreas de *Ocimum basilicum* (OEOB), mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI-OEOB). *Ocimum basilicum* coletado no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.

O espectro de IVTF da β -CD (Figura 4) mostra uma proeminente banda de absorção em torno de 3.259 cm^{-1} característico de estiramento O–H, e bandas características de estiramento C–H (2.924 cm^{-1}), estiramento C–O (1.151 cm^{-1}) e estiramento C–O–C (1.022 cm^{-1}), compatível com o espectro da β -CD obtido por Aguiar e colaboradores (2014). O espectro de IVTF do OEOb (Figura 4) apresentou uma banda de absorção de baixa intensidade em torno de 3.497 cm^{-1} característico de estiramento O–H, compatível com o espectro de um óleo essencial com baixa abundância relativa de compostos hidroxilados. Seu espectro apresenta ainda bandas de absorção entre 3.073 e 2.827 cm^{-1} característico de estiramento C–H e bandas na região 1.637 e 1.610 cm^{-1} compatível com estiramento C=C, uma banda pronunciada em 1.510 cm^{-1} representativa de estiramento de anel aromático, além de uma banda em 1.243 cm^{-1} característico de estiramento C–O arílico, compatível com a elevada abundância do composto estragol. Analisando o espectro de IVTF da MF-OEOb (Figura 4) observa-se picos característicos tanto da β -CD quanto do OEOb, sendo possível observar uma redução da intensidade das bandas características do OEOb (1.510 e 1.243 cm^{-1}), possivelmente provocado pela redução da livre vibração das ligações de seus constituintes, sendo um indicativo que nestas condições já ocorre à formação do complexo de inclusão do OEOb com a β -CD. No espectro de IVTF do CI-OEOb (Figura 4) também é possível identificar a redução na intensidade das bandas características de estiramento do anel aromático em 1.510 cm^{-1} e 1.243 cm^{-1} característico de estiramento C–O arílico presentes no OEOb indicativos da formação do CI.

Estabilidade

Os resultados referentes à estabilidade térmica a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ do OEOb em aparato de *headspace* acoplado a um CG-EMAR estão demonstrados na Figura 5. Observa-se que após 15 minutos de incubação a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, aproximadamente 90 % do conteúdo do estragol presente no OEOb foi volatilizado. A completa volatilização ocorreu em 60 minutos de exposição a esta temperatura, demonstrando sua limitada estabilidade térmica para utilização como aditivo em indústria de alimentos processados por aquecimento. Pode-se observar ainda volatilização de 35% do conteúdo Estragol complexado com β -CD em 15 minutos de incubação a 45°C , após este tempo, o complexo permaneceu estável por 120 minutos nesta temperatura. Este resultado parece promissor para utilização futura de CI com estragol para a indústria de alimentos, neste contexto, é necessário testar a estabilidade do composto em temperaturas superiores.

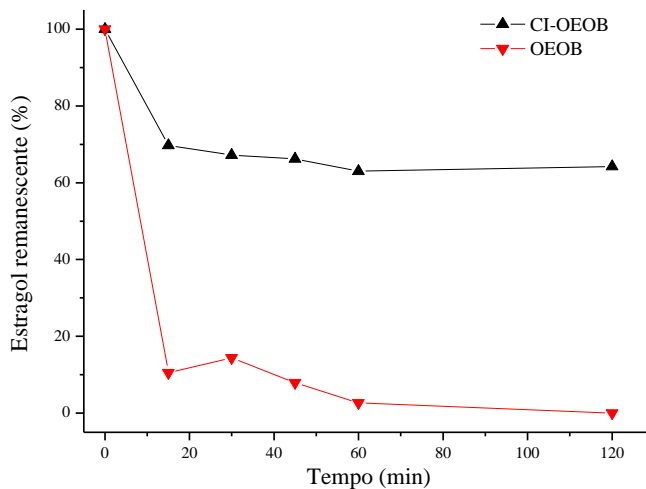


Figura 5. Porcentagem de Estragol remanescente no óleo essencial das partes aéreas de *Ocimum basilicum* (OEOB), coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015, e no seu complexo de inclusão (CI-OEOB) após incubação a 45 °C em aparato de *headspace* acoplado a um CG-EMAR.

A composição química do óleo essencial de OEOB presente no complexo de inclusão incubado a 45 °C foi preservada por até 120 minutos (Figura 6), demonstrando a capacidade protetora da β -ciclodextrina e de aumentar a estabilidade térmica dos compostos do OEOB.

A utilização da β -CD como agente complexante pode viabilizar a utilização dos óleos essenciais no desenvolvimento de produtos que são processados termicamente devido ao aumento da estabilidade térmica, ampliando a utilização tecnológica dos óleos essenciais para o preparo de alimentos, cosméticos, fármacos, alimentos e defensivos agrícolas.

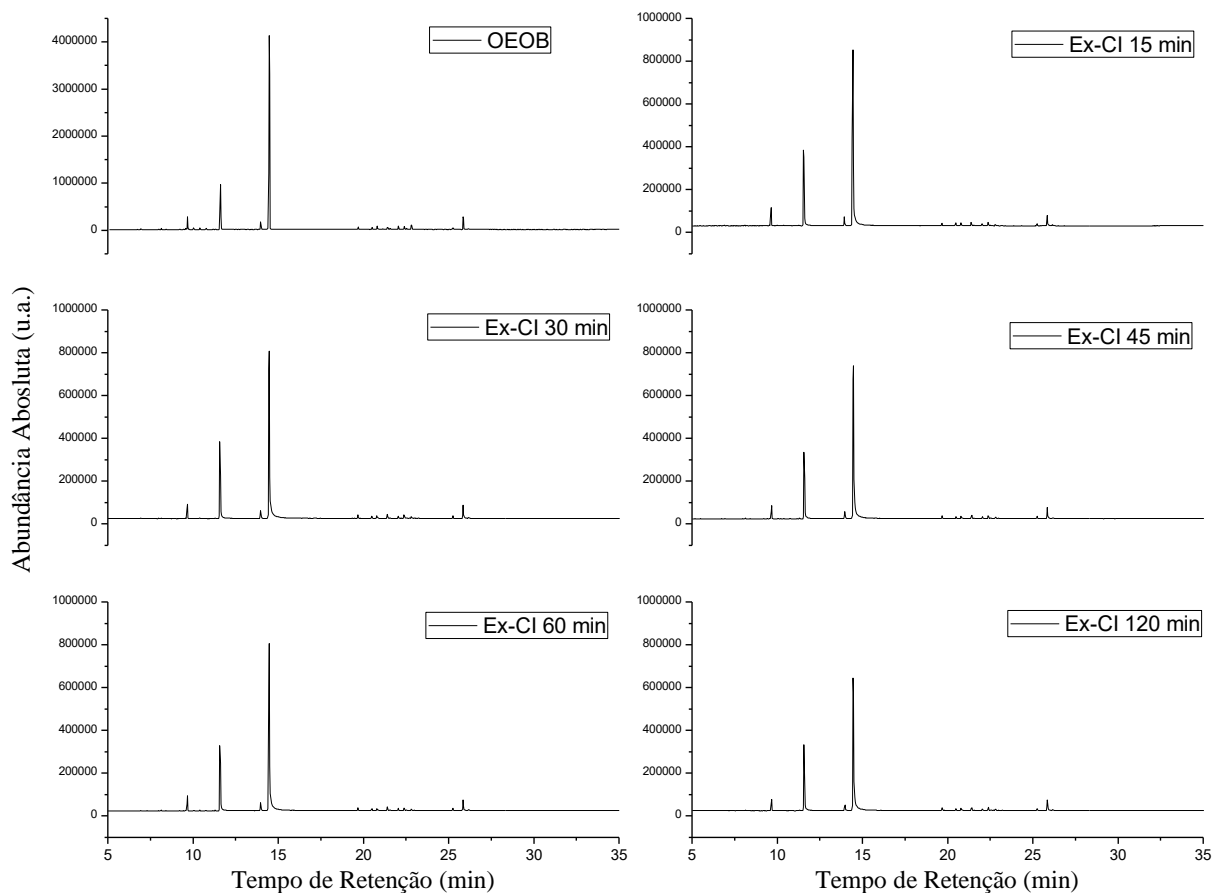


Figura 6. Perfil cromatográfico (TIC) dos componentes dos óleos essenciais extraído das partes aéreas de *Ocimum basilicum* extraído dos complexos de inclusão (CI-OEOB) com β -ciclodextrina submetido a estresse térmico. *Ocimum basilicum* coletado no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, em Teresina, Piauí, Brasil (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W) em setembro de 2015.

Conclusões

A relação de 5:95 (m:m) entre a massa do óleo essencial de *Ocimum basilicum* e a β -ciclodextrina é mais eficiente para o preparo de complexo de inclusão, por permitir a complexação da maioria dos compostos presentes no óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

Os componentes majoritários do *Ocimum basilicum*, linalol e estragol apresentam 71% e 83% de eficiência de complexação para a relação massa-massa 5:95 (m:m).

O complexo de inclusão formado pelo óleo essencial de *Ocimum basilicum* e β -ciclodextrina aumenta a estabilidade térmica a 45°C de todos os componentes por 120 minutos.

Referências bibliográficas

- AGUIAR, U. N.; DE LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; DE FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; DE ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, p. 50-55, 2014.
- AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; CITÓ, A. M. G. L.; SOUSA, A. J. P.; SILVA, R. M.; SILVA, I. S. A.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and modulation of antibiotic activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products** (Print), v.74, p.165-170, 2015.
- ANDRADE, T. C. B.; DE LIMA, S. G.; FREITAS, R. M.; ROCHA, M. S.; ISLAM, T.; SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *Croton zehntneri* (euphorbiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, p.173-182, 2015.
- BARCELOS, R. C.; JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; MENDONÇA, F. A.; VALENTE, V. M. M. Identification and quantification of the major fungitoxic components of the brazilian basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Journal of Food Research**, v.2, n.5, 2013.
- BILIAL, A.; JAHAN, N.; AHMED, A.; BILAL, S. N.; HABIB, S.; HAJRA, S. Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* linn - a review. **International Journal of Current Research and Review**, v.4, p.73-83, 2012.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, p.588-594, 2009.
- CFR – **Code of Federal Regulations**. Part 182 – Substances generally recognized as safe. 2016. <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#sp21.3.182.a>, acessado em 01/11/2016.
- COELHO, V. R.; GIANESINI, J.; VON BOROWSKI, R.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; PICADA, J. N.; SANTOS, A. R. S.; BRUM, L. F. S.; PEREIRA, P. (-)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. **Phytochemistry**, v.18, p.896-901, 2011.
- DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LÓPEZ, A. G.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO, J. A.; MWANGI, J. W.; THOITHI, J. N.; KIBWAGE, I. O.; MWALUKUMBI, J. M.; KARIUKI, S. T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from

- Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p.410–414, 2010.
- DUARTE, A.; LUÍS, A.; OLEASTRO, M.; DOMINGUES, F. C. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. **Food Control**, v.61, p.115-122, 2016.
- EISENMAN, S. W.; JULIANI, H. R.; STRUWE, L.; SIMON, J. E. Essential oil diversity in North American wild tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) with comparisons to French and Kyrgyz tarragon. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.220- 232, 2013.
- FU, Y.; SARKAR, P.; BHUNIA, A. K.; YAO, Y. Delivery systems of antimicrobial compounds to food. **Trends in Food Science & Technology**, v.57, p.165-177, 2016.
- GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARY, M.; YOGALAKSHMI, K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v.134, p.7-11, 2013.
- GRADINARIU, V.; CIOANCA, O.; HRITCU, L.; TRIFAN, A.; GILLE, E.; HANCIANU, M. Comparative efficacy of *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils against amyloid beta (1–42)-induced anxiety and depression in laboratory rats. **Phytochemistry Reviews**, v.14, p.567-575, 2015.
- HARANGI, J.; NÁNÁSI, P. Measurement of the essential oil in inclusion complexes with cyclodextrin by means of capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.166, p.103-109, 1984.
- JERNBERG, J.; PELLINEN, J.; RANTALAINEN, A. Qualitative nontarget analysis of landfill leachate using gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, v.103, p.384-391 2013.
- KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. **Analytica Chimica Acta**, v.918, p.21-25, 2016.
- KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; RUELLAN, S.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v.118, p.156-164, 2015
- KHELIFA, L. H.; BRADA, M.; BRAHMI, F.; ACHOUR, D.; FAUCONNIER, M. L.; LOGNAY, G. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Ocimum*

basilicum Leaves from the Northern Region of Algeria. **Topclass Journal of Herbal Medicine**, v.1, p.53-58 2012.

KÖPPEN-GEIGER. **World Maps of Köppen-Geiger climate classification**. 2016. Extraído de: <http://koeppen-geiger.vu-wien.ac.at/>, acessado em 17 de novembro de 2016.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO J. L.; ROLIM NETO P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

MEDEIROS, L. B. P.; ROCHA, M. S.; DE LIMA, S. G.; SOUSA JÚNIOR, G. R.; CITÓ, A. M. G. L.; SILVA, D.; LOPES, J. A. D.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; MOBIN, M.; COSTA, J. G. M. Chemical constituents and evaluation of cytotoxic and antifungal activity of *Lantana camara* L. essential oils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, p.1259-1267, 2012.

OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v.115, p.8511-8519, 2011.

PANDEY, A. K.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum species*: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, p.682-694, 2014.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250-264, 2014.

RODRIGUES, L. B.; MARTINS, A. O. B. P. B.; CESARIO, F. R. A. S. CASTRO, F. F.; ALBUQUERQUE, T. R.; FERNANDES, M. N. M.; SILVA, B. A. F.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; BARBOSA, R.; MENEZES, I. R. A. Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: In vivo mouse models. **Chemico-Biological Interactions**, v.257, p.14-25, 2016.

United Nations Commodity Trade Statistics Database

http://data.un.org/Data.aspx?d=ComTrade&f=_11Code%3a34, acessado em 29 de agosto de 2016.

VIEIRA, P. R. N.; MORAIS, S. M.; BEZERRA, F. H. Q.; FERREIRA, P. A. T.; OLIVEIRA, I. R.; SILVA, M. G. V. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum species*, **Industrial Crops and Products**, v.55, p.267-271, 2014.

WANG, J.; CAO Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterization of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v.127, p.1680-1685, 2011.

Capítulo 4

Artigo que será submetido ao Periódico: Industrial Crops and Products

POTENCIAL ANTIFÚNGICO CONTRA *Aspergillus parasiticus* DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS

Márcio dos Santos Rocha^{1,*}, Larisse Carneiro da Frota Brito², Francisco Rodrigues Leal³, Sidney Gonçalo de Lima⁴, Maria Christina Sanches Muratori^{1,2,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP. 64.055-450, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: msrocha@ufpi.edu.br. *Autor para correspondência.

²Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁵Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br.

Resumo

A busca por alimentos seguros passa pela redução da utilização de antifúngicos sintéticos e sua substituição por produtos ambientalmente sustentáveis como os óleos essenciais. Das partes aéreas de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* foram extraídos os óleos essenciais constituídos majoritariamente pelos compostos oxigenados: linalol, estragol *p*-mentona, isomentona, L-carvona, Z-citral e geraniale. Estes compostos podem se ligar a proteínas alterando a permeabilidade e rigidez da membrana celular, ocasionando a morte de fungos filamentosos. Os óleos essenciais podem ser utilizados na

sua forma livre, porém quando complexados com ciclodextrinas ocorre aumento da estabilidade térmica e solubilidade aquosa, potencializando sua utilização em alimentos. Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas das plantas testadas tiveram atividade antifúngica para *Aspergillus parasiticus*, entretanto, quando complexados com β -ciclodextrina não apresentam essa capacidade. Dentre as plantas testadas a espécie que apresentou o maior rendimento de óleo essencial foi a *M. arvensis*, seus óleos foram capazes de inibir o crescimento micelial de *A. parasiticus* na mais baixa concentração testada ($2,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$), que os caracteriza como potencial fonte para o desenvolvimento de novos produtos fungicidas e fungistáticos ambientalmente sustentáveis.

Palavras-chave: β -ciclodextrina, *Mentha arvensis*, eficiência de complexação, cromatografia gasosa.

Abstract

The search for safe foods involves reducing the use of synthetic antifungals and replacing them with environmentally sustainable products such as essential oils. Of the aerial parts of *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* and *Cymbopogon citratus* were extracted the essential oils constituted mainly by the oxygenated compounds: linalool, estragole *p*-menthone, isomenthone, L-carvone, *Z*-citral and geranial. These compounds can bind to proteins by altering the permeability and stiffness of the cell membrane, causing the death of filamentous fungi. The essential oils can be used in their free form, but when complexed with cyclodextrins increases thermal stability and aqueous solubility increases, potentiating their use in food. The essential oils extracted from the aerial parts of the tested plants had antifungal activity for *Aspergillus parasiticus*, however, when complexed with β -cyclodextrin did not have this capacity. Among the tested plants the species that presented the highest yield of essential oil was *M. arvensis*, its oils were able to inhibit the mycelial growth of *A. parasiticus* at the lowest concentration tested ($2.5 \mu\text{L.mL}^{-1}$), which characterizes them as a potential source for the development of new environmentally sustainable fungicides and fungicides.

Key words: β -cyclodextrin, *Mentha arvensis*, complexation efficiency, gas chromatography.

Introdução

A segurança alimentar tornou-se um dos maiores desafios para as indústrias de alimentos (ALDARS-GARCÍA et al., 2016; FU et al., 2016), em especial devido ao aumento da demanda de consumo (OLIVEIRA et al., 2014), a exigência da redução de aditivos (CABRAL, PINTO, PATRIARCA, 2013; CALO et al., 2015) e, pelo cumprimento das normativas impostas pelas agências regulatórias onde o produto será comercializado. Uma das estratégias adotadas para contornar este desafio é o controle da população microbiana, visto que estes micro-organismos são capazes de ocasionar uma grande variedade de doenças transmitidas por alimentos, além de reduzir a vida de prateleira (KEDIA et al., 2014B; FU et al., 2016).

Dentre os principais micro-organismos que alteram a qualidade dos alimentos, os fungos toxigênicos podem ser agentes de contaminação em toda a cadeia produtiva, produzindo micotoxinas com potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico (ALDARS-GARCÍA et al., 2016). Das micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são as mais relevantes, sendo produzidas principalmente por fungos da espécie *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (KOHYAMA et al., 2015).

Neste contexto, para prevenir o desenvolvimento de fungos em alimentos de origem vegetal (KAHKHA, AMANLOO, KAYKHAI, 2014) parte dos produtores utilizam fungicidas sintéticos (FAGUNDES et al., 2013) para prolongar a vida de prateleira, facilitar o armazenamento e distribuição dos seus produtos. Esta prática possui diversas restrições de uso, pois muitos destes agentes antifúngicos favorecem o aparecimento de efeitos tóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos para o consumidor. Além disto, os antifúngicos sintéticos possuem elevada estabilidade no meio ambiente, favorecendo a contaminação do solo e fontes de água, provocando, desta forma, graves prejuízos ambientais (PRAKASH et al., 2010; KEDIA et al., 2014B; CALO, et al., 2015).

Assim, o uso de substâncias de origem natural, como os óleos essenciais (OE), tem sido sugerido como possíveis métodos químicos para prevenção para o crescimento fúngico, sendo uma alternativa para conservação e segurança alimentar, frente os conservantes sintéticos (CALO, et al., 2015; KOHYAMA et al., 2015). OE são misturas complexas, sintetizadas por plantas aromáticas, geralmente odoríferas, líquidas, instáveis à temperatura ambiente, à luz e ao oxigênio, ocorrendo sua decomposição (KFOURY et al., 2016A). São reconhecidos por suas propriedades bactericidas, antivirais e fungicidas. Sendo ainda utilizados na indústria de

cosméticos por suas propriedades aromáticas, na indústria alimentícia como conservantes e na indústria farmacêutica como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e espasmolíticos (KFOURY et al., 2016A).

Diversos pesquisadores avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais (AMBER et al., 2010; KUMAR et al., 2010A; KUMAR et al., 2010B; PRAKASH et al., 2010; SILVA et al., 2012; FAGUNDES et al., 2013; KEDIA et al., 2014A; KEDIA et al., 2014B; KAHKHA, AMANLOO, KAYKHAI, 2014; PRAKASH et al., 2014; GUERRA et al., 2015; KOHIYAMA et al., 2015; BOUBAKER et al., 2016; FALASCA et al., 2016; KACEM et al., 2016; HU et al., 2017), demonstrando que sua ação antifúngica ocorre pela alteração da integridade da membrana plasmática, disfunção mitocondrial e inibição da síntese de ergosterol, induzindo a estagnação metabólica e morte celular (HU et al., 2017).

Entretanto, como os óleos essenciais apresentam baixa solubilidade aquosa e estabilidade térmica (KFOURY et al., 2016A), sua aplicação tecnológica pode ser melhorada com a sua complexação com as ciclodextrinas (CD), devido a propriedade de complexar uma grande variedade de moléculas provocando alterações consideráveis em suas propriedades físico-químicas e biológicas (ASTRAY et al., 2010; FU et al., 2016).

Desta forma, objetivou-se neste trabalho, preparar e caracterizar complexos de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrina e avaliar seu efeito antifúngico frente a linhagem *Aspergillus parasiticus*.

Material e métodos

A extração e caracterização dos óleos essenciais, o preparo e caracterização dos complexos de inclusão foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica, Centro de Ciências da Natureza. As análises antifúngicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos e Pesquisa de Processamento de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, ambos pertencentes à Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

Material vegetal

Foram utilizadas as partes aéreas de *Origanum majorana* (manjerona), *Mentha arvensis*

(viçui), *Lippia alba* (erva cidreira), *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e *Cymbopogon citratus* (capim cidreira, capim limão) coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI (WGS84: 5° 5' 20" S, 42° 48' 7" W), nos meses de setembro e outubro de 2015.

Extração dos óleos essenciais (AGUIAR et al., 2015)

Os óleos essenciais das partes aéreas de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) foram extraídos continuamente durante três horas em um aparelho tipo *Clevenger*. Após a extração foi acrescentado sulfato de sódio anidro q.s.p. ao óleo para secagem, agitou-se levemente, seguido de repouso por aproximadamente 30 minutos. Na sequência, o óleo seco foi transferido e armazenado em frasco âmbar, pesado para cálculo do rendimento e armazenado sob refrigeração (4,0°C) até o momento das análises.

Caracterização dos óleos essenciais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

Os óleos essenciais de OEOM, OEMA, OELA, OEOB e OECC foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando um cromatógrafo em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) da marca *Waters*, modelo *GCT Premier*, utilizando uma coluna capilar apolar DB-5MS, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 1,0 mL.min⁻¹ e modo de divisão 1/10. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 270 °C e 290 °C, respectivamente, e o volume injetado foi de 1,0 µL. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, utilizando a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI), com energia de ionização de 70 eV a voltagem do detector foi ajustada para 2.500 V. Aquisição foi realizada na faixa de massa de m/z 45-650. Heptacosafuorotributilamina foi utilizado como calibrante. A resolução de massa foi ajustada para cerca de 7000 FMWH para a massa m/z 218,9856 (*lock mass*). Os dados foram adquiridos utilizando *software MassLynx*TM versão 4.1. Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, determinada com auxílio do *software ChromaLynx*TM (JERNBERG, PELLINEN, RANTALAINEN, 2013).

Preparo do complexo de inclusão (AGUIAR et al., 2014)

Os óleos essenciais de OEOM, OEMA, OELA, OEOB e OECC foram complexados com β -CD, de acordo com o método de coprecipitação, sob uma proporção de 5 partes de óleo essencial para 95 partes de ciclodextrinas. Para tanto, pesou-se 1,0 grama de cada óleo essencial separadamente e solubilizou com 5,0 mL de etanol PA. Pesou-se 19,0 gramas de β -CD e solubilizou-se com 100 mL de água ultrapura aquecida a 55 °C. Após a adição da solução alcoólica do óleo essencial à solução aquosa de β -CD, a mistura foi retirada do aquecimento e a suspensão formada permaneceu sob agitação a 150 rpm por quatro horas a 25 °C. Após este período, a suspensão foi resfriada a 4,0 °C por 12 horas para precipitação do complexo formado. O precipitado foi recolhido, seco por liofilização, utilizando um liofilizador Liobras, modelo L101, pesado e armazenado em frasco âmbar.

Caracterização dos complexos de inclusão

Extração do óleo complexado (HARANGI e NÁNÁSI, 1984)

A composição do OE complexado foi determinada pelo método de extração com solvente proposto por Harangi e Nánási (1984). Amostras equivalentes a 10 mg de cada OE presente nos CI foram solubilizados com 4,0 mL de água destilada em um frasco fechado com tampa rosqueada de alumínio e septo de teflon e extraídas com 4,0 mL de n-hexano aquecido em banho-maria à temperatura de $80 \pm 2,0$ °C por 15 minutos, com agitação branda e intermitente. Após o resfriamento, a fase n-hexânica contendo o OE, foi recolhida com auxílio de uma pipeta e a fase aquosa foi submetida a duas extrações sucessivas com n-hexano (2,0 x 4 mL). Os extratos combinados foram analisados por CG-EM para determinação da eficiência de complexação (EC) através da equação 1.

$$\text{Equação 1: } EC = \frac{Al}{Ac} \times 100$$

Onde:

EC = eficiência de complexação

Al = área sob a curva determinada para o constituinte livre;

Ac = área sob a curva determinada para o constituinte complexado com β -CD.

Com a finalidade de avaliar o procedimento de extração e minimizar os erros experimentais, 10 mg de cada óleo essencial foi submetido ao mesmo procedimento de extração que os complexos de inclusão.

Atividade Antifúngica (Tian et al., 2012)

Linhagem padrão de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (USDA, *Agricultural Research Service*, Peoria, IL) pertencente ao banco de amostras do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA) foram utilizados para determinar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* e dos respectivos complexos de inclusão com β -ciclodextrina. Para tanto, quantidades crescentes dos óleos essenciais e complexos de inclusão foram transferidos diretamente para tubo *Falcon* contendo 20 mL de meio de cultura MEA (Extrato de malte 20 g, peptona 1,0 g, glicose 20 g, ágar 20 g e água QSP 1000 mL) mantido a aproximadamente 50 °C para obter as concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os óleos essenciais e CI. As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo *vórtex* e transferido para placas de Petri descartáveis de 90x15mm. Após a solidificação do MEA, foi realizado um orifício no centro da placa de aproximadamente 9,0 mm de diâmetro com auxílio de um bisturi tipo *punch*, no qual foram inoculados assepticamente 50 μL de uma suspensão contendo 10^7 conídios por mL diluídos em tampão fosfato salino, contados com auxílio de uma câmara de *Neubauer*. As placas foram seladas com filme de polietileno e incubadas a uma temperatura de 28 ± 2 °C. Todos os testes foram realizados em duplicata. A determinação da atividade antifúngica foi determinada pela medição dos halos de inibição do crescimento fúngico após incubação das placas. As placas do grupo controle (sem óleo essencial) foram inoculadas seguindo o mesmo procedimento. Para avaliar o crescimento micelial, após o nono dia de incubação mediu-se o diâmetro de cada colônia a partir de duas medidas perpendiculares. A percentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de *A. parasiticus* incubada na presença dos óleos essenciais foi comparada com o seu crescimento nas placas do grupo controle, de acordo com a Equação 2:

$$\text{Equação 2: } \text{PICM} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100$$

Onde:

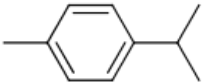
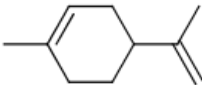
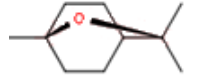
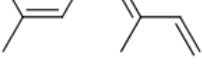
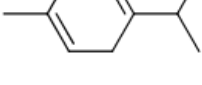
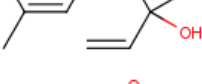
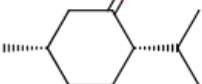
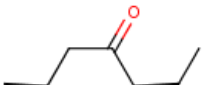
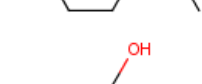
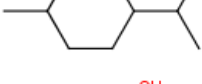
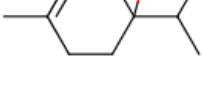
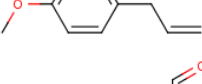
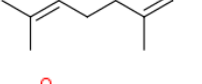
PICM= percentagem de inibição do crescimento micelial
 dc (mm)= diâmetro médio das colônias para os controles;
 dt (mm) = diâmetro médio das colônias para os conjuntos de tratamento.

Resultados e Discussão

O rendimento do óleo essencial é uma variável bastante relevante no desenvolvimento de novos produtos, como os agentes antifúngicos, visto que para aplicação comercial não basta que este agente seja reconhecidamente seguro, ele deve ser disponível em quantidade comercialmente viável (CALO et al., 2015; CFR, 2016). Contudo estes dados podem, ainda, serem otimizados por estudos complementares das técnicas de cultivo, coleta de material botânico e extração do óleo essencial. Bose e colaboradores (2013), avaliando as condições de cultivo de *M. arvensis*, determinaram a capacidade produtiva de 145 kg de óleo por hectare, com rendimento aproximado de 7 kg de óleo essencial por tonelada de massa verde. No presente estudo, apesar deste não ter sido o objetivo principal, considerando a extração do óleo essencial das partes aéreas de *M. arvensis*, determinou-se um rendimento de 1,1%, correspondendo a aproximadamente 11 kg de óleo essencial por tonelada de massa verde coletada, demonstrando um potencial comercial elevado. Por outro lado, uma tonelada de massa verde de *O. majorana*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* produzem aproximadamente 2,0; 7,0; 4,0; e 5,0 kg dos respectivos óleos essenciais.

Após análise pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de *O. majorana*, *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* foram: limoneno, linalol, estragol, para-mentona, isomentona, mentol, L-carvona Z-citral e geranial como os componentes mais representativos (Tabela 1). A formação de ligações de hidrogênio entre os constituintes dos óleos essenciais e as enzimas das membranas celulares microbianas altera a rigidez, a integridade e a permeabilidade da parede celular ocasionando ruptura e morte celular (CABRAL, PINTO, PATRICARCA, 2013; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; HU et al., 2017). A elevada presença de compostos hidroxilados, aldeídos e fenólicos nos óleos essenciais de *O. majorana*, *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus*, sugerem uma elevada capacidade fungistática e fungicida, conforme a dose utilizada.

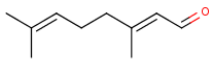
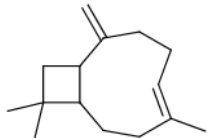
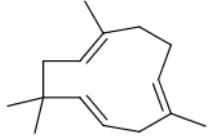
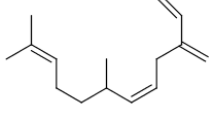
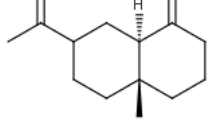
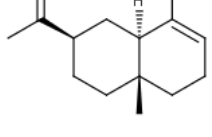
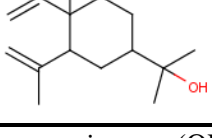
Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa dos constituintes química dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina, PI.

Índice de retenção	Composto	Estrutura química	Peso molecular	OEOM (%)	OEMA (%)	OELA (%)	OEOB (%)	OECC (%)
1026	<i>para</i> -cimeno		134	0,4	-	3,1	0,1	-
1031	L-limoneno		136	8,7	1,4	32,0	0,3	-
1033	1,8-Cineol		154	1,7	-	0,2	2,9	-
1050	<i>trans</i> - β -ocimeno		136	2,5	-	-	0,3	-
1062	γ -terpineno		136	0,6	-	6,1	0,3	-
1098	Linalol		154	7,5	-	0,7	18,1	0,7
1164	Isomentona		154	-	16,6	-	-	-
1159	<i>para</i> -mentona		154	-	4,5	-	-	-
1173	L-mentol		156	-	75,5	-	-	-
1189	4-terpineol		154	2,5	-	-	1,7	-
1195	Estragol		148	51,8	-	-	64,4	-
1240	Z-citral		152	-	-	-	-	33,3
1242	L-carvona		150	2,1	-	43,5	-	-

Continua

Tabela 1. Composição qualitativa e quantitativa dos constituintes química dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina, PI.

(Continuação)

Índice de retenção	Composto	Estrutura química	Peso molecular	OEOM (%)	OEMA (%)	OELA (%)	OEOB (%)	OECC (%)
1270	Geranial		152	-	-	-	-	41,9
1418	<i>trans</i> -cariofileno		204	3,8	-	-	0,5	-
1452	α -humuleno		204	3,0	-	-	0,8	-
1458	β -farneseno		204	3,2	-	-	-	-
1485	β -selineno		204	3,6	-	-	-	-
1494	α -selineno		204	3,3	-	-	-	-
1547	Elemol		222	-	-	3,0	-	-

Óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC). Caracterização obtida por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (1), injeção de padrões (2) e cálculo do índice de Kovat's (3). Fonte: Elaborado por Márcio dos Santos Rocha.

Na Tabela 1 pode-se observar, ainda, que os constituintes majoritários dos óleos essenciais possuem massa molecular entre 134 a 222 Daltons compatível com a capacidade de complexação da molécula com a β -CD (AGUIAR et al., 2014). Este resultado pode ser confirmado pela comparação dos cromatogramas dos óleos essenciais livres com os obtidos a partir dos constituintes extraídos dos complexos de inclusão (Figura 1).

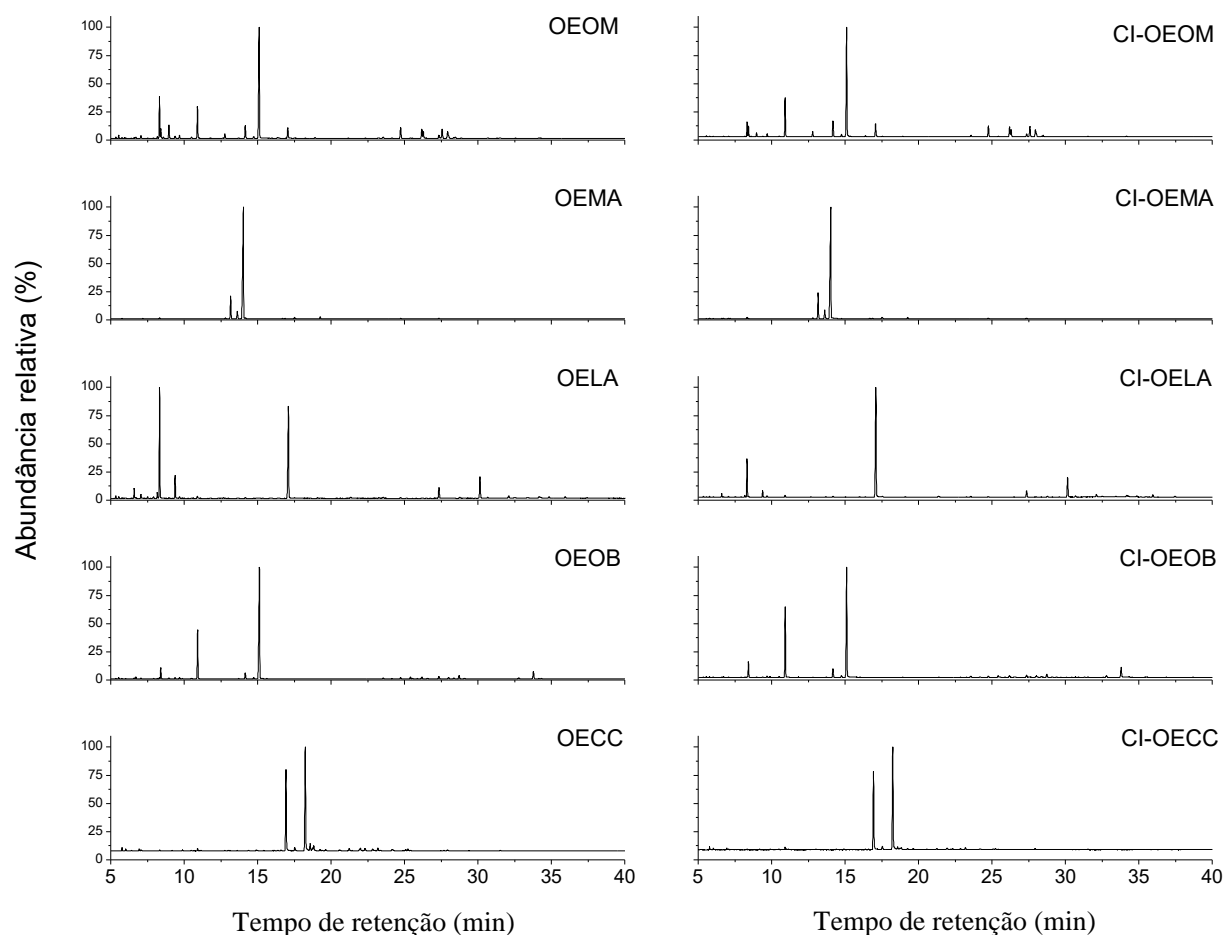


Figura 1. Cromatograma dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) e seus complexos de inclusão com β -ciclodextrina.

A formação dos complexos de inclusão ocorre de forma espontânea em solução aquosa, no qual os constituintes químicos dos OE são alojados no interior da cavidade polar da β -CD (LYRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; WANG et al., 2011; AGUIAR, et al., 2014), de forma energeticamente favorável, devido a repulsão existente entre as moléculas de baixa polaridade dos óleos essenciais e às moléculas de água. Analisando a Tabela 2, observa-se que a eficiência de complexação variou entre 18,2 a 102,5%, sugerindo que os constituintes dos óleos essenciais podem formar complexo com diferentes afinidades com a β -CD. Este é o caso do estragol, constituinte majoritário dos óleos de *O. majorana* e *O. basilicum* que apresentou uma EC de 53,8 e 40,5 % respectivamente, em comparação a uma EC de 80,6 e 72,3 % para o linalol, determinado respectivamente para os complexos de inclusão de *O. majorana* e *O. basilicum* com β -CD.

Tabela 2. Eficiência de complexação e rendimento dos complexos de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina-PI, com β -Ciclodextrina.

Óleo Essencial	Eficiência de complexação (%)								Rendimento (%)
	Limoneno	Linalol	Estragol	Isomentona	L-mentol	Carvona	Cítral	Geraniol	
OEOM	18,2	80,6	53,8	-	-	-	-	-	95,0
OEMA	-	-	-	102,5	89,4	-	-	-	91,0
OELA	20,3	-	-	-	-	100,4	-	-	85,4
OEOB	-	72,3	40,5	-	-	-	-	-	89,5
OECC	-	-	-	-	-	-	84,9	85,9	90,7

Óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC).

Considerando o rendimento do complexo formado, Wang e colaboradores (2011) e Haloci e colaboradores (2014) reportaram rendimentos variando de 78 a 94 % para complexos de inclusão com óleos essenciais. Esta variável deve ser considerada na escolha do método de preparo do complexo de inclusão, pois nesta técnica é necessário a recuperação do complexo por coprecipitação e caso o complexo formado apresente elevada solubilidade aquosa, terá um baixo rendimento. Analisando a Tabela 2, pode-se observar que os complexos de inclusão CI-OEOB, CI-OEOM, CI-OEMA, CI-OELA e CI-OECC, apresentaram rendimentos acima de 85 %, podendo-se inferir que esta técnica pode ser utilizada em uma possível transposição de escala para avaliação da viabilidade do preparo de complexos de inclusão para fins comerciais.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais parece estar relacionada com a presença de compostos capazes de formar ligações de hidrogênio com as enzimas fúngicas, o que provoca alterações na rigidez, integridade e a permeabilidade das membranas celular das hifas, ocasionando sua ruptura e morte celular (CABRAL; PINTO; PATRIARCA 2013). No presente trabalho, os óleos essenciais testados apresentaram em sua composição constituintes oxigenados, variando entre 47,2% para o *L. alba* e 92,2% para o *M. arvensis* e, inibiram o desenvolvimento fúngico de *A. parasiticus* em proporções variadas (Figura 2 e Figura 3), sendo possivelmente os constituintes responsáveis pela atividade antifúngica.

O óleo essencial de *M. arvensis* apresentou maior potencial antifúngico dentre os óleos essenciais testados, inibindo 100 % do crescimento micelial em todas as concentrações testadas.

Isomentona (16,6%) e L-mentol (75,6%) são os constituintes oxigenados majoritários de *M. arvensis*, representando 92,2% de sua composição.

O óleo essencial de *L. alba* inibiu 100% o crescimento do *A. parasiticus* nas concentrações de 5,0 e 10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, possuindo a L-carvona (43,5%) em sua composição.

O óleo essencial de *O. majorana* e *O. basilicum* apresentam como constituintes oxigenados majoritários o linalol (7,5 e 18,1%) e o estragol (51,8 e 64,4%), inibindo o crescimento do *A. parasiticus* na maior concentração (10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). Já o óleo essencial de *C. citratus* inibiu apenas 50% do crescimento do *A. parasiticus* na maior concentração (10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), o qual possui em sua composição os constituintes oxigenados Z-citral (33,3%) e o geranial (41,9%).

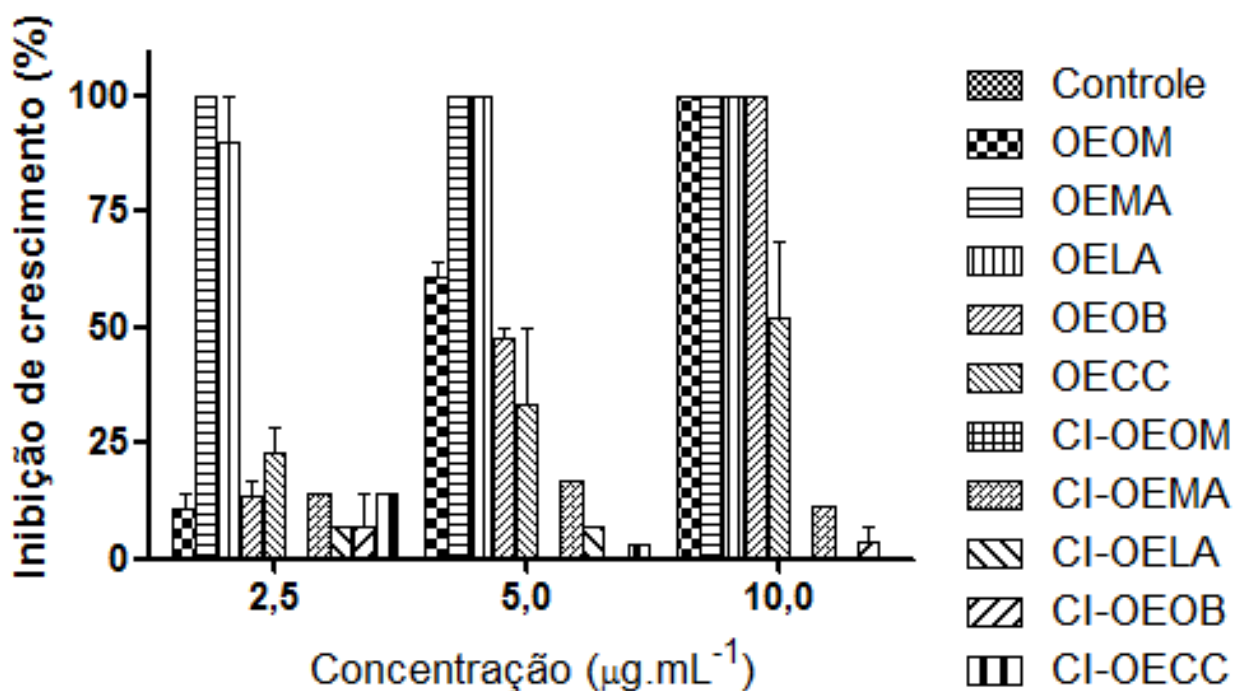


Figura 2. Efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina-PI, e seus complexos de inclusão com β -Ciclodextrina sob a porcentagem de inibição do crescimento micelial (mm) de *Aspergillus parasiticus* em MEA. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28 ± 2 °C durante nove dias.

Por outro lado, os óleos complexados com β -CD não foram capazes de reduzir o crescimento micelial no modelo experimental utilizado (Figura 2 e Figura 3). Kfoury e colaboradores (2016B) avaliando a atividade antifúngica de diversos fenilpropanóides (estragol, trans-anetol, eugenol e isoeugenol) e seus complexos de inclusão com hidroxipropil- β -

ciclodextrina, também observaram que os constituintes isolados apresentaram maior atividade antifúngica que os complexos de inclusão.

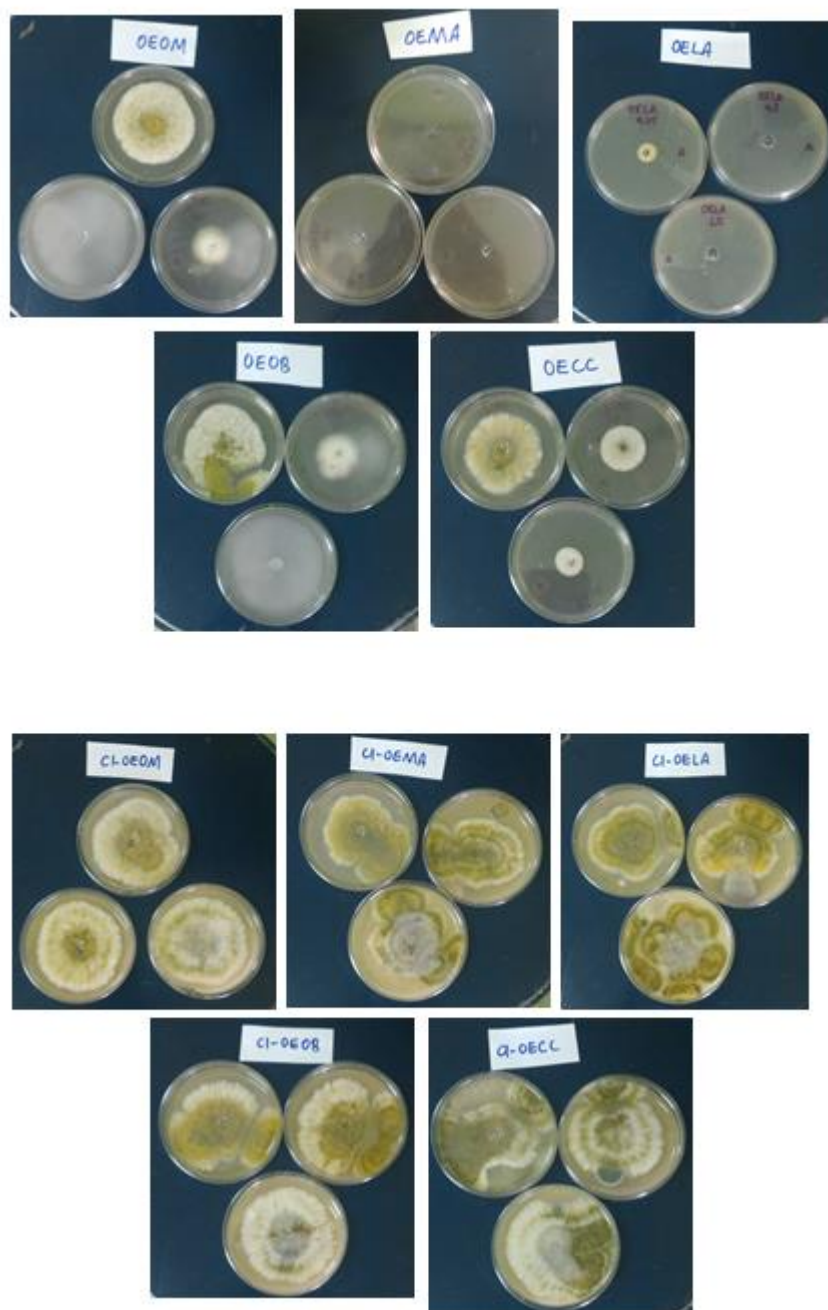


Figura 3. Efeitos das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (OEOM), *Mentha arvensis* (OEMA), *Lippia alba* (OELA), *Ocimum basilicum* (OEOB) e *Cymbopogon citratus* (OECC) coletadas em Teresina-PI, e seus complexos de inclusão com β -Ciclodextrina sob o crescimento micelial de *Aspergillus parasiticus* em ágar MEA. As placas foram incubadas a uma temperatura de 28 ± 2 °C durante nove dias.

De forma similar ao trabalho de Kfoury e colaboradores (2016B), os complexos de inclusão de CI-OEOB, CI-OEOM, CI-OEMA, CI-OELA e CI-OECC foram homogeneizados com o meio de cultura sólido e o ágar também é utilizado experimentalmente como adjuvante no preparo de complexos de inclusão para aumentar sua estabilidade (VEIGA, PERCORELLI, RIBEIRO, 2006; BLANCO-FERNANDEZ et al., 2011; MOYA-ORTEGA et al., 2012). O que, provavelmente favoreceu a estabilidade dos complexos de inclusão testados, reduzindo a taxa de liberação dos constituintes dos óleos essenciais complexados, diminuindo sua atividade antimicrobiana quando comparada aos óleos essenciais livres.

Conclusões

Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* possuem atividade antifúngica contra *Aspergillus parasiticus*.

O óleo essencial de *M. arvensis* apresentou maior atividade antifúngica, inibindo o crescimento do *A. parasiticus* a partir da concentração de 2,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. O óleo essencial de *L. alba* inibiu a partir de 5,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, de *O. majorana*, *O. basilicum* e *C. citratus* a 10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$.

Isomentona (16,6%) e L-mentol (75,6%) são os constituintes oxigenados majoritários de *M. arvensis*, representando 92,2% de sua composição. Os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* possuem 87,1% de compostos oxigenados em sua composição, *Cymbopogon citratus* 75,9%, *Origanum majorana* 65,6% e *Lippia alba* 47,4%.

A técnica de coprecipitação é eficiente para o preparo do complexo de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum* e *Cymbopogon citratus* com β -ciclodextrina, apresentando rendimento superior a 85% para todos os óleos essenciais testados.

A complexação com β -ciclodextrina reduz a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* e suprime a atividade antifúngica do óleo essencial de *O. majorana*.

Referências bibliográficas

AGUIAR, U. N.; LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; CITÓ, A. M. G. L.; SOUSA, A. J. P.; SILVA, R. M.; SILVA, I. S. A.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and modulation of antibiotic

activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products** (Print), v.74, p.165-170, 2015.

AGUIAR, U. N.; DE LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; DE FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; DE ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, p. 50-55, 2014.

ALDARS-GARCÍA, L.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Modeling postharvest mycotoxins in foods: recent research. **Current Opinion in Food Science**, v.11, p.46-50, 2016.

AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v.17, p.921-925, 2010.

ASTRAY, G.; MEJUTO, J.C.; MORALES, J.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. **Food Research International**, v.43, p.1212-1218, 2010.

BLANCO-FERNANDEZ, B.; LOPEZ-VIOTA, M.; CONCHEIRO, A.; LORENZO, C. A. Synergistic performance of cyclodextrin–agar hydrogels for ciprofloxacin delivery and antimicrobial effect. **Carbohydrate Polymers**, v.85, p.765-774, 2011,

BOSE, S. K.; YADAV, R. K.; MISHRA, S.; SANGWAN, R. S.; SINGH, A. K.; MISHRA, B.; SRIVASTAVA, A. K.; SANGWAN, N. S. Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.66, p.150-158, 2013.

BOUBAKER, H.; KARIM, H.; EL HAMDAOUI, A.; MSANDA, F.; LEACH, D.; BOMBARDA, I.; VANLOOT, P.; ABBAD, A.; BOUDYACH, E. H.; AIT BEN AOUMAR, A. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v.86, p.95-101, 2016.

CABRAL, L. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p.1-14, 2013.

CALO, J. R.; CRANDALL, F. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v.54, p.111-119, 2015.

CFR – **Code of Federal Regulations**. Part 182 – Substances generally recognized as safe. 2016. <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#sp21.3.182.a>, acessado em 01/11/2016.

FAGUNDES, C.; PÉREZ-GAGO, M. B.; MONTEIRO, A. R.; PALOU, L. Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p.391-398, 2013.

FALASCA, A.; CAPRARI, C.; FELICE, V.; FORTINI, P.; SAVIANO, G.; ZOLLO, F.; IORIZZI, M. GC-MS analysis of the essential oils of *Juniperus communis* L. berries growing wild in the Molise region: Seasonal variability and in vitro antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.69, p.166-175, 2016.

FU, Y.; SARKAR, P.; BHUNIA, A. K.; YAO, Y. Delivery systems of antimicrobial compounds to food. **Trends in Food Science & Technology**, v.57, p.165-177, 2016.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; PONTES, A. L. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F. BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology** v.214, p.168–178, 2015.

HALOCI, E.; TOSKA, V.; SHKRELI, R.; GOCI, E.; VERTUANI, S.; MANFREDINI, S. Encapsulation of *Satureja montana* essential oil in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.80, p.147-153, 2014.

HARANGI, J.; NÁNÁSI, P. Measurement of the essential oil in inclusion complexes with cyclodextrin by means of capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.166, p.103-109, 1984.

HU, Y.; ZHANG, J.; KONG, W.; ZHAO, G.; YANG, M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, v.220, p.1-8, 2017.

JERNBERG, J.; PELLINEN, J.; RANTALAINEN, A. Qualitative nontarget analysis of landfill leachate using gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, v.103, p.384-391 2013.

KACEM, N.; ROUMY, V.; DUHAL, N.; MEROUANE, F.; NEUT, C.; CHRISTEN, P.; HOSTETTMANN, K.; RHOUATI, S. Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. **Industrial Crops and Products**, v.90, p.87-93, 2016.

KAHKHA, M. R. R.; AMANLOO, S.; KAYKHAI, M. Antiaflatoxic activity of *Carum copticum* essential oil. **Environmental Chemistry Letters**, v.12, p.231-234, 2014.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; CHANOTIYA, C. S.; DUBEY, N. K. Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.89, p.29-36, 2014A.

KEDIA, A.; PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v.168-169, p.1-7, 2014B.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. **Analytica Chimica Acta**, v.918, p.21-25, 2016A.

KFOURY, M.; SAHRAOUI, A. L.; BOURDON, B.; LARUELLE, F.; FONTAINE, J.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.196, p.518-525, 2016B.

KOHIYAMA, C. Y.; RIBEIRO, M. M. Y.; MOSSINI, S. A. G.; BANDO, E.; BOMFIM, N. S.; NERILO, S. B.; ROCHA, G. H. O.; GRESPAN, R.; MIKCHA, J. M. G.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v.173, p.1006-1010, 2015.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; ANURADHA & DUBEY, N. K. Efficacy of extract and essential oil of *Lantana indica* Roxb. Against food contaminating moulds and aflatoxin B1 production. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.179-185, 2010A.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.539-543, 2010B.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO J. L.; ROLIM NETO P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

MOYA-ORTEGA, M. D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; SIGURDSSON, H. H.; CONCHEIRO, A.; LOFTSSON, T. Cross-linked hydroxypropyl- β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin nanogels for drug delivery: Physicochemical and loading/release properties. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.2344- 2351, 2012.

OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v.115, p.8511-8519, 2011.

OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v.32, p.1550-1561, 2014.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P. KUMAR, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.114-119, 2010.

PRAKASH, B.; MISHRA, P. K.; KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its in vivo practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. Fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v.56, p.240-247, 2014.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250-264, 2014.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; SIQUEIRA, V. M.; BOTELHO, D. M. S.; LIMA, N.; BATISTA, L. R. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, p.1002-1010, 2012.

TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANGY. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. **Food Chemistry**, v.130, p.520-527, 2012.

VEIGA F., PERCORELLI C., RIBEIRO L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Editora MinervaCoimbra, 2006.

WANG, J.; CAO Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v.127, p.1680-1685, 2011.

Considerações finais

Considerações finais

A extração dos óleos essenciais das partes aéreas de *Origanum majorana*; *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum*, e *Cymbopogon citratus* apresentaram rendimento que varia de 0,2% para o óleo essencial de *O. majorana* a 1,1% para o de *M. arvensis*.

A razão de aquecimento da temperatura da coluna aumentada em 1,0 °C, reduziu a duração do método proposto por Adams (2007) para 42 minutos, otimizando a utilização do aparelho sem afetar a resolução cromatográfica dos compostos presentes nos óleos essenciais de *O. majorana*; *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum*, e *C. citratus*.

Os constituintes majoritários identificados dos óleos essenciais de *Origanum majorana* foram o L-limoneno (8,7%), linalol (7,5%) e estragol (51,8%); isomentona (16,6%) e L-mentol (75,5%) para a *Mentha arvensis*, L-limoneno (32,0%), γ -terpineno (6,1%) e L-carvona (43,5%) para a *Lippia alba*, linalol (18,1%) e estragol (64,4%) para o *Ocimum basilicum*, e Z-citral (33,3%) e geranial (41,9%) para o *Cymbopogon citratus*, todos os óleos apresentando elevada abundância de constituintes oxigenados.

Os óleos essenciais de *Origanum majorana*; *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum*, e *Cymbopogon citratus* apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus parasiticus*, provavelmente devido ao elevado teor de constituintes oxigenados, que podem ligar-se a enzimas plasmáticas fúngicas ocasionando sua lise e morte celular

Destes óleos essenciais, o de *M. arvensis* destaca-se, pois, além de apresentar melhor rendimento na etapa de extração, inibe o crescimento de *Aspergillus parasiticus* em todas as concentrações testadas.

A técnica de coprecipitação demonstrou ser eficiente para o preparo dos complexos de inclusão dos óleos essenciais de *O. majorana*; *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum*, e *C. citratus* com β -ciclodextrina para todos os óleos essenciais testados.

A estabilidade térmica do complexo de inclusão do óleo essencial de *O. basilicum* com β -ciclodextrina foi determinada a 45 °C, com retenção de 65% dos constituintes complexados por 120 minutos, demonstrando a capacidade protetora da β -ciclodextrina.

Os óleos essenciais de *M. arvensis*, *L. alba*, *O. basilicum* e *C. citratus* complexados com β -ciclodextrina possuem atividade antifúngica reduzida, com o óleo essencial de *O. majorana* não apresenta atividade antifúngica, provavelmente devido ao efeito estabilizante provocado pelo ágar nos complexos de inclusão, sendo necessário a avaliação da atividade antifúngica utilizando outros modelos experimentais.

Perspectivas

Perspectivas

Durante a realização do presente trabalho e a comprovação da atividade biológica dos óleos essenciais pesquisados, constatamos o potencial da utilização dos óleos essenciais e de seus complexos de inclusão para o desenvolvimento de produtos com finalidade alimentícia, sendo necessário a continuidade dos estudos que permitam a transposição da pesquisa laboratorial para fins comerciais.

Realização de estudo de viabilidade econômica para o cultivo e obtenção de óleos essenciais de plantas utilizadas comumente no Brasil na medicina popular e na culinária.

Avaliação da segurança química e biológica dos óleos essenciais e de seus complexos de inclusão.

Desenvolvimento e avaliação da qualidade de novos produtos, utilizando os complexos de inclusão, por exemplo, como aditivo para rações para piscicultura.

Avaliação da palatabilidade, a digestibilidade e o desempenho zootécnico das rações formuladas com os complexos de inclusão.

Desenvolvimento de técnicas que permitam avaliar a atividade antifúngica dos complexos de inclusão dos óleos essenciais de *Origanum majorana*; *Mentha arvensis*, *Lippia alba*, *Ocimum basilicum*, e *Cymbopogon citratus*.

Determinação da manutenção da atividade antifúngica dos óleos essenciais complexados com β -CD.

Submissão de pedido de depósito de patentes dos complexos de inclusão desenvolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, R. L.; RODRÍGUEZ, F. J.; GUARDA, A.; GALOTTO, M. J.; BRUNA, J. E. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil componente. **Food Chemistry**, v.196, p.968-975, 2016.
- AGUIAR, U. N.; DE LIMA, S. G.; ROCHA, M. S.; DE FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; DE ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, p. 50-55, 2014.
- ALVARENGA, I. C. A.; LOPES, O. D.; PACHECO, F. V.; OLIVEIRA, F. G.; MARTINS, E. R. Fator de resposta do alecrim-pimenta a diferentes lâminas de irrigação. **Pesq. Agropec. Trop.**, v.42, p.462-468, 2012.
- BAKKALI, F. AVERBECK, S. AVERBECK, D. IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARANYI, S.; KOCSUBÉ, S.; VARGA, J. Aflatoxins: Climate change and biodegradation. **Current Opinion in Food Science**, v.5, p.60-66, 2015
- BASER, K. H. C.; **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**, CRC Press: New York, 2010.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.497-516, 2003.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, p.588-594, 2009.
- BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIQUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.533-538, 2010.
- BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR., C. S.; DOS SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova**, v.27, n.6, p.882-888, 2004.
- BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v.173, p.134-158, 2012.

CALO, J. R.; CRANDALL, F. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v.54, p.111-119, 2015.

CEVALLOS, P. A.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v.99, p.70-75, 2010.

CFR – **Code of Federal Regulations**. Part 182 – Substances generally recognized as safe. 2016.

<http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text->

[idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#sp21.3.182.a](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#sp21.3.182.a), acessado em 01/11/2016.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; COSTA, L. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAN, E. S.; BRANT, R. S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.80-89, 2010.

DWIVEDY, A. K.; KUMAR, M.; UPADHYAY, N.; PRAKASH, B.; DUBEY, N. K. Plant essential oils against food borne fungi and mycotoxins. **Current Opinion in Food Science**, v.11, p.16–21, 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Codex Alimentarius** - Cereals, Pulses, Legumes and Vegetable Proteins. Rome, 2007.

FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. **Postharvest Biology and Technology**, v.78, p.133-138, 2013.

FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I. M.; NOVÁK, C. S. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.95, p.855-863, 2009.

FU, Y.; SARKAR, P.; BHUNIA, A. K.; YAO, Y. Delivery systems of antimicrobial compounds to food. **Trends in Food Science & Technology**, v.57, p.165-177, 2016.

GARCÍA-CELA, E.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARIN, S. Emerging risk management metrics in food safety: FSO, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard? **Food Control**, v.25, p.797-808, 2012.

- GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; PONTES, A. L. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F. BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology** v.214, p.168–178, 2015.
- GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; SANTOS, M. M. F.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F. BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. **International Journal of Food Microbiology** v.34, p.112–121, 2016.
- HALOCI, E.; TOSKA, V.; SHKRELI, R.; GOCI, E.; VERTUANI, S.; MANFREDINI, S. Encapsulation of *Satureja montana* essential oil in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.80, p.147-153, 2014.
- HASSAN, A. M.; KENAWY, A. M.; ABBAS, W. T.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Prevention of cytogenetic, histochemical and biochemical alterations in *Oreochromis niloticus* by dietary supplement of sorbent materials. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.1890-1895, 2010.
- HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v.98, p.2035-2044, 1998.
- JIANG, S.; LI, J.-N.; JIANG, Z.-T. Inclusion reactions of β -cyclodextrin and its derivatives with cinnamaldehyde in *Cinnamomum loureirii* essential oil. **European Food Research and Technology**, v.230, p.543-550, 2010.
- KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. **Analytica Chimica Acta**, v.918, p.21-25, 2016.
- KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; RUELLAN, S.; GREIGE-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. **Carbohydrate Polymers**, v.118, p.156-164, 2015.
- LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES SOBRINHO J. L.; ROLIM NETO P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

- MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.218-237, 2013.
- MARROQUÍN-CARDONA, A. G.; JOHNSON, N. M.; PHILLIPS, T. D.; HAYES, A. W. Mycotoxins in a changing global environment – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.69, p.220-230, 2014.
- NGUEFACK, J.; LEKAGNE DONGMO, J. B.; DAKOLE, C. D.; LETH, V.; VISMER, H. F.; TORP, J.; GUEMDJOM, E. F. N.; MBEFFO, M.; TAMGUE, O.; FOTIO, D.; AMVAM ZOLLO, P. H.; NKENGFACK, A. E. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi **International Journal of Food Microbiology**, v.131, p.151-156, 2009.
- OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v.115, p.8511-8519, 2011.
- PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.174-187, 2015.
- PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P. KUMAR, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.114-119, 2010.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250-264, 2014.
- SANTOS, P. L.; BRITO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; QUINTANS, J. S. S.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, M. R. V.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, v.23, p.948-957, 2016.
- WANG, J.; CAO Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v.127, p.1680-1685, 2011.