

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Bárbara Costa Antunes da Rocha

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
TOMILHO (THYMUS VULGARIS)**

BÁRBARA COSTA ANTUNES DA ROCHA

Sob a orientação do Professor
Dr. Gerson Luiz Vieira Coelho
e co- Orientação da Professora
Dra. Kátia Yuri Fausta Kawase

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciência** em
Engenharia Química, Área de
concentração em Tecnologia
Química.

Seropédica, RJ

Fevereiro, 2013

660.284248

R672e

T

Rocha, Bárbara Costa Antunes da,
1989-

Extração e caracterização do
óleo essencial de tomilho (*Thymus
vulgaris*)/ Bárbara Costa Antunes da
Rocha - 2013.

105 f. : il.

Orientador: Gerson Luiz Vieira
Coelho.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Engenharia Química.

Bibliografia: f. 65-79.

1. Extração (Química) - Teses.
2. Tomilho - Teses. 3. Essências e
óleos essenciais - Composição -
Teses. 4. Extração por solventes -
Teses. 5. Extração com fluido
supercrítico - Teses. I. Coelho,
Gerson Luiz Vieira, 1952-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Engenharia Química. III. Título.

Bibliotecário: _____

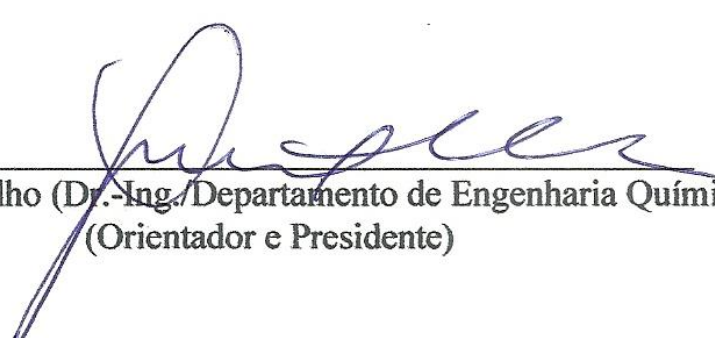
Data: __/__/____

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BÁRBARA COSTA ANTUNES DA ROCHA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/13


Gerson Luiz Vieira Coelho (Dr.-Ing./Departamento de Engenharia Química/UFRRJ)
(Orientador e Presidente)


Cheila Gonçalves Mothé (D.Sc./ Escola de Química/UFRJ)


Lidilhone Hamerski Carbonezi (D.Sc./Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais/UFRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram em especial meus pais Marcos e Nádia, minha irmã Débora, familiares, professores e amigos.
A todos vocês meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela inspiração, força e presença constante.

Aos meus pais: Marcos Barbosa da Rocha e minha mãe Nádia Costa Antunes da Rocha pelo amor, apoio e dedicação plena nesses dois anos. Sem vocês esse sonho não seria possível.

À minha irmã Débora Costa Antunes da Rocha pela compreensão e amizade.

Ao meu companheiro fiel Eder Marcondes Rosa, que entendeu minhas ausências e sempre me apoiou com muita dedicação, carinho e amor.

À minhas Avós Luzia e Any que sempre estiveram presentes com sorriso nos lábios.

À meus tios Maurício e Sandra e primas Juliana e Nathália pela força e pelo incentivo.

À minha madrinha querida Jaíra, pelo amor e carinho.

Aos meus queridos amigos e familiares Lúcia, Alline e Ronaldo, por todo apoio, força e incentivo nessa jornada acadêmica.

À todos os colegas e amigos que fiz durante estes dois anos de muito estudo.

À todos os professores que contribuíram para minha formação e que me ajudaram prontamente sempre que precisei.

Ao meu orientador Gerson Luiz Vieira Coelho que me ajudou a realizar esse trabalho com muito apoio, dedicação e paciência.

E por último, mas não menos importante a querida Kátia Yuri Fausta Kawase pela ajuda, dedicação, disponibilidade e carinho. Por todo seu incentivo e ajuda nos experimentos!

A todos os demais que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Nascida em 21 de janeiro de 1989, filha de Marcos Barbosa da Rocha e Nádia Costa Antunes da Rocha. Estudou o ensino fundamental no colégio Realengo e o ensino médio no Colégio Prioridade Hum. Durante o ensino médio o gosto pela química e a área de saúde afloraram. Por estes motivos ingressou no Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), no curso de farmácia, no ano de 2006.

Durante a graduação foi monitora por 2 anos de química geral e Inorgânica e um ano monitora de Físico-química. Foi desta forma que desenvolveu a paixão pela carreira de docência. Além disso, foi aluna de iniciação científica na Universidade Federal do Rio de Janeiro, durante um ano, onde desenvolveu projeto de avaliação antimicrobiana de óleos essenciais obtido de plantas aromáticas.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no primeiro semestre de 2010 como aluna de mestrado do programa de pós-graduação em engenharia química. Engajou-se na linha de pesquisa do laboratório de Processo e Separação (LPS), onde desenvolveu uma pesquisa de extração e caracterização de óleo essencial da planta aromática *Thymus vulgaris*. A pesquisa teve como foco as seguintes técnicas de extração: hidrodestilação, extração com solvente, extração com fluido supercrítico e microextração em fase sólida que deram origem a sua dissertação de mestrado.

A partir dos trabalhos desenvolvidos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, participou do III Simpósio Internacional de Plantas Mediciniais e Nutracêuticos (3ISMNP), juntamente com a III Conferência do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Frutos Tropicais, onde apresentou um trabalho oral. Outra participação em eventos foi no VII Fórum da Pós Graduação da UFRRJ, onde apresentou um trabalho na forma de painel.

Atualmente está concluído o mestrado e escrevendo artigos para submissão em revistas científicas.

RESUMO

ROCHA, Bárbara Costa Antunes. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**, UFRRJ. 2013. 105p Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a composição química do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) usando diferentes técnicas de extração. As técnicas de extração utilizadas foram: hidrodestilação (HD), extração com solvente (SE), extração com fluido supercrítico (SFE) e microextração em fase sólida (SPME) e a identificação dos componentes foi realizada utilizando GC-MS. Foram investigadas algumas variáveis que podem influenciar no processo de extração, tais como perfil de temperatura, tempo de extração e escolha da fibra para SPME, e pressão e tempo de extração para SFE. Os métodos de extração utilizados mostraram-se eficientes para identificação dos principais componentes presentes no tomilho, porém com algumas diferenças qualitativas e quantitativas. Quantitativamente, os componentes majoritários, em todas as técnicas utilizadas, foram monoterpenos e sesquiterpenos. Entre os métodos convencionais a extração com solvente apresentou maior quantidade de componentes extraídos (30) quando comparado com a hidrodestilação, que extraiu apenas 24 compostos. A extração com solvente também apresentou maior concentração de alguns componentes presentes nas folhas de *Thymus vulgaris* quando comparado com a hidrodestilação. Comparando a extração usando CO₂ supercrítico com a extração com solvente, a primeira mostrou-se mais eficiente, pois extraiu uma maior quantidade de compostos (33) em um menor período de tempo (60min). Além disso, os extratos obtidos através do CO₂ em alta pressão são livres de solvente, o que aumenta a pureza/qualidade do óleo essencial. A SPME, além de ser o procedimento de extração mais simples foi o mais rápido (30min), e ainda mostrou-se capaz de identificar um maior número de compostos de *T. vulgaris* (47) quando comparado aos demais métodos utilizados. Ademais, a microextração em fase sólida indicou a presença dos terpenos β -terpineno, α -Cubebene e Cadalene, ainda não mencionados em outros trabalhos de pesquisa com o *Thymus vulgaris*.

Palavras-chave: *Thymus vulgaris*, hidrodestilação, extração com solvente, extração com fluido supercrítico e microextração em fase sólida.

ABSTRACT

ROCHA, Barbara Costa Antunes. **Extraction and characterization of essential oils from *Thymus Vulgaris***. UFRRJ, 2013. 105p Dissertation. (Masters of Science in Chemical Engineering, Chemical Technology). Institute of Technology, Chemical Engineering Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This work aim to study the chemical composition of leaves of *Thymus vulgaris* (thyme) using different extraction techniques. The extraction techniques used were: hydrodistillation (HD), solvent extraction (SE), supercritical fluid extraction (SFE) and solid phase microextraction (SPME). The identification of the components was performed using GC-MS. Some variables that can influence the extraction process were investigated, such as temperature profile, extraction time and choice of fiber for SPME and pressure and extraction time for SFE. The extraction methods used were effective for identifying key components present in thyme, but with some qualitative and quantitative differences. Quantitatively, the major components in all techniques were monoterpenes and sesquiterpenes. Among the conventional methods, extraction solvent obtained a higher amount of extracted components (30) when compared with hydrodistillation, with only 24 compounds. The solvent extraction showed higher concentrations of some components in *Thymus vulgaris* leaves when compared with hydrodistillation. Comparing the supercritical fluid extraction and solvent extraction, the first was more efficient because obtained a greater range of extracted compounds (33) in a shorter period of time (60 min). Furthermore, the extracts obtained by SFE are free of solvent, which increases the purity/quality of the oil. The SPME is an extraction procedure easier and faster (30min), besides being even able to identify a greater number of compounds of *T. vulgaris* (47), when compared to other methods. Moreover, the solid phase microextraction indicated the presence of compounds β -terpinene, α -Cubebene and Cadalene. These three compounds were not mentioned in others researches with *Thymus vulgaris*.

Key Words: *Thymus vulgaris*, hydrodistillation, solvent extraction, solid-phase microextraction, supercritical fluid extraction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. (PERES, 2004).
- Figura 02 -** Estruturas químicas dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) de óleos essenciais (BAKKALI *et al.* 2008).
- Figura 03 -** Estruturas químicas dos compostos aromáticos e terpenóides (isoprenos) de óleos essenciais (BAKKALI *et al.* 2008).
- Figura 04:** Esquema mostrando os principais fatores e condições do ambiente que podem influenciar nos teores de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES 2007).
- Figura 05:** Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)
- Figura 06:** Compostos relacionados com a atividade biológica do óleo essencial *T. vulgaris*.
- Figura 07:** Diagrama de fases de uma substância pura evidenciando o estado supercrítico.
- Figura 08:** Representação de um *holder* (aplicador) para SPME, com a fibra retraída (acima) e exposta (desenho inferior) (BIAJOLI, 2008).
- Figura 09:** Etapas da microextração em fase sólida. (a) extração no modo headspace (b) extração no modo direto (c) dessorção dos analitos no cromatógrafo (DÓREA *et al.* 2008).
- Figura 10:** Etapas básicas para extração com SPME.
- Figura 11:** Etapas da preparação e armazenamento do material vegetal (tomilho).
- Figura 12:** Esquema de extração supercrítica, que consiste em tanque de CO₂ (1), compressor (2), bomba pneumática (3), válvula de agulha (4), medidores de temperatura e pressão (5), tanque pulmão (6), válvula micrométrica (7), extrator de leito fixo (8), banho termostático (9) e frasco de coleta (10).
- Figura 13:** Extração por SPME utilizando a unidade experimental
- Figura 14:** Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-2010 SHIMADZU)
- Figura 15:** Avaliação do efeito antifúngico do óleo de tomilho sobre *candida albicans*.
- Figura 16:** Cinética de extração SFE de folhas de tomilho, a 140 bar, 313K e fluxo de CO₂ 15-50 L / h.
- Figura 17:** Cinética de extração SFE de folhas de tomilho, a 150 bar, 313K e fluxo de CO₂ 15-50 L / h.
- Figura 18:** Cinética de extração SFE de folhas de tomilho, a 160 bar, 313K e fluxo de CO₂ 15-50 L / h.
- Figura 19:** Comparação da área do pico (%) no tempo de 60 min dos principais componentes de óleo essencial de tomilho, em diferentes pressões e temperatura de 40 ° C.

Figura 20: O efeito de diferentes fibras de SPME na eficiência de extração de folhas de tomilho (temperatura de 20°C e tempo de extração de 60 min).

Figura 21: Número de compostos identificados pelas diferentes fibras de SPME de folhas de tomilho (temperatura de 20°C e tempo de extração de 60 min).

Figura 22: O efeito das diferentes temperaturas de extração da SPME sobre as eficiências de extração de folhas de tomilho (tempo de extração de 40 min com fibra de PDMS/DVB).

Figura 23: O efeito de diferentes tempos de extração de SPME na eficiência de extração de folhas de tomilho (temperatura extração de 80 ° C com fibra de PDMS/DVB).

Figura 24: Cromatograma de íon total dos compostos de *Thymus vulgaris* obtido por HD (a), SE (b), SFE (c), SPME (d) e o padrão do óleo essencial de tomilho (e).

Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura das glândulas de folhas de tomilho: (a) sem tratamento, (b) após SE, (c) após SFE.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Rendimento (%) de diferentes óleos essenciais (Sartoratto, *et al* 2004).

Tabela 02: Propriedades físico-químicas dos líquidos, fluídos supercríticos e gases.

Tabela 03: Condições críticas de algumas substâncias supercríticas mais utilizadas na SFE

Tabela 04: Algumas características das fibras de SPME disponíveis comercialmente para amostragem (VALENTE & AUGUSTO 2000).

Tabela 05: Halo de inibição das amostras testadas frente a *candida albicans*.

Tabela 06: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por hidrodestilação.

Tabela 07: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por extração com solvente (etanol).

Tabela 08: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por hidrodestilação e extração com solvente (etanol).

Tabela 09: Identificação por GC-MS dos principais constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por SFE.

Tabela 10: Números de compostos extraídos de *Thymus vulgaris* com SFE nas diferentes condições estudadas.

Tabela 11: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por extração com fluído supercrítico (a pressão de 160bar, temperatura de 40°C e tempo de extração de 60 min).

Tabela 12: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por microextração em fase sólida (fibra PDMS/DVB, temperatura de 80°C e tempo de extração de 30 min).

Tabela 13: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por extração com fluído supercrítico e microextração em fase sólida.

Tabela 14: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por HD, SE, SFE, SPME e o padrão da sigma.

Tabela 15: Comparação dos parametros de extração para hidrodestilação (HD), extração com solvente (SE), extração com fluído supercrítico (SFE) e microextração em fase sólida (SPME).

Tabela 16: Vantagens e desvantagens dos métodos extrativos utilizados nesse estud

LISTA DE ABREVIATURA

OE-Óleo essencial

SPME-Microextração em fase sólida

SFE-Extração com fluido supercrítico

HD-Hidrodestilação

Extração com solvente

OMS-Organização Mundial de Saúde

Tc-Temperatura crítica

Pc-Pressão crítica

t_e-Tempo de equilíbrio

PDMS-Polidimetilsiloxano

PA-Poliacrilato

CW-DVB-Carbowax/divinilbenzeno

PDMS/DVB-Polidimetilsiloxano/ divinilbenzeno

PDMS-CAR-Carboxen/polidimetilsiloxano

MEV-Microscopia eletrônica de varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. ÓLEOS ESSENCIAIS	4
3.1.1. Metabolismo Secundário Vegetal	4
3.1.2. Composição dos óleos essenciais	5
3.1.3. Fatores que influenciam a química dos óleos essenciais	7
3.1.4. Toxicidade	10
3.1.5. Aplicabilidade e comercialização dos óleos essenciais	10
3.1.6. Atividade antimicrobiana	11
3.2. <i>CANDIDA ALBICANS</i>	12
3.2.1. Classificação	12
3.2.2. Histórico	12
3.2.3. Fatores de Risco do Hospedeiro	13
3.3. <i>THYMUS VULGARIS</i>	13
3.3.1. Estudos microbiológicos de <i>Thymus vulgaris</i>	15
3.3.2. Estudos da composição química de <i>Thymus vulgaris</i>	16
3.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	17
3.4.1. Hidrodestilação (HD)	18
3.4.2. Extração com Solvente (SE)	18
3.4.3. Extração com Fluido Supercrítico (SFE)	19
3.4.4. Microextração em Fase Sólida (SPME)	22
3.4.5. Algumas aplicações comparativas das técnicas	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. MATERIAIS	28
4.1.1. Plantas	28
4.1.2. Reagentes e Equipamentos	28
4.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	28
4.2.1. Hidrodestilação	28

4.2.2. Extração com solvente	29
4.2.3. Extração com fluido supercrítico	29
4.2.4. Microextração em fase sólida	30
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE	31
4.3.1. Identificação dos compostos de <i>Thymus vulgaris</i>	31
4.3.2. Análise Microbiológica	32
4.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. RENDIMENTO DO MATERIAL VEGETAL	34
5.2. ANÁLISES COM GC/MS	34
5.2.1 Composição de <i>Thymus vulgaris</i> obtido por diferentes métodos extrativos	34
5.2.1.1. Extração por hidrodestilação (HD)	34
5.2.1.2. Extração com sovente (SE)	36
5.2.1.3. Comparação entre os dois diferentes métodos de extração, hidrodestilação e extração com solvente	38
5.2.1.4. Extração com fluido supercrítico (SFE)	40
5.2.1.5. Microextração em fase sólida (SPME)	45
5.2.1.6. Comparação entre os dois diferentes métodos de extração, extração com fluido supercrítico e microextração em fase sólida	51
5.2.1.7. Comparação de todos os métodos	53
5.2.1.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	80
ANEXO A	81
Figura A1: Cromatograma do timol com seu respectivo tempo de retenção	81
Figura A2: Cromatograma do carvacrol com seu respectivo tempo de retenção	81
ANEXO B	82
Compostos encontrados nas amostras de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> L)	82

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos é uma prática muito antiga, remonta aos primórdios da medicina e é fundamentada nos conhecimentos adquiridos ao longo de muitas gerações. Desta forma, no decorrer dos séculos, produtos naturais constituíram as bases para o tratamento de diferentes doenças (SOUZA, *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais (OE) possuem uma posição de destaque na fitoterapia devido às suas propriedades terapêuticas, que são reconhecidas pelos povos antigos e muito utilizadas na medicina popular. São compostos líquidos, orgânicos, voláteis e lipofílicos extraídos de plantas. Várias atividades farmacológicas dos óleos essenciais foram relatadas, como no tratamento de doenças cardiovasculares, no combate a micro-organismos como bactérias, vírus e fungos, tratamento de arteriosclerose, combate a radicais livres (antioxidante) entre outros (EDRIS, 2007).

Além disso, atualmente diversos óleos essenciais e alguns componentes extraídos destes têm revelado um grande potencial antioxidante podendo ser considerado antioxidantes naturais, desta forma poderiam ser utilizados como substitutos potenciais aos antioxidantes sintéticos (BOZIN, *et al.*, 2006).

Também são muito utilizados na fitoterapia, devido a sua atividade antimicrobiana. Esta característica está diretamente relacionada às atividades de metabólitos secundários da planta.

Os óleos essenciais são utilizados em diversos setores industriais como, por exemplo, na fabricação de fármacos, perfumes, cosméticos, produtos de higiene e limpeza, alimentos e bebidas.

O Brasil apresenta grande potencial para produção de fitomedicamentos, uma vez, que possui uma grande diversidade vegetal. Desta maneira, o surgimento de novos alvos terapêuticos para patologias que possuem tratamento baseado em antibióticos sintéticos que provocam grandes efeitos colaterais é de grande relevância. Fato este evidenciado na candidíase.

Neste contexto um óleo que merece destaque é o *Thymus Vulgaris*, popularmente conhecido por tomilho (planta nativa da região do Mediterrâneo). O tomilho é uma planta da família Lamiaceae, que possui cerca de 150 gêneros e 2800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo (PORTE & GODOY, 2001).

A composição química pode variar de acordo com o método extrativo e condições utilizadas. Dependendo do método de extração algumas plantas podem ter suas características químicas totalmente modificadas. Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Desta maneira quatro técnicas foram utilizadas para caracterização e comparação dos componentes presentes em *Thymus vulgaris*, são elas: Microextração em fase sólida (SPME); Extração com fluído supercrítico (SFE); Hidrodestilação (HD); Extração com solvente (SE).

A utilização de plantas medicinais e seus respectivos óleos essenciais para tratamento de doenças vêm crescendo. Este fato se torna mais evidente no caso de micro-organismo que tem demonstrado resistência ao tratamento convencional, como é o caso da *Candida albicans*. A candidíase é uma patologia provocada por um fungo, mais especificamente do gênero *Candida*, a *Candida albicans*. Este está presente na microbiota do ser humano sem causar danos. Porém, em pessoas imunodeprimidas podem causar sérias complicações, como é o caso dos HIV positivo, transplantados, recém-nascidos, dentre outros.

A candidíase pode ser superficial ou profunda, com localização cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica. Esta patologia está relacionada tanto a debilidade

imunológica do paciente quanto a uma combinação de fatores, chamados fatores de virulência capazes de agravar ainda mais a doença e dificultar o tratamento.

Tendo em vista as limitações dos antifúngicos sintéticos que existem atualmente, quer seja por efeitos colaterais, quer pela disponibilidade, existe a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas.

Este trabalho tem por finalidade extrair e caracterizar o óleo essencial de tomilho pelas técnicas citadas acima, a fim de realizar uma análise comparativa das composições químicas obtida dos diferentes métodos utilizados e identificar novos alvos terapêuticos que possam ser passíveis de aplicação na área farmacêutica, mas especificamente frente a *Candida albicans*.

2.OBJETIVOS

▶ Objetivo geral:

Este trabalho tem por objetivo analisar a composição química do óleo essencial de tomilho através de quatro técnicas, são elas: microextração em fase sólida, extração com fluido supercrítico, destilação a vapor e extração com solvente para identificação de novos compostos que possam ser utilizados em uma futura aplicação farmacêutica.

▶ Objetivos específicos:

- ▶ Analisar os componentes voláteis presentes no óleo essencial por cada técnica extrativa e fazer a identificação por cromatografia gasosa com espectrometria de massa;
- ▶ Extrair compostos alvos que possam ser utilizados para aplicação farmacêutica;
- ▶ Comparar os componentes obtidos por cada método extrativo e determinar a técnica mais eficaz, pontuando vantagens e desvantagens;
- ▶ Comparar todos os resultados obtidos pelas extrações com óleo padrão obtido da Sigma;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ÓLEOS ESSENCIAIS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem estimulando o uso concomitante da medicina tradicional e da medicina complementar. No Brasil, essa integração tem sido utilizada como opção ao uso exclusivo de técnicas da medicina tradicional no sistema de saúde. Essa medida tem por objetivo proporcionar desenvolvimento de políticas observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acessibilidade (BRASIL, 2006).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtido por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (BRASIL, 2007).

Os óleos essenciais são também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, são definidos como produtos obtidos de partes de plantas, através de destilação por arraste por vapor d'água (SIMÕES, *et al.*, 2004).

A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas aromáticas que na maiorias das vezes estão localizadas em países de clima temperado a quente, como nos países tropicais e na da região do Mediterrâneo, onde representam uma parte importante da farmacopéia (BURT, 2004). Os óleos essenciais são líquidos voláteis, límpidos, por vezes coloridos, lipossolúveis, com uma densidade geralmente mais baixa do que a da água e se caracterizam por possuírem sabor e intenso odor.

Podem ser sintetizados por toda a planta, como por exemplo, em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, nas células da epiderme ou tricomas glandulares (BURT, 2004; SIMÕES, *et al.*, 2004).

Observa-se o interesse crescente em torno dos fitoterapia, quando comparados à terapia convencional, devido a vantagens como: menores efeitos colaterais e toxicidade relativa, baixo custo, e à menor probabilidade de ocorrer o desenvolvimento de resistência, uma vez que os metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados. Tudo isso aliado ao fato de o Brasil apresentar uma enorme variedade de fitomedicamentos em sua flora nativa (SOUZA, *et al.*, 2007; SANTOS, *et al.*, 2006).

3.1.1. METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO

No metabolismo vegetal são produzidos metabólitos primários ou macromoléculas, produtos químicos que, através de rotas biossintéticas elaboradas, diversas e frequentemente desconhecidas, originam os metabólitos secundários ou micromoléculas, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente dos metabólitos primários, encontrados em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Os metabólitos primários são aqueles essenciais à vida e comuns aos seres vivos, enquanto que os metabólitos secundários são aqueles que embora não necessariamente essenciais, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Apesar de nem sempre ser necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, o metabolismo secundário desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Uma das principais funções dos compostos gerados são os mecanismos de defesa das plantas. Possui também ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais. Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (PERES, 2004).

Em termos químicos, os terpenos são formados por unidades isoprênicas (C₅) derivados a partir do ácido mevalônico, no citoplasma ou pelo piruvato. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, derivados dos fenilpropanóides da via do ácido chiquímico. Já os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina, conforme pode ser observado na figura 01 (PERES, 2004).

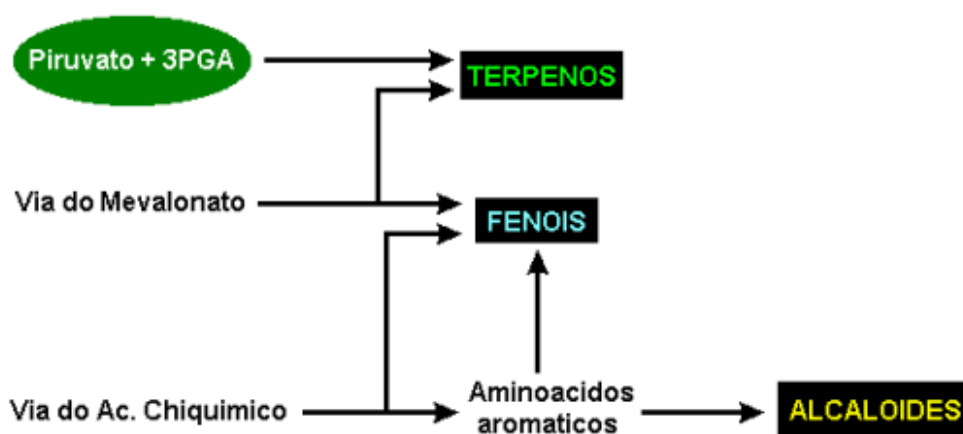


Figura 01: Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. (PERES, 2004).

Óleos essenciais são resultantes do metabolismo secundário das plantas, normalmente formados em células ou grupos de células especializadas, geralmente encontradas nos caules e folhas. Sua composição química varia significativamente com diversos fatores, desde o cultivo da planta até o método de extração (HILI, 1997).

Embora muitos metabólitos primários também sejam de interesse em algumas áreas, o elevado número e a grande diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm despertado o interesse de pesquisadores que vêem neles uma fonte promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SIMÕES, *et al.*, 2004).

3.1.2. COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSÊNCIAS

Os óleos essenciais são constituídos por complexas misturas naturais que podem conter 20-60 compostos em concentrações bastante diferentes. Porém existem na maioria das vezes 2 ou 3 componentes em concentrações mais elevadas que são denominados majoritários, podendo estar presente em concentrações de até 70% (BAKKALI, *et al.*, 2008).

São geralmente constituídos de misturas variadas, compostas principalmente por terpenóides e inúmeros hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas, destacando-se a presença de terpenos, terpenóides (isopropanóides), aromáticos e constituintes alifáticos. Sendo os terpenos e aromáticos, dentre os compostos químicos, os principais responsáveis pelas aplicações medicinais, culinárias e flavorizantes (DORMAN, 2000).

O aroma das plantas medicinais é o derivado da mistura de compostos voláteis, os terpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados (DIAZ-MAROTO, *et al.*, 2002).

Os terpenóides constituem uma vasta variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo utilizado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isoprenos (C₅). Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidade pentacarbonadas (unidades isoprênicas) (SIMÕES *et al.* 2004).

Os principais terpenos são: os monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), hemiterpenos (C₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀). Porém os terpenos mais frequentes nos OE são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Os monoterpenos atuam na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides estão ligados diretamente à origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam diferentes funções (SIMÕES, *et al.*, 2004). As estruturas químicas dos terpenos são apresentadas Figura 02.

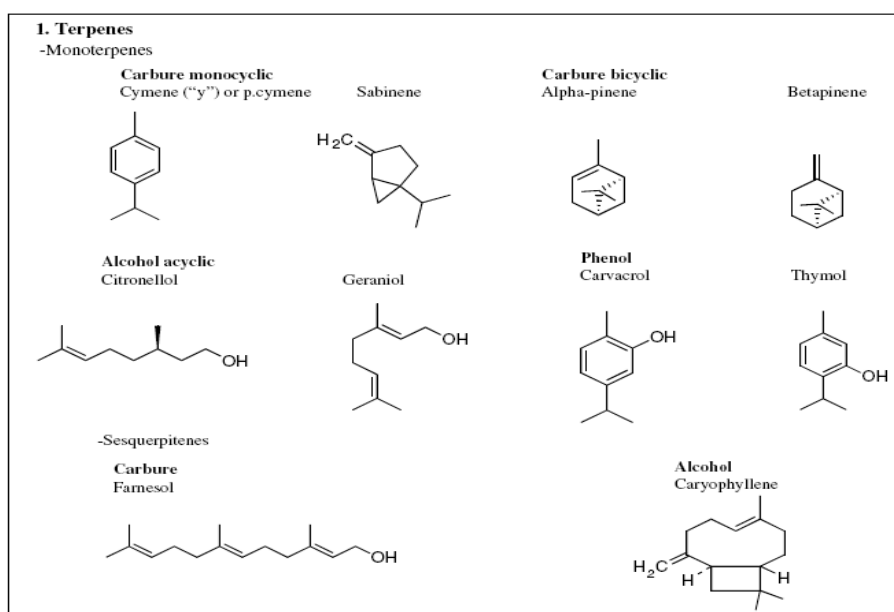


Figura 02 - Estruturas químicas dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) de óleos essenciais (BAKKALI, *et al.*, 2008).

No geral, os terpenóides são os constituintes predominantes dos óleos essenciais das plantas, mas muitos dos óleos essenciais também podem ser compostos de outros produtos químicos, os fenilpropanóides.

Os fenilpropanóides são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivadas biossinteticamente do ácido chiquímico (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Os compostos aromáticos são formados a partir de oxidações com degradação de cadeia lateral dos fenilpropanóides. Os compostos aromáticos podem ser vistos na figura 03 (SIMÕES, *et al.*, 2004).

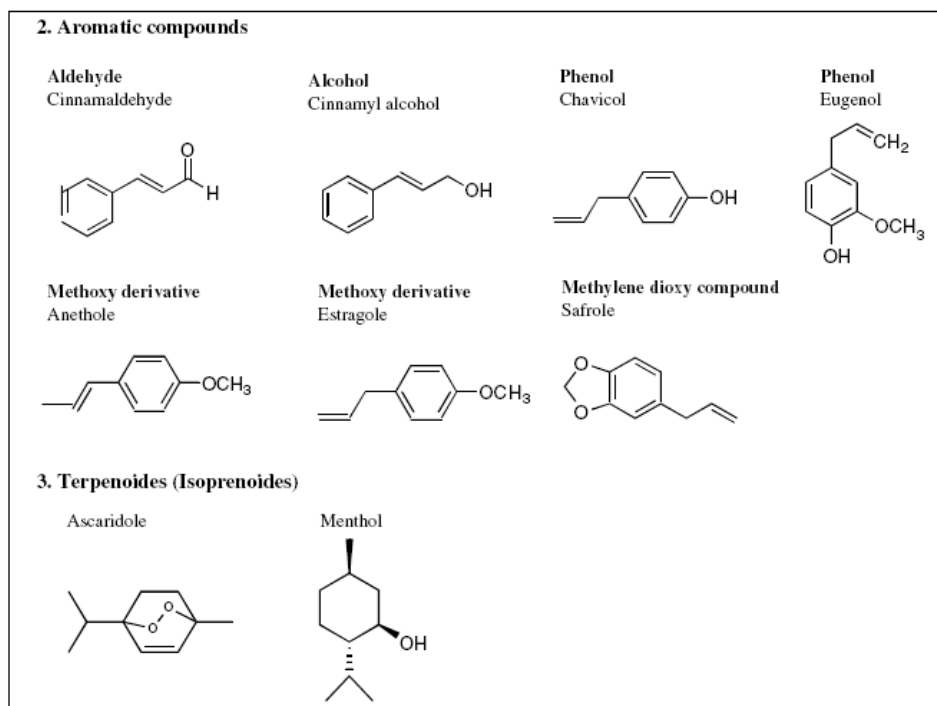


Figura 03 - Estruturas químicas dos compostos aromáticos e terpenóides (isoprenos) de óleos essenciais (BAKKALI, *et al.*, 2008).

3.1.3. FATORES QUE INFLUENCIAM A QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição dos óleos essenciais de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e características para seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais podem causar algumas variações significativas.

Segundo SIMÕES, *et al.*, (2004) os óleos essenciais podem apresentar diferentes composições de acordo com as condições climáticas, estágio de desenvolvimento da planta e localização na planta da estrutura secretora. Os compostos ativos presentes nos óleos são originados dos metabólitos das plantas. Dessa maneira, a sua composição química pode variar conforme a parte da planta, o grau de desenvolvimento, o horário do dia e o ambiente onde tais plantas se encontram (figura 04). Geralmente os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BETTS, 2001; PICHERSKY, *et al.*, 2006).

O ambiente onde a planta se desenvolve e os tipos de cultivo interferem na composição química dos óleos essenciais. A umidade relativa, a duração total de exposição ao sol, temperatura e o regime de ventos interferem de forma direta, principalmente nas espécies em que as estruturas histológicas de estocagem encontram-se na superfície. Já nas plantas em que a localização dessas estruturas são mais profundas, a qualidade dos óleos essenciais é mais constante. Deve-se preferencialmente coletar plantas ricas em óleos voláteis bem cedo pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Geralmente as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (REIS, *et al.*, 2004).



Figura 04: Esquema mostrando os principais fatores e condições do ambiente que podem influenciar nos teores de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Em geral, a formação de óleo essencial parece aumentar em elevadas temperaturas, porém pode ocorrer perda excessiva de metabólitos em dias muito quentes (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

VOIRIN, *et al.*, (1990) analisaram a composição do óleo obtido de folhas *Mentha piperita* (hortelã) crescendo em salas de ambiente controlado. Foi verificado que o mentofurano era o principal monoterpreno de todas as folhas, enquanto mentona e mentol estavam presentes em percentagens baixas quando a planta foi submetida a dias curtos. Por outro lado, quando submetida a dias longos os compostos majoritários do óleo essencial foram mentol, a mentona, composto quase ausente em dias curtos.

SILVA, *et al.*, (2003) avaliaram a variação do teor de óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriçã) em relação ao estágio de desenvolvimento da planta e o horário da colheita. Duas colheitas foram realizadas, uma aos cinco e a outra aos dez meses após o plantio. A colheita realizada dez meses após o plantio pela manhã, apresentaram 170% a mais de óleo, em comparação com as plantas colhidas 5 meses após o plantio no mesmo horário. O horário da colheita não teve influência para as plantas colhidas 5 meses após o plantio, porém a colheita realizada em 10 meses pela manhã apresentou maior teor de óleo essencial quando comparada com aquelas colhidas a tarde.

Esta alteração na composição do óleo essencial pode ocasionar respostas diferentes em relação a ensaios com patógenos, pois o composto responsável pela atividade biológica devido a coletas em horários diferentes pode ter sua concentração no óleo essencial alterada (BLANK, *et al.*, 2005).

NASCIMENTO, *et al.*, (2006) avaliaram o efeito do horário de corte sobre o rendimento do óleo essencial de *Andropogum sp* (capim santo) bem como seu constituinte majoritário, citral. Foram testados seis horários de colheitas: 7, 9, 11, 13, 15 e 17 horas. A realização do corte de 7hs possibilitou a obtenção dos maiores rendimentos de óleo essencial

e com menos conteúdo de citral. Por outro lado, a colheita das 13hs possibilitou um maior percentual de citral (91,7%), porém este horário apresentou menor rendimento de óleo essencial.

Em outro estudo foi avaliado a composição dos óleos essenciais de *Ruta chalepensis* L. (Arruda) obtido de diferentes partes da planta (flores secas, folhas e hastes). De fato, o presente estudo permitiu identificar 13 principais compostos. Os principais são 2-undecanona, 2-decanona e 2-dodecanone. 2-undecanona mostrou ser o único componente (100%) do óleo essencial obtido a partir de flores. Pulegona foi identificado apenas no óleo essencial das hastes (cerca de 32,11%) e cânfora foi identificado exclusivamente no óleo essencial de folhas (2,46%) (MEJRI, *et al.*, 2010).

As plantas possuem alto percentual de água em seus tecidos e células (em torno de 60% a 80%), desta maneira a secagem se faz necessário para evitar degradação dos princípios ativos ou a fermentação (BRASIL, 2006). As etapas de secagem e armazenamento merecem atenção especial, pois seu manejo adequado pode evitar perdas e contribuir para a preservação do produto.

O processo de secagem promove a desaceleração do crescimento de microrganismos e prevenção de certas reações bioquímicas que podem alterar as características organolépticas (DÍAZ-MAROTO, *et al.*, 2003; HAMROUNI-SELLAMI, *et al.*, 2011). A perda de constituintes voláteis em ervas e especiarias depende principalmente do tipo de secagem e das características biológicas das plantas (VENSKUTONIS, 1997).

Após a colheita, o processo secagem facilita o transporte, armazenagem e manuseio das plantas. Este processo destina-se a minimizar a perda de princípios ativos e retardar a sua deterioração, reduzindo atividades enzimáticas (TELES, *et al.*, 2012).

O efeito de secagem sobre o rendimento e composição de óleo essencial em muitas plantas aromáticas tem sido estudado por vários pesquisadores.

DÍAZ-MAROTO, *et al.*, (2003) encontraram concentrações mais elevadas do composto alvo, carvona no óleo essencial de *Mentha spicata* (hortelã) obtido de plantas secas ao ar, à temperatura ambiente do que em plantas secas com condições controladas (secas em estufa a 45°C).

ARABHOSSEINI, *et al.*, (2007), avaliaram o efeito a longo prazo de várias condições de secagem quanto a variação da cor e conteúdo do óleo essencial de *Artemisia dracuncululus* (estragão). As folhas de *Artemisia dracuncululus* L foram secas a temperaturas de 45, 60 e 90°C, com respectivos níveis de umidade relativa 17%, 7% e 2,5%. Na temperatura de 60°C, também foi aplicado um nível de umidade relativa de 18%. Os autores relataram que a mudança durante o tempo de armazenamento da cor das folhas secas e do conteúdo presente nos óleos essenciais depende das condições de secagem e concluíram que a secagem à temperatura de 45 ° C é recomendável para manter a qualidade o mais próximo do material fresco e diminuir a perda de componentes voláteis.

Em outro estudo, com o objetivo de analisar o efeito da composição do óleo de *Lippia alba* (Alecrim) frente a diferentes metodologias de secagem (método tradicional e controlado - temperatura média de $28,2 \pm 2,1$ ° C e umidade relativa a $70 \pm 11\%$). Os autores relataram que independentemente do método de secagem aplicado, carvona foi o componente mais abundante em todas as amostras, seguido por germacreno e limoneno. Porém alguns componentes são sensíveis aos processos de pós-colheita, em função da metodologia de secagem aplicadas, como é o caso do teor de carvona que foi sempre maior nas folhas secas pelo método tradicional (TELES, *et al.*, 2012).

3.1.5. TOXICIDADE

A utilização dos OEs é ampla, mas não se pode esquecer que alguns compostos podem causar efeitos tóxicos, que pode variar de uma simples alergia até grandes convulsões. Deve-se também, atentar para a sensibilidade dos indivíduos aos inúmeros componentes químicos de um óleo essencial e a ingestão concomitante de certos medicamentos, esses fatores podem ocasionar aparecimentos de reações adversas e ou tóxicas.

Os OEs, por serem obtidos através da extração de uma espécie vegetal, são desta forma mais concentrados, apresentam assim toxicidade mais elevada do que a da planta de origem. É importante ressaltar que o grau da toxicidade dos óleos voláteis é dose-dependente, desta forma depende da dose administrada e o grau de sensibilidade de cada indivíduo (SIMÕES, *et al.*, 2004).

A toxicidade também depende da via de administração. A via oral é aquela que apresenta maiores riscos, principalmente se os OEs não forem diluídos. Do ponto de vista químico os óleos que apresentam compostos insaturados são normalmente mais tóxicos (SIMÕES, *et al.*, 2004).

O estudo de toxicidade das plantas medicinais vem ganhando importância, pois, além de esclarecer diferentes aspectos relativos aos casos de intoxicações e de identificar constituintes químicos capazes de exercer ação tóxica, pode ainda fornecer substâncias ativas para o desenvolvimento de fármacos (VIEIRA, *et al.*, 2004).

3.1.5. APLICABILIDADE E COMERCIALIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são usados extensivamente nas áreas da farmácia, medicina, alimentos, bebidas, cosméticos, produtos de perfumaria e aromaterapia.

O crescimento exponencial no uso de terapias naturais no tratamento de várias doenças agudas e crônicas tem ocorrido de forma paralela ao progresso científico e tecnológico da medicina moderna ocidental, despertando assim interesse de usuários, pesquisadores, profissionais e gestores de serviços de saúde (SPADACIO, *et al.*, 2008).

De acordo com a base de dados americana COMTRADE (United Nations Commodity Trade Statistics Database) citado por BIZZO, *et al.*, (2009), os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são os EUA, União Européia, Japão e China. O mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$15 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% por ano. O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos (BIZZO, *et al.*, 2009).

Muitas espécies de plantas e seus óleos essenciais são usados como digestivo tônico, carminativo, antiespasmódico, anti-inflamatórios, expectorantes, antitússicos e para o tratamento de resfriados (NICKAVAR, *et al.*, 2005).

Segundo OLOJEDE, *et al.*, 1993, devido à capacidade antimicrobiana do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (capim limão), este pode ser explorado como um método alternativo na preservação de comida industrializada, pois segundo MISHRA & DUBEY, (1977), este óleo é facilmente encontrado e não-fitotóxico.

Devido ao seu forte aroma, o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) é usado como fragrância em sabão e detergente (FERREIRA & FONTELES, 1989). Também, é empregado como repelente de insetos devido, principalmente, à presença do citral (SIMÕES, *et al.*, 2004). O capim limão é uma planta de largo uso popular na preparação de chás e seu óleo essencial é usado nas indústrias de perfumes, alimentos e medicamentos. (KOSHIMA, *et al.*, 2006)

A adição de óleos essenciais para revestimento comestível pode prolongar a vida de prateleira de alimentos, pois aumentam e prolongam a atividade antimicrobiana, porque os compostos de óleos essenciais são continuamente libertados ao longo do tempo sobre a superfície do produto, durante o período de armazenamento (OUTTARA, *et al.*, 2000).

Óleo de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) é muito eficaz, o seu efeito sobre o sistema nervoso é muito positivo, e também é muito bom para a prevenção da perda de cabelo devido à vasodilatação e circulação melhorada. Por causa das propriedades médicas, o alecrim é usado para tratar as doenças de Parkinson, Alzheimer, além das antidiabéticas, antifúngica, antimicrobiana, anti-inflamatório, anti-plaquetário e antioxidante (JALALI-HERAVI, *et al.*, 2011).

3.1.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os óleos essenciais exercem papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI, *et al.*, 2000). Desta forma, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI & BALLOW, 1992).

Estudos têm mostrado que compostos fenólicos e terpenóides possuem capacidades de inibir o crescimento de diversos microrganismos. Este mesmo potencial foi observado em algumas plantas medicinais, ervas e temperos, quando avaliados seus óleos essenciais (KIM, *et al.*, 1995; KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Segundo LAMBERT *et al.* 2001, na composição dos óleos essenciais existem compostos que apresentam maior atividade antimicrobiana. Porém a mistura de dois ou mais compostos em quantidades adequadas podem apresentar melhor atividade frente a microrganismos mais resistentes. Além disso, o sinergismo entre os constituintes presentes no óleo essencial deve ser considerado (BURT, 2004).

Em geral, as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais, embora haja exceções. Uma explicação possível para esta atividade pode estar atrelado à dificuldade dos óleos essenciais em se difundir a membrana externa, pois existe uma barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas e combinações hidrofóbicas, embora não seja totalmente impermeável. Devido a isso, as bactérias gram-positivas não relativamente mais resistentes a combinações de antibióticos hidrofóbicos e drogas tóxicas. Da mesma forma, observa-se que os fungos são mais susceptíveis aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais do que as bactérias (KALEMBA & KUNICKA, 2003; BAGAMBOULA, *et al.*, 2004)

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra importantes microrganismos patogênicos humanos tem sido examinados em detalhe (FARAG, *et al.*, 1989; ADAM, *et al.*, 1998; HAMMER, *et al.*, 1999).

Nos últimos anos a atividade antifúngica de óleos essenciais tem sido relatada para diversas espécies, envolvendo principalmente as famílias Lamiaceae, Asteraceae, Verbenaceae, Rutaceae, Lauraceae e Cupressaceae (ABAD, *et al.*, 2007).

SANTOS, *et al.*, (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (Jaborandi) frente as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*) e fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus sp.*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*). O óleo essencial apresentou ampla atividade antimicrobiana, destacando-se a atividade antifúngica moderada contra os fungos *Cryptococcus neoformans* *Trichophyton mentagrophytes*, ambos de interesse clínico.

NUNES, *et al.*, (2006) relataram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Sida cordifolia* (malva branca) contra 4 bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*) e 9 fungos (*Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon inkin*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Penicillium*). O óleo essencial de *S. cordifolia* foi capaz de inibir o crescimento de três das quatro estirpes de bactérias testadas. No entanto, foi mais eficaz contra *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Entre as estirpes de fungos testadas, sete foram sensíveis ao óleo de *S. cordifolia*, representando 70% das cepas testadas. Os fungos *C. guilliermondii* e *Trichosporon inkin* foram os mais sensíveis ao óleo enquanto que *C. stellatoidea* apresentou resistência.

3.2.CANDIDA ALBICANS

3.2.1.CLASSIFICAÇÃO

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, terra, animais e alimentos. Suas espécies sofrem, em sua incidência, variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outros (LACAZ, *et al.*, 1991; SIDRIM & MOREIRA, 1999; TRABULS, *et al.*, 2000).

Os fungos são encontrados frequentemente como componentes da microbiota transitória do homem e animais domésticos; como contaminantes de alimentos; deteriorantes de acervos; madeiras; em água doce e salgada; e são responsáveis pela contaminação de diversos materiais (TRABULSI, *et al.*, 2000).

Geralmente, os fungos apresentam forma vegetativa unicelular, conhecido como leveduras. Podem também ser observados na forma multicelular, como é o caso dos filamentosos. Ainda existem os dimórficos, que podem apresentar-se leveduriformes a temperatura de 37 a 39 °C ou filamentosos a temperatura ambiente (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

O reino Fungi inclui diversas leveduras unicelulares, bolores multicelulares e espécies macroscópicas. Para realizar suas funções vitais, os fungos absorvem matéria orgânica dissolvida através de sua membrana plasmática. As células de um fungo multicelular são normalmente unidas para formar finos filamentos chamados de hifas. As hifas são divididas em unidades multinucleadas por meio de paredes transversais que possuem poros, de forma que o citoplasma pode fluir entre essas unidades semelhantes a células. Os fungos se desenvolvem a partir de fragmentos de hifas ou esporos (TORTORA, *et al.*, 2005).

3.2.2. HISTÓRICO

Nos últimos anos, as infecções fúngicas oportunistas têm sido caracterizadas pelo seu aumento em frequência, pela diversidade de fungos isolados e pelo aumento da gravidade das infecções, muitas vezes em razão de novos fatores predisponentes (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Pela primeira vez, em 1839 a levedura patogênica mais importante, a *Candida albicans*, foi observada por Langenbeck na boca de um paciente. Já em 1842, a candidíase oral foi classificada por David Gruby como um micro-organismo do gênero *Sporotrichum*. Berg em 1846 definiu a relação entre a candidíase oral com esse micro-organismo. Em 1853, esse micro-organismo foi nomeado por Charles Robin de *Oidium albicans*, que também mais tarde em 1890 Zopf renomeou de *Monilia albicans*. Berkhout em 1923 enfim nomeou o

micro-organismo de *Candida albicans*. No livro *The Yeast* (1984), estão descritos as mais de 111 denominações para essa levedura (SIDRIM & ROCHA, 2004).

ÁLVARES, *et al.*, (2007), descrevem aproximadamente 200 espécies de leveduras diferentes para o gênero *Candida*, que são capazes de habitar vários nichos corporais, tais como: orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes.

Dentre todas as espécies do gênero *Candida*, a *C. albicans* é a de maior relevância devido a sua prevalência em estados patológicos e em casos de normalidade, pelo fato de ser um organismo comensal, estando presente no ser humano sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro. Desta forma, em um paciente imunocomprometido, esta levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidíases vaginais e infecções orais ou sistêmicas (O'SULLIVAN, 2000).

3.2.3. FATORES DE RISCO DO HOSPEDEIRO

A *Candida albicans* é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas podendo ser letal para imunodeprimidos (GILFILLAN, *et al.*, 1998; O'SULLIVAN, 2000).

A incidência da candidíase aumenta na proporção crescente ao número de imunocomprometidos hospitalizados, pacientes com câncer e transplantados. Outras pessoas, também em risco, são pacientes no pós-operatório, indivíduos com neoplasias hematológicas, idosos, bebês prematuros, doentes sob terapêutica prolongada de amplo espectro de antibióticos e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), (PORTELA, *et al.*, 2004).

A infecção por leveduras também está associada à utilização de dispositivos médicos tais como: implantes, cateteres vasculares, próteses dentárias, lentes de contacto, ligações artificiais, discos intervertebrais, entre outros (PORTELA, *et al.*, 2004).

Desta forma podemos dizer que o gênero *Candida*, nesse caso mais especificamente a espécie de *Candida albicans*, está presente em altas porcentagens nas infecções hospitalares, requerendo assim uma maior cautela aos pacientes imunossuprimidos ou com alguma debilidade funcional ou genética uma vez que os mesmos possuem maior susceptibilidade às infecções como já dito anteriormente (LENGELER, *et al.*, 2000).

Embora eficaz, os antifúngicos tradicionais possuem estratégias que precisam ser orientadas para maximizar os benefícios e minimizar as grandes consequências adversas. Podendo desta maneira dificultar o tratamento (BROWN, 2007).

3.3. THYMUS VULGARIS

O tomilho conhecido cientificamente como *Thymus vulgaris L.* é uma planta medicinal, aromática e condimentar, pertencente a família Lamiaceae, originária da Europa e cultivada no sul e sudeste do Brasil. A família Lamiaceae compreende 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo. Dentre os gêneros cultivados dessa família destacam-se várias espécies usadas como condimentos, tais como: sálvia (*Salvia officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare L.*), manjerona (*Origanum majorana L.*), entre outras (PORTE & GODOY, 2001).

O cultivo do tomilho não demanda muitas exigências, preferindo regiões secas, áridas, expostas ao sol e solos arenosos e calcários; é uma planta de solos pobres, rústica, devendo ser evitada umidade e terras compactadas (CASTRO & CHEMALE, 1995).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e compostos puros das espécies das plantas da Família Lamiaceae foram relatados por diversos pesquisadores, apesar de poucos deles apresentarem estudo em relação à composição química (MEWES, *et al.*, 2008).

T. vulgaris é um subarbusto perene, ereto, ramificado, muito aromático, de 20-30 cm de altura, com ramos levemente cobertos de pelos brancos e de folhas simples, pequena, verde escuras de forma oval e com comprimento entre 6 e 12 mm (figura 05). É utilizada como planta medicinal, especiarias e seu óleo essencial têm atividades antimicrobianas e antioxidantes comprovados (NASCIMENTO, *et al.*, 2000).



Figura 05: Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)

É cultivado a partir do nível do mar até 2000 m acima do nível do mar e tem o período de floração entre Março e Julho. A Espanha é um grande fornecedor de tomilho, exportando cerca de 1,6 milhões de quilos de tomilho, e entre 2 e 3 milhões de kg de óleo essencial de tomilho (BLANCO, *et al.*, 1998).

Assim como a maioria das plantas medicinais, *T. vulgaris* apresenta grande teor de água nos seus tecidos e células. Desta maneira, é necessário a realização de procedimentos de secagem para aumentar a vida útil, prolongando assim o seu uso em diferentes setores de aplicação (DOYMAZ, 2011).

Os óleos essenciais do gênero *Thymus* é amplamente usado como agente anti-séptico em muitas preparações farmacêuticas e como agente aromatizante para muitos tipos de produtos alimentares. Existem vários ecótipos de tomilho que diferem em características morfológicas e na composição de óleos essenciais. Caracterizam-se por um odor forte e penetrante e, por vezes, um sabor muito pronunciado balsâmico e picante (CORTICCHIATO, *et al.*, 1998).

O rendimento das folhas, das flores e das hastes dos extratos de *Thymus vulgaris* L. em diclorometano foi estudado por GUILLÉN e MANZANOS, (1998). O rendimento obtido das folhas, flores e das hastes, são 4,0%, 2,6% e 0,5%, respectivamente. Verificando desta maneira que o rendimento das folhas e flores é muito mais elevado do que aquele obtido das hastes.

SARTORATTO, *et al.* 2004 avaliaram os rendimentos de óleo expressos em relação ao peso de material seco de plantas. Ao total, 8 diferentes espécies de plantas foram analisadas entre elas, *Thymus vulgaris* e apresentou bom rendimento, sendo menor apenas que *O. Gratissimum* L. Esses resultados podem ser visto na tabela 01.

Tabela 01: Rendimento (%) de diferentes óleos essenciais (Sartoratto, et al 2004).

Nome Botânico	Família	Uso Tradicional	Rendimento de óleo
<i>Aloysia triphylla</i> (L'Hér.) Britton	Verbenaceae	Tempero, digestivo, sedativo	0,22
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Antiséptico, Antiespasmódico	0,56
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Antiséptico, vermífugo	0,42
<i>M. spicata</i> L.	Lamiaceae	Antiespasmódico, diurético	0,32
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Digestivo, vermífugo	0,10
<i>O. gratissimum</i>	Lamiaceae	Anti térmico, diurético	0,74
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Analgésico, expectorante	0,13
<i>O. applii</i> L.	Lamiaceae	Analgésico, expectorante	0,20

O óleo essencial de tomilho possui atividades antimicrobianas (bactérias e fungos), carminativa e expectorante, isso se deve a diversidade de componentes químicos, principalmente o carvacrol e o timol, cujas estruturas químicas podem ser vistas na Figura 06. As atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo essencial de tomilho também foram relatadas (DAFERERA, *et al.*, 2000; KALEMBA & KUNICKA, 2003 e BAGAMBOULA, *et al.*, 2004).

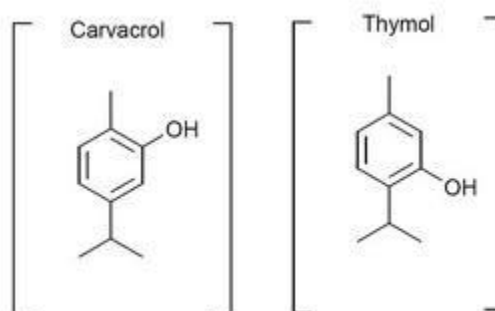


Figura 06: Compostos relacionados com a atividade biológica do óleo essencial *T. vulgaris*.

3.3.1. ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DE *THYMUS VULGARIS*

HAMMER, *et al.*, (1999) relataram a atividade do tomilho contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentando a concentração inibitória mínima de 0.03% (v/v) para os microrganismos citados.

Em um estudo, TEISSEGRE & WATERHOUSE, 2000 relataram que o óleo essencial de tomilho mostrou moderada inibição da oxidação de LDL (20-27%).

DORMAN & DEANS (2000) testaram o óleo essencial de tomilho contra 25 bactérias, (sendo 9 Gram-positiva e 16 Gram-negativas) e relataram através de halo de inibição maior atividade inibitória frente a bactérias Gram-positivas.

Atividades espasmolíticas bem como antioxidantes foram relatadas também para o extrato alcoólico da planta (HUDAIB, *et al.*, 2002).

Segundo NEWALL, *et al.*, (2002) para o óleo essencial de tomilho, não existem relatos de problemas causados durante a gestação ou lactação, desde que usado em doses moderadas. Por outro lado pode afetar o ciclo menstrual, não devendo, portanto, ser ingerido em doses altas.

De acordo com os estudos de LEE, *et al.*, (2005), os principais compostos de aroma encontrados em extratos voláteis de manjeriço e tomilho exibiram diferentes potenciais antioxidante. Os resultados encontrados demonstraram que o manjeriço e tomilho, possuíam atividade antioxidante potente, comparável à do conhecido antioxidantes, butil--hidroxitolueno (BHT) e α -tocoferol.

Já VIUDA-MARTOS, *et al.*, (2008) relataram atividade antibacteriana dos óleos essenciais de tomilho, sálvia, cominho, alecrim, cravo e orégano frente a *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterobacteria gergoviae* e *Enterobacteria amnigenus*.

POZZATTI, *et al.*, (2010) constataram que o óleo essencial extraído de *T. vulgaris* era capaz de inibir crescimento de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*.

MILLEZI, *et al.*, (2012) chegaram a conclusão de que a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *T. vulgaris* contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella. enteritidis* era de 5 e 10%, respectivamente.

3.3.2 ESTUDOS DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *THYMUS VULGARIS*

É sabido, que as atividades biológicas que as plantas aromáticas apresentam podem variar dependendo dos constituintes presentes no óleo essencial e de seus componentes majoritários. Cabe ressaltar que a composição da planta varia de acordo com parte da planta utilizada, métodos extrativos, fatores ambientais e outros. Desta maneira, se faz necessário o estudo da composição química para avaliar os compostos presentes no óleo essencial.

Estudos realizados por GRANGER & PASSET, (1973) revelaram as seguintes concentrações mínimas e máximas dos principais componentes em *T. vulgaris* francês em diferentes condições ambientais: linalol (3-67%), acetato de terpenilo (2-62%), o timol (0,2-65%) e carvacrol (0,2-72%) extraídos por hidrodestilação.

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* obtido por extração com fluído supercrítico, revelou a presença de p-cimeno e timol como componentes principais, além de outros terpenóides como, por exemplo, éter metil carvacrol como menos de 1% (BLUM, *et al.*, 1997).

GUILLÉN & MANZANOS, (1998) avaliaram a composição dos extratos obtidos das folhas, flores e caules utilizando extração com diclorometano. Os autores constataram que o extrato da folha é a mais rica em derivados terpênicos oxigenados, um total de 50 foi detectado, em contraste com 38 e 43 em flores e caules, respectivamente. Os principais componentes encontrados nas folhas foram: 1,8 cineol, linalol, β - pineno, canfeno, α -pineno. Nas flores, os principais foram: linalol, elemol, nonacosano, e trans-cariofileno. Enquanto que nas hastes os componentes majoritários foram: hexacosanal, nonacosano, β -sitoesterol, sendo que nos três tipos de amostras foram encontrados apenas traços o timol e o carvacrol.

Óleo essencial de tomilho obtido por um aparato de destilação de vapor de micro-extração para solventes orgânicos mais leves do que a água, a partir de folhas secas foi caracterizado pela presença de γ -terpineno (4,3%), p-cimeno (23,5%), carvacrol (2,2%), e timol (63,6%), que representava 93,6% do total do óleo (DAFERERA, *et al.*, 2000).

De acordo com a análise de HUDAIB, *et al.*, (2002) sobre a composição do óleo de *Thymus vulgaris* obtido por hidrodestilação de amostras, áreas de plantas jovens(2 anos de cultivo) e antigas (5 anos de cultivos) foram coletadas em períodos diferentes(junho/julho e novembro/dezembro). Tais análises relataram que o óleo essencial obtido de plantas jovens é mais rico em fenóis no período de colheita de junho/julho do que no período de novembro/dezembro, enquanto que os resultados foram contrários para monoterpenos. Estes tiveram maior presença na colheita de novembro/dezembro. Ambas as classes de componentes (monoterpeno e fenóis) variaram da mesma maneira quando analisadas as

amostras de plantas antigas. Para os outros componentes (álcoois, cetonas e óxidos e sesquiterpeno) um teor mais elevado foi geralmente observado na coleta de novembro/dezembro em amostras de plantas jovens. O estudo, portanto, enfatizou a importância de escolher a coleta adequada (colheita), a fim de alcançar a melhor qualidade e quantidade de óleo essencial, cuja atividade está relacionada com o teor de componentes fenólicos. Porém, em todas as amostras analisadas os componentes majoritários foram: timol, carvacrol, p-cimeno e γ -terpineno.

Os compostos mais importantes presentes no óleo essencial de *Thymus vulgaris* obtidos por destilação a vapor sob pressão reduzida a partir das folhas secas são o timol e carvacrol, que constituem quase três quartos dos voláteis totais quantificados, seguido por monoterpenos, linalol, α -terpineol e borneol, conforme os estudos de Lee, *et al.*, (2005).

Componentes voláteis de óleo essencial de tomilho microencapsulado liberados através da técnica de SPME foram analisados por BARANAUSKEINÉ, *et al.*, (2005). Três diferentes fibras foram utilizadas no estudo: polidimetilsiloxano (PDMS), poliácrlato (PA) e carbowax/divinilbenze (CW-DVB). Para todas as fibras utilizadas os principais componentes foram: P-cimeno, timol, carvacrol, eucaliptol, linalol, borneol, e β -cariofileno.

Para o óleo essencial *T. vulgaris* espanhol, obtido por hidrodestilação tendo como matriz partes áreas secas da planta apresentou como principal componente eucaliptol. No entanto, outros componentes também associados ao aroma fresco deste óleo essencial como o acetato de terpinilo, linalol, borneol, β -pineno, α -terpineol e cânfora, foram encontrados em percentuais significativos. (JORDÁN, *et al.*, 2006)

OZCAN & CHALCHAT, (2004), na Turquia, extraíram por hidrodestilação o óleo essencial de partes aéreas de *Thymus vulgaris* e identificaram 30 compostos. Os componentes majoritários encontrados foram: timol (46,2%), γ -terpineno (14,1%), p-cimeno (9,9%), linalol (4,0%), mirceno (3,5%), α -pineno (3,0%) e α -tujona (2,8%).

Estudos da composição química das folhas de *Thymus vulgaris* através da técnica de micro extração em fase sólida foram realizados por DAWIDOWICZ, *et al.*, (2008). No total 18 compostos foram extraídos por SPME, sendo os majoritários P-cimeno (14,7%), γ -terpineno (10,5%), Timol (48,5%), carvacrol (1,7%) e cariofileno(6,2%).

EL- NEKEETY, *et al.*, (2011) identificaram 13 compostos a partir do óleo essencial de tomilho(folhas e flores) obtido por hidrodestilação. Carvacrol era o componente principal (45 mg /g), seguido de timol (24,7 mg/g), β -felandreno (9,7 mg/g), linalol (4,1 mg /g), Humuline (3,1 mg /g), α -felandreno (2,3 mg/g) e mirceno (2,1 mg /g).

GARCÍA-RISCO, *et al.*, (2011) avaliaram a composição química do óleo de *Thymus vulgaris* obtido por extração com fluido supercrítico em diferentes condições. Ao total, foram identificados 17 compostos, sendo os majoritários: timol, carvacrol, canfôra, borneol, eucaliptol e p-cimeno. Com concentrações variando de 57,46 - 82,04; 3,44 - 4,85; 0,00 - 9,55; 1,86 - 3,42; 0,53 - 7,23 e 0,67 - 2,37 respectivamente.

3.5. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Para realizar o processo de identificação dos compostos presentes nas plantas aromáticas é necessário realizar o procedimento de extração. A extração tem por finalidade extrair compostos e princípios ativos, realizando assim caracterização dos constituintes presentes nas plantas. No entanto, para se chegar próximo ao perfil da amostra, é preciso determinar a melhor técnica de extração dos seus compostos.

A composição dos óleos essenciais pode ser influenciada em função do método de extração empregado, uma vez que suas características bioativas podem ser alteradas. As características físico-químicas também podem sofrer influência pelas condições operacionais empregadas na extração, bem como pelos seus efeitos terapêuticos (ROBBERS, *et al.*, 1997).

Segundo LOCK DE UGAZ, (1994), o estudo fotoquímico geralmente divide-se em quatro etapas: a coleta e classificação botânica da espécie a ser estudada; a extração, separação e purificação dos constituintes químicos; a determinação estrutural e os ensaios biológicos (aplicações).

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta. Os métodos mais comuns são: arraste direto por vapor d'água; hidrodestilação; extração com solventes orgânicos; extração com fluidos supercríticos (SIMÕES, *et al.*, 2004).

3.4.1. HIDRODESTILAÇÃO (HD)

A hidrodestilação envolve duas substâncias imiscíveis: a água e a mistura de compostos voláteis a ser destilada. É o tipo de destilação utilizada para isolar substâncias que se decompõem nas proximidades de seus pontos de ebulição e que são insolúveis em água ou nos seus vapores de arraste. (WATANABE, *et al.*, 2006).

Este método é muito utilizado para o isolamento de materiais voláteis. Os isolados obtidos são chamados óleos essenciais e de acordo com a definição internacional são produtos de destilação (MASTELIC, *et al.*, 2008).

A hidrodestilação é a técnica extrativa mais difundida industrialmente para obtenção de óleos voláteis. Todavia, apresenta a desvantagem de proporcionar a formação de artefatos químicos. Isto se dá em função das altas temperaturas a que o material vegetal é submetido (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Estudos de HUI & JONH, (2007) relataram que a hidrodestilação além do aquecimento, tem a inconveniência do contato direto do material com a água em ebulição, o que pode causar hidrólise de algumas substâncias.

Com isso, ficou demonstrado que a qualidade e a quantidade de frações voláteis são afetadas pela variação do tempo de hidrodestilação. O tempo deve ser estabelecido para cada matéria prima vegetal, dependendo das particularidades apresentadas por cada uma delas (CHARLES & SIMON, 1990).

Segundo SIMÕES, *et al.*, (2004) a hidrodestilação segue as seguintes etapas:

- 1-O material vegetal permanece em contato com a água em ebulição;
- 2-O calor faz com que as paredes celulares se abram e o óleo que está nas células evapora junto com a água;
- 3-A mistura vai para o condensador, onde é resfriado e separado por diferença de densidade.

A literatura apresenta o aparelho Clevenger e suas variações, é considerado um dos equipamentos mais utilizados para as extrações em escala laboratorial. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro (SIMÕES, *et al.*, 2004).

3.4.2. EXTRAÇÃO COM SOLVENTE (SE)

A extração por solvente é uma operação unitária simples e foi aplicada pela primeira vez em 1835 por Robiquet para extração de compostos de flores (HUI & JOHN, 2007).

É um método amplamente utilizado para separação de substâncias que, apresentam uma diferença de solubilidade. A extração do produto desejado se dá pela adição de um solvente capaz de solubilizar a substância e ao mesmo tempo não ser solúvel em água. Desta forma os componentes presentes na matriz são extraídos dissolvendo-os em um solvente líquido, processo este conhecido como extração sólido-líquido (SIMÕES, *et al.*, 2004).

A eficiência do processo depende de fatores como: o tamanho das partículas (quanto menor, mais fácil será a penetração do solvente), a umidade da amostra (pois a água presente

dificulta a penetração do solvente) e a velocidade com que o ciclo acontece (pois se a mesma for muito alta, pode existir pouca penetração do solvente). A extração por solvente foi desenvolvida por permitir maior extração a menores temperaturas (SIMÕES, *et al.*, 2004).

Segundo TEMELLI, *et al.*, (2007) na extração com solvente o extrato se encontra contaminado, pois os solventes extraem compostos indesejados de difícil controle que diminuem o valor comercial dos óleos (graxas, resinas e pigmentos). Além disso, é necessária a utilização de um evaporador para remover o solvente e obter um extrato concentrado.

Os solventes mais utilizados são o éter de petróleo, acetato de etila, diclorometano, acetona, etanol e hexano e suas várias combinações. Os rendimentos com solvente são muito mais elevados, porém o arraste de componentes normalmente não é seletivo (GROSSMAN, 2005). O solvente escolhido influencia na composição do extrato (parâmetros diferentes de solubilidade), na qualidade sensorial e no rendimento de extração (KUBOTA, 2007).

Na maioria dos casos, o processo de extração não é seletivo e, basicamente, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução (TEMELLI, *et al.*, 2007).

O hexano é o solvente orgânico favorito no processo de extração, por ser o mais seletivo aos compostos polares, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água. Porém, sua inflamabilidade, potencial poluidor e custo justificam o estudo de alternativas ao seu uso (MORETTO & FETT, 1998).

O etanol pode representar uma boa alternativa ao processo de extração. A comparação das propriedades químicas permite verificar que o etanol oferece menores riscos operacionais do que o hexano, pois apresenta maiores temperaturas de inflamação e toxicidade mais baixa (MERCK, 2006).

3.4.3. EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Uma das metodologias que tem crescido nas últimas décadas, como alternativa para as tradicionais técnicas de extração de produtos naturais é a extração com fluídos supercrítico (SFE). A extração com fluido supercrítico (SFE) é uma técnica interessante para a extração de compostos aromatizantes de matérias vegetais, podendo constituir uma alternativa industrial para os processos de extração com solvente e destilação (LANÇAS, 2002).

Um fluido supercrítico, é aquele que está a uma temperatura acima da temperatura crítica (T_c) e a uma pressão acima da pressão crítica (P_c) (Figura 07), apresentando desta maneira propriedades físico-químicas intermediárias entre o estado líquido e o estado gasoso (COELHO, *et al.*, 1994).

A temperatura crítica é a temperatura mais alta, na qual um gás pode ser convertido em um líquido pelo aumento da pressão. Seguindo este raciocínio, a pressão crítica é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido por um gás pelo aumento da temperatura (TENA, *et al.*, 1997).

Na prática, o estado supercrítico é obtido através de um aumento simultâneo da temperatura e da pressão de uma substância (ou mistura de substâncias) de forma a modificar o estado de agregação entre suas moléculas. Esta alteração produz uma modificação na densidade da substância (ou mistura) e, como consequência, de seu poder de solvatação, modificando o comportamento químico da mesma (LANÇAS, 2002).

Os fluídos em condição supercrítica, segundo ROSA, *et al.*, (2009) ganharam atenção por possuírem baixa tensão superficial e facilidade de penetração em materiais microporosos e sólidos (aumentando o rendimento das extrações).

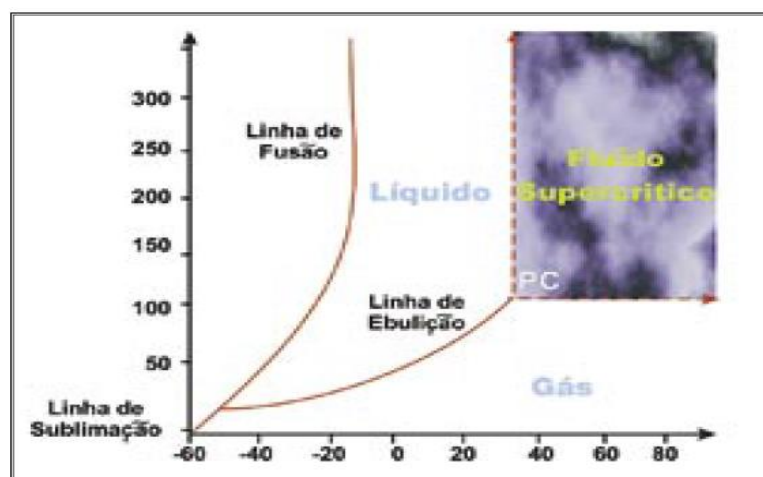


Figura 07: Diagrama de fases de uma substância pura evidenciando o estado supercrítico.

Pequenas variações de pressão e/ou temperatura na região supercrítica geram grandes variações da densidade do solvente supercrítico. Essas variações influenciam no poder de solvatação do fluido e conseqüentemente no seu grau de seletividade. Outra característica importante é a viscosidade relativamente baixa (próximas a dos gases) atrelado com a difusividade relativamente alta que permite altas taxas de extração, pois apresentam propriedades de transporte de massa aumentada (LOU, *et al.*, 1993).

As extrações com fluidos supercríticos são rápidas, por apresentarem boa transferência de massa em função da alta densidade e alta difusividade do fluido supercrítico. Outra característica importante é o poder de solvatação que pode ser controlado em função da pressão e temperatura, o que pode conduzir a extrações mais seletivas (CHESTER & PINKINSON, 1998).

Segundo POURMORTAZAVI, (2007) a eficiência do processo de SFE está diretamente relacionada com a capacidade do fluido se difundir na matriz e solubilizar o soluto. Desta maneira, a extração pode ser considerada em quatro etapas:

- 1- Dessorção dos compostos da matriz;
- 2- Difusão do fluido dentro da matriz;
- 3- Solubilização do soluto pelo fluido supercrítico;
- 4- Recuperação do soluto pela despressurização do extrator;

A seleção das condições de operação depende da especificidade dos componentes da matriz sólida a serem extraídos. Diversos fatores tais como tamanho da partícula, área superficial, porosidade e umidade da amostra podem afetar os resultados na extração (POURMORTAZAVI, 2007).

Em um estudo a respeito das características das propriedades físico químicas do fluido supercrítico, MARENTIS (1988) relatou que o gás acima de sua T_c quando comprimido, tem suas propriedades alteradas, quando passa a se comportar com características de gás e líquido (tabela 02).

As propriedades dos fluidos supercríticos são modificadas com a variação de temperatura e pressão. Essas variações facilitam a capacidade extrativa dos fluidos. Por isso, a extração com fluido supercrítico vem ganhando espaço na obtenção de produtos farmacêuticos, alimentícios, petroquímicos e de química fina (SCHNEIDER, 1983).

Tabela 02: Propriedades físico-químicas dos líquidos, fluídos supercríticos e gases.

Estado Físico	Densidade (g cm ⁻³)	Viscosidade (g cm ⁻¹ .s ⁻¹)	Difusividade (cm ² s ⁻¹)
Líquido P= 1atm T=15 – 30° C	0,6 - 1,6	(0,2 - 3,0) x 10 ⁻²	(0,2 - 2,0) x 10 ⁻⁵
Supercrítico P=Pc; T=Tc	0,2 – 0,5	(1,0 – 3,0) x 10 ⁻⁴	0,7 x 10 ⁻³
Gás P= 1atm T=15 – 30° C	(0,6 – 2,0) x 10 ⁻³	(1,0 – 3,0) x 10 ⁻³	0,1 – 0,4

A sua aplicação é cada vez maior, recentemente o LPS/DEQ/UFRRJ desenvolveu uma nova técnica usando o fluído supercrítico para permitir a maior disponibilidade de material celulósico do bagaço de cana e conseqüentemente maior possibilidade da reação de sacarificação (SANTOS, *et al.*, 2011)

É crescente mundialmente o interesse pelo uso da SFE e no Brasil não é diferente, principalmente nas universidades e centros de pesquisas. Por ser um processo em alta pressão, SOARES & COELHO, 2012 fizeram um estudo chamando a atenção para a segurança necessária quando se trabalha com fluído supercrítico.

Muitos solventes podem ser utilizados em extração com fluído supercrítico. Os solventes mais utilizados podem ser vistos na tabela 03 juntamente com seus parâmetros críticos Pc, Tc e pc (densidade crítica).

O solvente mais utilizado é o CO₂, devido a sua não toxidez, não flamabilidade, baixa temperatura crítica (31,1° C) e pressão crítica (72,85 atm), o que traz vantagens tanto na energia requerida, como na conservação de substâncias termolábeis, baixo custo, disponível em alta pureza, altamente seletivo, facilmente removido do produto extraído, pelo baixo ponto de ebulição e não causa danos ambientais (YAMAGUCHI, 1986)

Tabela 03: Condições críticas de algumas substâncias supercríticas mais utilizadas na SFE

Solvente	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (atm)	Densidade crítica (g cm ⁻³)
Dióxido de Carbono	31,1	72,85	0,469
Óxido Nitroso	36,5	71,5	0,452
Amônia	133	111,54	0,236
Água	374	217,17	0,323
Etano	32	48,17	0,203
Propano	97	41,85	0,217
Etileno	9	49,65	0,218
Benzeno	289	48,27	0,302
Tolueno	319	40,57	0,292

Metanol	240	79,86	0,272
Etanol	241	60,61	0,276
Acetona	235	46,39	0,279
Éter etílico	194	35,93	0,265
Piridina	347	55,57	0,312

O CO₂ quando utilizado na extração de óleos demonstra boa capacidade de solubilização pela baixa polaridade, não alterando as propriedades nutricionais e o óleo produzido é livre de contaminação por solventes (BRUNETTI, 1989).

Outros gases além do CO₂ podem ser usados como solventes na extração supercrítica, porém, por apresentarem custos mais elevados, toxicidade, inflamabilidade, entre outras razões são pouco utilizados (MAUL, *et al.*, 1998; ILLÉS, *et al.*, 1997).

Muitas substâncias, que são termicamente instáveis, contidas nos óleos essenciais, podem ser extraídas pelo CO₂ supercrítico. Contudo, substâncias indesejáveis de alto peso molecular, como compostos não voláteis (ácidos graxos, ceras, pigmentos, resinoide, etc.) são co-extraídos. Para minimizar a ocorrência de tal fato, deve-se estabelecer as condições de operação mais apropriadas.

3.4.4. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextração em Fase Sólida foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn como uma alternativa às técnicas convencionais de extração. É uma técnica de extração/identificação por dessorção que elimina a necessidade de solvente. A SPME foi criada com objetivo de simplificar a etapa de preparação de amostras, diminuindo o tempo envolvido nas análises (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração de analitos. Seu dispositivo básico consiste em um fino bastão de sílica fundida de 10 mm de comprimento e 110 µm de diâmetro que pode ser revestido por diferentes matérias adsorventes/absorventes de variadas espessuras (7-100µm). O método consiste na captura dos analitos através de uma fibra para posterior dessorção térmica no injetor de um cromatográfico (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

Uma vez introduzida no septo do recipiente contendo a amostra, a fibra de sílica é exposta ao meio onde ocorrerá a extração dos analitos (MATISOVÁ, *et al.*, 2002).

O aparato utilizado na SPME pode ser visto na figura 08:

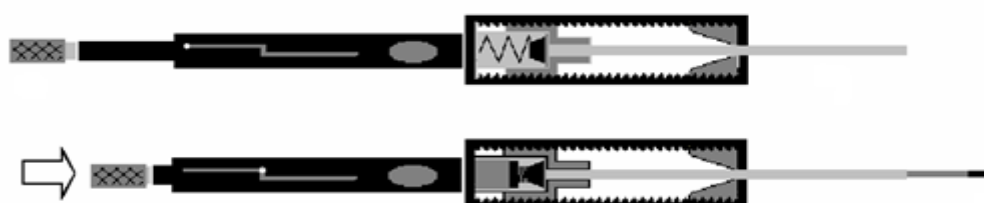


Figura 08: Representação de um *holder* (aplicador) para SPME, com a fibra retraída (acima) e exposta (desenho inferior) (BIAJOLI, 2008).

Dois modos de extração em SPME podem ser usados: microextração em fase sólida modo direto e microextração em fase sólida modo “headspace”. No modo direto a fase

extrativa é posicionada diretamente na fase líquida ou, no caso de amostras gasosas, em contato com o gás. Já no modo headspace a fibra extrativa entra em contato com o vapor em equilíbrio da amostra líquida ou sólida (LORD & PAWLISZYN, 2000).

Após certo período de tempo, necessário para que se estabeleça o equilíbrio entre as fases envolvidas, a fibra é reposicionada no interior da agulha. Em seguida, a seringa é levada a um cromatógrafo, onde a fibra é introduzida no seu injetor, ficando exposta a ação do calor - os analitos são desorvidos e o processo de separação/quantificação então tem início. Os tempos necessários para alcançar o equilíbrio (t_e) no modo headspace são menores do que aqueles em modo direto em condições semelhantes de análise. Como os analitos voláteis e semi-voláteis se concentram mais no headspace, o transporte de massa será mais rápido, possibilitando extrações em tempos menores (LORD & PAWLISZYN, 2000).

Se o ensaio não for realizado logo após a coleta, alguns cuidados devem ser tomados, como proteção física da fibra e preservação adequada da amostra coletada. É importante que a fibra tenha proteção antes, durante e após a amostragem, evitando que seja danificada, devido a sua estrutura frágil. A preservação da amostra coletada na fibra é fundamental, pois o tempo e a temperatura de armazenamento podem ser cruciais para a qualidade dos resultados (CHAI, *et al.*, 1995)

A sequência de procedimento para realizar a extração e a desorção no injetor do cromatógrafo é ilustrada na figura 09. O aplicador possui um êmbolo contendo uma agulha de aço que é responsável pela proteção da fibra extratora e por perfurar o septo de silicone do frasco (contendo a amostra) e do injetor do cromatógrafo. Ao pressionar o êmbolo, a fibra é exposta e, quando é puxado retrai a mesma para dentro da agulha.

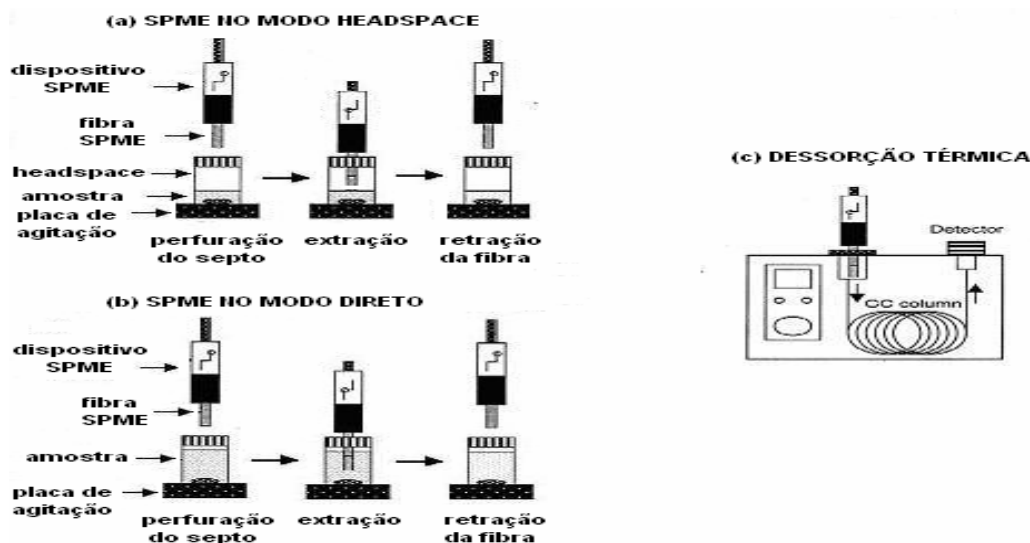


Figura 09: Etapas da micro extração em fase sólida. (a) extração no modo headspace (b) extração no modo direto (c) desorção dos analitos no cromatógrafo (DÓREA, *et al.*, 2008).

A escolha do tipo de revestimento é baseada no peso molecular do analito e em sua polaridade. Baixos pesos moleculares ou analitos muito voláteis são requeridos para uma fibra apolar, como polidimetilsiloxano (PDMS), enquanto que para moléculas muito polares a mais adequada seria uma fibra de poliácilato (PA), altamente polar (BICCHI, *et al.*, 2000).

Os principais tipos de fibra disponíveis no mercado e seus respectivos volumes, espessura de fase e outras informações estão descritos na tabela 04.

Tabela 04: Algumas características das fibras de SPME disponíveis comercialmente para amostragem (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Tipo	Composição Química	Espessura μm	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Aplicação sugerida
Não-polares	Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	200-270	Basicamente para compostos apolares. E possível usar com polares.
		30		
		7	220-320	
Polares	Poliacrilato (PA) Carbowax/divinilbenzeno (CW-DVB)	85	220-310	Medianamente a altamente polares, como fenóis, pesticidas orgafosforados. Cetonas, alcoois. Voláteis de média a alta polaridade
		65	200-260	
Bi-polares	PDMS-DVB Carboxen-PDMS	65	200-270	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade. Voláteis.
		75	—	

A seleção bem sucedida da fibra que será utilizada num trabalho de amostragem depende de vários fatores, de um modo geral a eficiência da absorção/adsorção e da dessorção depende de: peso molecular e tamanho do analito; ponto de ebulição e pressão de vapor do analito; polaridade do analito e da fibra; grupos funcionais do analito e da fibra e faixa de concentração e tipo de detector usado (PEREIRA & CARDEAL 2005).

As etapas básicas da micro extração em fase sólida pode ser simplificada de acordo com a figura 10:

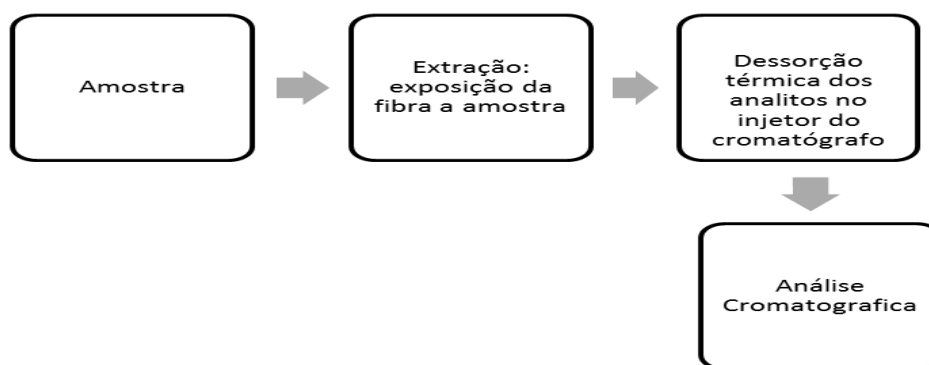


Figura 10: Etapas básicas para extração com SPME.

Numa extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

A SPME no modo direto envolve o equilíbrio do analito em duas fases distintas, e no modo *headspace*, entre três fases (trifásico) – a amostra, a fase de vapor sobre a amostra (*headspace*) e a fase extrativa (líquido polimérico ou sólido adsorvente) (LORD & PAWLISZYN, 2000).

Os fundamentos da distribuição de massas na extração podem ser descritos a partir do que ocorreria num sistema ideal trifásico: antes da extração, n_0 moles do analito estariam presentes, com uma concentração C_0 , em um volume V_m da matriz; quando completada a extração, os n_0 moles se distribuiriam entre as fases em equilíbrio, isto é, n_m^e na matriz aquosa, n_h^e no headspace e n_f^e na fibra (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

A conservação de massa no processo é expressa como:

$$n_0 = n_m^e + n_h^e + n_f^e \quad (1)$$

Abaixo, a Equação 2 correlaciona as constantes de distribuição fibra-matriz, $K_{fm} = C_f^e/C_m^e$, fibra-headspace, $K_{fh} = C_f^e/C_h^e$ e headspace-matriz, $K_{hm} = C_h^e/C_m^e$; esta equação é obtida da Equação 1 com as substituições dos volumes e concentrações das fases em equilíbrio, respectivamente, para a matriz, o headspace e a fibra, V_m^e e C_m^e , V_h^e e C_h^e , V_f^e e C_f^e :

$$K_{fm} = K_{fh} K_{hm} \quad (2)$$

Após substituição das constantes de distribuição e da Equação 2 na Equação 1 e rearranjos algébricos, obtém-se a Equação 3, que fornece a quantidade de analito extraído no sistema em equilíbrio.

$$n_f^e = \frac{K_{fm} V_f C_0 V_m}{K_{fm} V_f + K_{hm} V_h + V_m} \quad (3)$$

Assim, a Equação 3 correlaciona a quantidade extraída do analito com os parâmetros fundamentais dos equilíbrios simultâneos e descreve o aspecto termodinâmico da SPME. Contudo, a Equação 3 não se relaciona com o intervalo de tempo necessário para atingir o equilíbrio. Este intervalo de tempo, que é fundamental do ponto de vista experimental, depende das dificuldades de transferência de massa no sistema (DÓREA, *et al.*, 2008).

A quantidade de analito absorvido ou adsorvido pela fibra está linearmente relacionada com a concentração inicial do analito na amostra, permitindo assim a análise quantitativa (QUEIROZ, 2009).

FONSECA E COELHO, 2007 aplicaram a técnica de SPME como método alternativo para o cálculo do coeficiente de atividade na diluição infinita, representando uma economia de tempo, pois ao contrário da cromatografia, a confecção de fases estacionárias para SPME é muito rápida e prática.

FURTADO E COELHO, 2012 propuseram duas abordagens diferentes para a ampliação da técnica de SPME na determinação dos coeficientes de atividade em diluição infinita de solutos em solventes orgânicos.

3.4.5 ALGUMAS APLICAÇÕES COMPARATIVAS DAS TÉCNICAS

Diferentes métodos de extração de óleo (extração por solvente, arraste à vapor e hidrodestilação) foram avaliados por CHARLES & SIMON, (1990). Foram utilizadas folhas de duas espécies medicinais da família Lamiaceae, *Ocimum kilimandscharicum* e *Ocimum micranthum* (variações no manjericão) para a extração do óleo essencial. Os autores verificaram que o teor de óleo essencial obtido por arraste à vapor foi maior em comparação com os outros métodos.

KHAJEH, *et al.*, (2003) comparou duas técnicas de extração: com fluido supercrítico e hidrodestilação para obtenção de óleo essencial de *Carum copticum*. Os resultados demonstraram que SFE requer tempos mais curtos de extração e menor consumo de energia. Em relação à alteração dos parâmetros da extração (pressão, temperatura, modificador, volume e tempo de extração), é mais factível na SFE. As composições dos óleos obtidos por SFE e hidrodestilação não são qualitativamente diferentes, porém diferem quantitativamente. Conclui-se que o método de SFE oferece muitas vantagens importantes em relação a hidrodestilação.

SHEN, *et al.*, (2005) comparou quatro técnicas de amostragem (hidrodestilação, extração com solvente, extração com fluido supercrítico e microextração em fase sólida) para analisar constituintes voláteis de *Fructus Amomi*. Verificou-se que a hidrodestilação e extração com solvente necessitam de uma maior quantidade de amostra e maior tempo para realização das análises quando comparadas com SPME e SFE. Além disso, a hidrodestilação e extração com solvente pode levar a degradação térmica e a contaminação pelo solvente, enquanto que SPME e SFE podem evitar esses efeitos. Desta maneira concluiu-se que SFE e SPME são melhores do que as técnicas convencionais (hidrodestilação e extração com solvente); E por fim, comparando-se as técnicas de SFE e SPME foi verificado que a SFE necessita de instrumentos especiais e um investimento inicial significativo, enquanto que a análise com SPME foi relativamente simples, rápida, barata e sem uso de solventes. Sendo considerada uma técnica mais eficiente para análise.

Analisando a composição óleo essencial de cravo obtidos por SFE, hidrodestilação, destilação a vapor e extração com solvente, WENQIAN, *et al.*, (2007) relataram que as composições dos óleos obtidos pelos quatro métodos analisados foram qualitativamente semelhantes, porém quantitativamente diferentes. Em relação ao rendimento da extração, a SFE foi cerca de duas vezes mais alta do que obtido por meio da destilação a vapor e hidrodestilação. Já o rendimento da extração com solvente apresentou um bom rendimento, porém a presença de impurezas e resíduos orgânicos prejudica a qualidade do extrato. Desta forma, pode-se dizer que a SFE oferece muitas vantagens importantes em relação aos outros três métodos tradicionais, incluindo o maior rendimento de extração e a porcentagem mais elevada de componentes ativos. Por isso, SFE é considerado como o processo ideal para a obtenção de óleo de cravo com alta qualidade.

Em um estudo realizado por RICHTER & SCHELLENBERG, (2007) foi efetuada a comparação entre diferentes métodos extrativos (hidrodestilação, extração com solvente, extração com fluido supercrítico, microextração em fase sólida e extração acelerada por solvente) para análise de óleos essenciais e componentes relacionados a manjerona, cominho, sálvia e tomilho. Os autores concluíram que SFE parecia ser o mais adequado quando comparados a hidrodestilação, extração com solvente e extração acelerada por solvente para todas as plantas aromáticas analisadas. Por outro lado, o teor de compostos termo-lábeis era muito elevado nos extratos de fluido supercrítico. Além disso, para realização da técnica era necessário um elevado grau de trabalho manual. Em contra partida a SPME se mostrou ser um procedimento de extração mais vantajoso para a extração de compostos aromáticos, pois era mais estável e precisava de um menor tempo de realização. Porém, como ocorre com a hidrodestilação, as substâncias não voláteis não são detectado com SPME.

GOLMAKANI & REZAEI, (2008) compararam a hidrodestilação convencional (HC), com o método de hidrodestilação assistida por microondas (HAM) na extração de óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho). Um rendimento de extração semelhante foi alcançado para os dois métodos, no entanto, tempo de extração foi significativamente menor quando se utiliza HAM. Resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os óleos essenciais obtidos por HAM e os obtidos por HC. Por fim, propôs o método de HAM

como uma boa alternativa para a HC, sem causar efeitos adversos sobre a composição dos princípios ativos presente no óleo essencial extraído.

DAWIDOWICZ, *et al.*, (2008) pesquisaram o método mais eficiente e de baixo consumo de tempo para a extração dos componentes de *Thymus vulgaris* (tomilho). Cinco técnicas foram utilizadas: destilação a vapor, extração com fluido supercrítico, micro extração em fase sólida, extração com solvente e extração líquido pressurizado. Considerando todos os resultados apresentados, a extração com líquido pressurizado parece ser a mais eficiente e mais adequada para determinar os compostos de tomilho. Embora o co-extração de componentes não voláteis seja a principal inconveniente deste método, caracteriza-se por ter o rendimento mais elevado de componentes de óleo essencial e o menor tempo de extração. Em contrapartida, a SPME tem sido recomendado para estimação de componentes de óleos essenciais em plantas aromáticas, devido à seu curto tempo de extração e a não necessidade de utilização de solvente no processo. Deve salientar-se, contudo, que a composição química estimada por meio da SPME é muito diferente do obtido por destilação vapor.

BENYELLES, *et al.*, (2011) compararam óleo essencial obtido da raiz de *Rhaponticum acaule* através dos métodos de SPME e hidrodestilação. Os autores relataram que a técnica de SPME é um procedimento mais simples e mais rápido para a extração da fração volátil em comparação com hidrodestilação, que é demorado e necessita de uma grande quantidade de amostra. Além disso, durante a hidrodestilação, os compostos mais voláteis e os compostos solúveis em água são perdidos, enquanto que na extração com SPME, é a afinidade de cada composto com a fibra que controla a amostragem dos voláteis. Desta forma mais componentes são extraídos por SPME.

Com o objetivo de encontrar e comparar os perfis químicos do óleo essencial de *Lavandula viridis* obtido por HD e por SFE em condições diferentes, COSTA, *et al.*, (2012) elaboraram um estudo no qual ficou demonstrado que a SFE atinge o rendimento máximo de compostos bioativos a partir de *L. viridis*, mas que o aumento da pressão de extração não produz benefícios adicionais. A análise química do óleo essencial de *L. viridis* obtido dos extratos SFE destacou a abundância de monoterpenos oxigenados. Mais compostos foram identificados do óleo essencial de *L. viridis* pelo HD do que por SFE.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. PLANTAS

O *Thymus vulgaris* (tomilho) foi obtido de um mini sítio, localizado na Av. Brasil, Rio de Janeiro no mês de março de 2012. O material vegetal foi separado (folhas e galhos) para retirada de impurezas e posteriormente seco na estufa por 24hs a uma temperatura de 45°C. Depois de seco o material foi armazenado em sacos fechado para evitar contaminação e umidade. Conforme pode ser observado na figura 11.



Figura 11: Etapas da preparação e armazenamento do material vegetal (tomilho).

4.1.2. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- 1- Etanol 99,8% VETEC Química;
- 2- Álcool Isopropílico 99,5% VETEC Química;
- 3- Diclorometano 99,5% VETEC Química;
- 4- Gás de arraste: hélio (99,9% Air liquide);
- 5- Gás utilizado para SFE: CO₂ (99,9% Linde);
- 6- O óleo essencial (padrão) de tomilho para análise comparativa (Sigma-Aldrich);
- 7- Fibras utilizadas no SPME: PDMS (polidimetilsiloxino), PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) PDMS/CAR (carboxen/polidimetilsiloxano) e PA (poliacrilato);
- 8- Padrões de hidrocarbonetos (C7 - C30), timol e carvacrol (Sigma-Aldrich);
- 9- Unidade de extração supercrítica;
- 10- Liofilizador Edwards modelo L5KR;
- 11- Microscópio Eletrônico de Varredura FEI modelo Quanta 200;
- 12- Cromatografo a gás associado ao espectrômetro de massas (CG-2010 SHIMADZU) equipado com uma coluna Rtx – 5MS.

4.2. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

4.2.1. HIDRODESTILAÇÃO

A hidrodestilação convencional foi realizada em aparelho tipo *Clevenger* conectado com um balão de fundo chato de 1L contendo 500 mL água destilada e 15g folhas secas de tomilho. A extração teve duração de 2 horas mediante aquecimento. Os extratos foram

armazenados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração. A separação do óleo essencial da água para posterior análise no GC-MS foi feita utilizando diclorometano. Para garantir a retirada da água, foi adicionada a fase contendo a fase orgânica, o sal sulfato de sódio anidro.

4.2.2. EXTRAÇÃO COM SOLVENTE

Nas extrações realizadas por Soxhlet foi utilizado etanol como solvente e um tempo de extração de 4hs após início do refluxo. A amostra seca de tomilho (3g) foi acondicionada em cartuchos de celulose e em seguida inserida no condensador. Os balões de fundo chato de 500mL contendo 150mL de solvente foram conectados ao condensador. O aparato experimental foi aquecido com uma manta, onde permaneceu em refluxo contínuo durante todo tempo de extração.

Posteriormente, os extratos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração para serem analisados por GC-MS.

4.2.3. EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO

Primeiramente, a otimização das condições de SFE foi realizada. A célula de extração (15,3 cm³) de aço inoxidável foi preenchida com 3g de amostra para todos os estudos de SFE (Figura 12). O material foi em seguida extraído com CO₂ supercrítico (99,5%, de pureza) em várias condições de pressão (140, 150 e 160 bar) e temperatura de 40°C, em todos os ensaios experimentais.

O sistema foi mantido durante pelo menos 10 min em modo de extração estática para permitir a estabilização e favorecer a obtenção de equilíbrio, e, em seguida, foi realizada a extração em modo dinâmico. As amostras foram recolhidas em 20 mL de álcool isopropílico, em intervalos de tempo específicos variando entre 5-120 min. A taxa de fluxo de CO₂ foi ajustado para 15-50 L/h em todos os experimentos. Vinte e sete diferentes tipos de amostras foram obtidos com SFE em três diferentes pressões. Os extratos foram colocados em frascos, mantidos no escuro e sob refrigeração para análises posteriores em CG-MS.

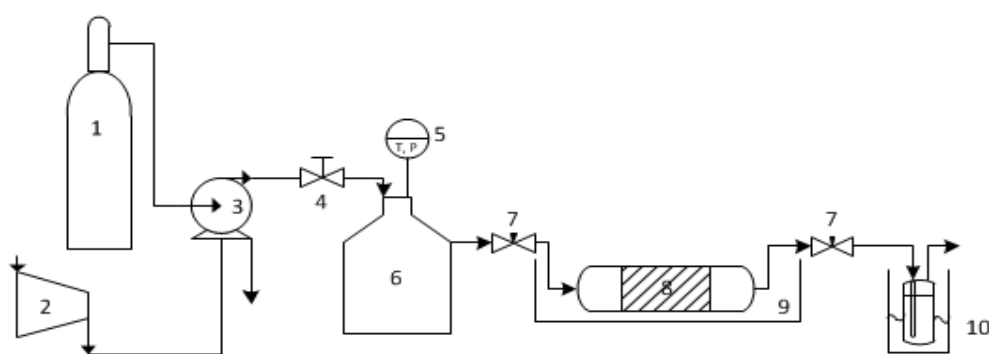


Figura 12: Esquema de extração supercrítica, que consiste em tanque de CO₂ (1), compressor (2), bomba pneumática (3), válvula de agulha (4), medidores de temperatura e pressão (5), tanque pulmão (6), válvula micrométrica (7), extrator de leito fixo (8), banho termostático (9) e frasco de coleta (10).

4.2.4. MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O preparo da amostra foi realizado da seguinte maneira: folhas secas de tomilho foram introduzidas em um frasco de vidro de 60 ml que foi vedado imediatamente por um septo de silicone.

Amostras de tomilho foram utilizadas para investigação das condições ótimas de extração (fibra, temperatura e tempo de extração). A fibra foi exposta no headspace do frasco contendo a amostra, para a captura dos analitos voláteis e posteriormente dessorção térmica no injetor do CG-MS (Figura 13).

As fibras de extração utilizadas foram: de 100 μm de polidimetilsiloxano (PMDS), 65 μm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), 75 μm carboxen-poli (dimetilsiloxano) (CAR/PDMS) e 85 μm de poliacrilato (PA). O condicionamento das fibras foi feito antes da sua utilização de acordo com as prescrições do fornecedor.

Primeiramente, a influência dos tipos de fibra de SPME sobre a eficiência da extração foi investigada. Quatro fibras comerciais que consistem de PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA foram utilizados para a extração das substâncias voláteis a partir de *Thymus vulgaris* (1 g) a 20 °C durante 60 min.

Em seguida foram realizados estudos da otimização do perfil de temperatura de extração, usando uma fibra 65 μm PDMS/DVB, 0,001 g de amostra e 40 min de tempo de extração. Ocorreram cinco variações de temperatura sendo elas: 20, 40, 60, 80 e 90°C.

Uma vez que um curto período de tempo é desejado para o pré-tratamento da amostra, uma série de tempos de extração (10, 20, 30, 40 e 60 min), foi investigada a 80 ° C com 0,001g de amostra para encontrar um tempo de extração ideal.

As áreas dos picos dos compostos principais (p-cimeno, γ -terpineno, sabineno hidratado, timol, carvacrol, borneol, cânfora, β -cariofileno e mirceno) foram analisadas em todas as etapas para obtenção dos resultados da otimização do processo.



Figura 13: Extração por SPME utilizando a unidade experimental

4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

4.3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DE *THYMUS VULGARIS*

A determinação da composição química do tomilho obtida dos diferentes métodos de extração foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-2010 SHIMADZU) (Figura 14). Os compostos foram separados em uma coluna Rtx capilar ®-5MS (5% fenil e 95% metilpolissiloxano) com 30m × 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura (fase estacionária). A porta de injetor foi aquecida a 250 ° C e as temperaturas de fonte de íons e de interface foram 230 ° C e 220 ° C, respectivamente. As amostras foram injectadas utilizando uma razão de divisão de 1:15. O hélio (He) foi usado como um gás de transporte a um fluxo constante de 1,2 ml / min. A temperatura do forno foi fixada em 60 ° C durante 5min, seguida de um aumento de 5 ° C / min até atingir 250 ° C permanecendo assim durante 17min. O volume de injeção dos extratos líquidos foi de 1 uL, e a análise foi realizada no modo de splitless. Já nas análises de SPME, as fibras foram introduzidas no injetor do GC-MS e dessorvido a 250 ° C durante 4 min.

Os componentes foram identificados de acordo com os seus espectros de massa, os quais foram comparados com os da base de dados NIST MS 05 (Biblioteca).



Figura 14: Cromatógrafo á gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-2010 SHIMADZU)

Para a realização da identificação dos compostos também foi realizado o cálculo do Índice de Retenção de Kovats. Para o cálculo desse índice foi necessária à injeção de uma solução padrão de alcanos saturados C7 - C30 servindo os tempos de retenção destes para a base de cálculo do índice de Kovats (IK) dos componentes dos óleos essenciais. Os tempos de retenção dos hidrocarbonetos e do componente do óleo essencial foram empregados para calcular o índice de Kovats de cada constituinte do óleo essencial, utilizando a Equação 4 (PEREIRA, *et al.*, 2002):

$$I = 100n + 100n \left(\frac{t_{Rz} - t_{Rz-1}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \right) \quad (4)$$

onde n é o número de carbonos do n -alcano com o tempo de retenção (t_{Rz}) imediatamente anterior ao padrão, e t_{Rz+1} o tempo de retenção do n -alcano localizado imediatamente após o padrão avaliado.

O índice de Kovats é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto comparativamente ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais (JANZANTTI, *et al.*, 2000).

Para assegurar a identificação dos compostos alvos, padrões de carvacrol e timol foram utilizados nas análises cromatográficas CG-MS, com objetivo da confirmação da presença dos mesmos através da análise do tempo de retenção.

4.3.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para a pesquisa da atividade antimicrobiana, foram avaliados o óleo essencial de tomilho (Sigma) assim como os padrões de carvacrol e timol. A *Candida albicans* selecionada para a análise foi obtida do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ. É importante o controle desta levedura, pois a mesma é uma das mais patogênicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas que em doentes imunodeprimidos podem ser letal.

A suspensão do inóculo foi preparada a partir de 3 transferências da cultura estoque congelada, no caldo Batata Dextrose por 24 h a temperatura de 30 °C.

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar (Ágar Dextrose Batata – ABD), com a técnica de poços de 6 mm em ágar endurecido. Um volume de 50 µL de cada amostra, na concentração de 10 mg/mL em etanol, foi colocado separadamente em cada poço do ágar inoculado em superfície com uma suspensão do inóculo de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colônias(UFC)/mL. Esta suspensão foi obtida pela diluição até absorvância de 0,700; em espectrofotômetro com $\lambda = 580$ nm. Etanol absoluto foi utilizado como controle positivo. As placas foram então incubadas a 10 °C por 24 horas para permitir que a amostra permeasse pelo ágar. Logo após, foram incubadas em estufa com temperatura de 30 °C por 48 horas. Os halos de inibição foram medidos utilizando-se paquímetro. Os ensaios foram feitos em triplicata para confirmação dos resultados.

4.3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das partículas. Desta maneira, foi realizada a microscopia de folhas de tomilho secas para as amostras não tratadas, assim como para as que foram utilizadas para extração do óleo por extração com fluido supercrítico (SFE) e extração por Soxhlet com etanol. As folhas foram liofilizadas utilizando um liofilizador Edwards modelo L5KR, fixadas no suporte da amostra e metalizadas com ouro, para posterior análise microscópica. Todas as amostras foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura FEI modelo Quanta 200, sob alto vácuo e a uma voltagem de aceleração de 20 kV e com um funcionamento distância de 10 mm (isto é, a distância entre a superfície da amostra e a lente do microscópio)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo são apresentados todos os resultados de eficiência e composição relativos a todos os processos de extração investigados.

O primeiro aspecto analisado foi o potencial fungicida do óleo essencial de tomilho, bem como dos seus componentes alvos, timol (anexo A figura A1) e carvacrol (anexo A figura A2) com objetivo de reafirmar os resultados encontrados na literatura. Desta maneira, o trabalho poderia prosseguir já que o óleo essencial obtido da planta em estudo apresentava atividade biológica. Podendo desta forma ser utilizada futuramente para uma aplicação farmacêutica.

Através de ensaios microbiológicos verificou-se que o óleo essencial de tomilho apresentou considerável atividade frente a *Candida albicans* com halos de inibição que apresentavam valor médio de 3,3mm. O timol apresentou em média uma inibição de 4,5mm e o carvacrol de 6,5mm (Tabela 5 e Figura 15). Com isso podemos verificar que o carvacrol isolado apresentou uma melhor inibição frente ao microrganismo utilizado. A atividade antifúngica de *Thymus vulgaris* frente a *Candida albicans* já foi verificada por SARTORATTO, *et al.*, 2004, BARBARO & STELATO, 2009 e ALMEIDA, *et al.*, 2011.

Tabela 5: Halo de inibição das amostras testadas frente a *Candida albicans*.

Amostras	Halo de inibição (mm)	RSD(%)
Timol	4,500	11,111
Carvarol	6,500	7,692
Óleo essencial de tomilho (padrão)	3,333	8,660
Branco (etanol)	-	-

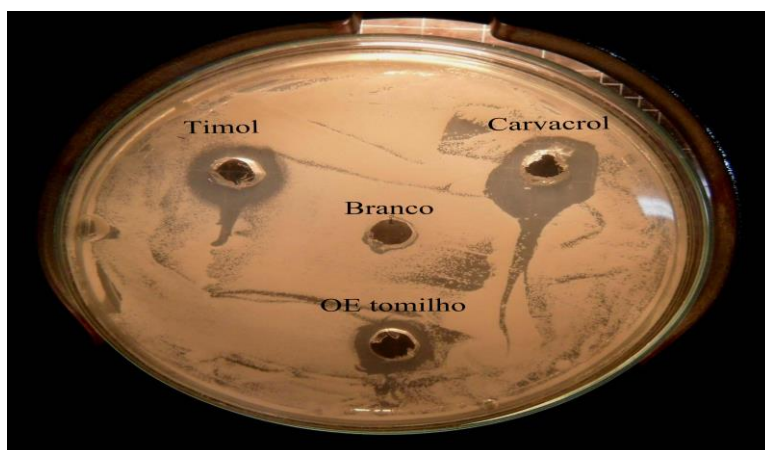


Figura 15: Avaliação do efeito antifúngico do óleo de tomilho sobre *Candida albicans*.

A atividade de um óleo pode estar relacionada com a estrutura química dos componentes presentes e a interação entre os mesmos (DORMAN & DEANS, 2000; MARINO, *et al.*, 2001; DELAQUIS, *et al.*, 2002). Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais. O antagonismo é observado quando o efeito de um ou ambos os compostos é menor quando são aplicados em conjunto do que quando aplicados individualmente. Sinergismo é observado quando o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma de os efeitos individuais (DAVIDSON & PARISH 1989).

COSENTINO, *et al.*, (1999) determinou a eficácia de diferentes OE de diferentes gênero de *Thymus* e os seus componentes puros, e concluiu que, entre os compostos isolados testados, carvacrol e timol, foram mais eficientes contra diferentes estirpes de referência, estando entre elas *Candida albicans*. O timol é estruturalmente muito semelhante ao carvacrol, tendo o grupo hidroxila em um local diferente no anel fenólico. Ambas as substâncias parecem tornar a membrana celular permeável, proporcionando a atividade antifúngica (LAMBERT, *et al.*, 2001).

Pode ser observado que quando aplicado o óleo essencial ocorreu redução do halo de inibição, isto pode ser explicado devido ao antagonismo de algum componente presente no OE. Porém esse antagonismo não deve estar associado ao carvacrol e timol, pois o efeito sinérgico entre estes componentes contra micro-organismos foi relatado por diversos autores (COSENTINO, *et al.*, 1999)

Em um estudo, o óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi utilizado para inibir o crescimento de *Candida albicans* através da técnica de difusão em ágar. Os halos de inibição variaram de 7,3 a 9,6mm. Estes valores estão acima do encontrado neste trabalho, porém foi utilizado concentrações maiores que as do presente estudo. Este fato pode justificar essa diferença encontrada (SILVA, *et al.*, 2010).

Outro aspecto importante foi a ausência de halo de inibição no branco (etanol), ou seja, o solvente utilizado na diluição das amostras não teve influência no procedimento. Este fato comprova que o etanol é uma boa alternativa uma vez que não interfere no processo.

A partir dos resultados obtidos no trabalho, sugerem-se novos estudos mais aprofundados e específicos com *Thymus vulgaris* L. com a finalidade de descobrir e conhecer melhor suas atividades biológicas e, possivelmente, verificar seus possíveis efeitos adversos e resistências cruzadas, e, dessa maneira, possibilitar o surgimento de um novo antimicrobiano com grande potencial no mercado farmacêutico.

5.1. RENDIMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de tomilho que foram submetidas à desidratação a 45°C durante 24hs e foi removida 57,869% de umidade. Este resultado representa a quantidade de água presente nas folhas de tomilho. Desta maneira o procedimento de secagem se faz necessário para aumentar o tempo de vida útil da planta.

5.2. ANALISES COM GC/MS

5.2.1 COMPOSIÇÃO DE *THYMUS VULGARIS* OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS EXTRATIVOS.

5.2.1.1. EXTRAÇÃO POR HIDRODESTILAÇÃO (HD)

Na extração por hidrodestilação, foram identificados vinte e quatro substâncias, sendo em sua maioria terpenos como mostrado na tabela 06. As substâncias majoritárias foram: timol, carvacrol, β -Linalool, Terpinen-4-ol e Borneol com área relativa de 27,655%, 10,095%, 7,515%, 5,710% e 4,905% respectivamente.

A tabela mostra ainda a comparação entre o índice de Kovats calculado e o índice de Kovats encontrado na literatura, o que permite uma maior confiança nos resultados, a diferença entre os índices de retenção pode ser atribuída a vários fatores, como a diferença

entre equipamentos e condições cromatográficas utilizadas. Devido a esses fatores, aceita-se a proximidade entre os valores obtidos experimentalmente e da literatura.

Em todos os experimentos, os desvios padrão relativo (RSD) foram calculados para os componentes extraídos, sendo todos menores que 10,776%, indicando uma precisão aceitável para a validação de um método analítico, uma vez que valores em torno de 15% são considerados admissíveis de acordo com a literatura (AQUINO, *et al.*, 2004).

As concentrações dos componentes timol e carvacrol foram as mais elevadas, 27,655 e 10,095% respectivamente. Esses mesmos componentes também exibiram maiores percentuais em estudos realizados por GRANGER & PASSET, (1973) apresentando o timol uma variação de 0,2 a 65% e carvacrol de 0,2 a 72% em diferentes condições ambientais.

Tabela 06: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por hidrodestilação

Nº	TR	Componentes	IK calculado	IK tabelado	Área relativa (%)	RSD (%)
1	8,054	1 Octen-3-ol	983	984 ¹	1,085	10,776
2	8,667	Decane	1001	1000 ⁷	0,760	9,304
3	8,782	α -Phellandrene	1004	1001 ¹	0,075	9,428
4	9,621	P- Cymene	1028	1023 ¹	0,540	0,025
5	9,8875	Eucalyptol	1035	1035 ³	0,085	8,319
6	10,817	γ - terpinene	1062	1059 ¹	0,229	7,443
7	11,170	sabinene hydrate	1070	1068 ¹	0,270	0,032
8	12,275	β - Linalool	1103	1102 ¹	7,515	2,917
9	13,008	2-p-Menthen-1-ol	1125	1139 ⁶	0,145	6,149
10	13,721	Camphor	1147	1144 ¹	0,165	4,285
11	14,392	Borneol	1167	1165 ¹	4,905	3,316
12	14,767	Terpinen-4-ol	1179	1177 ¹	5,710	2,229
13	15,125	P-cymen-8-ol	1190	1187 ²	1,075	3,289
14	15,300	α - terpineol	1195	1191 ¹	0,790	4,285
15	17,175	Thymoquinone	1256	1252 ¹	0,155	4,562
16	17,292	trans-Geraniol	1260	1258 ⁵	0,950	1,489
17	18,450	Thymol	1298	1292 ¹	27,655	7,594
18	18,705	Carvacrol	1307	1300 ¹	10,095	4,973
19	20,308	Eugenol	1364	1362 ⁴	0,205	3,449
20	21,592	Eugenol methyl ether	1410	1408 ⁵	0,200	3,536
21	22,071	Caryophyllene	1428	1424 ²	0,050	0,020
22	25,932	Sphulenol	1579	1577 ¹	0,115	6,149
23	26,050	Caryophyllene oxide	1584	1581 ¹	0,038	9,428
24	27,805	α - Cadinol	1658	1653 ¹	0,280	0,036

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹Hudaib, *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* 2009, ³Tian *et al.* 2012, ⁴Rather *et al.* 2012, ⁵Wang *et al.* 2012, ⁶Dugo *et al.* 2004, ⁷http://www.flavornet.org/f_kovats.html.

A porcentagem de borneol (4,095%), terpen-4-ol (5,710%) e β - Linalol (7,515%) encontrada neste trabalho foi superior em relação ao estudo HUDAIB, *et al.*, (2002), que encontraram 0,37-1,33 % de borneol, 0,25- 1,41% de terpen-4-ol e 0,71-2,19% β - Linalol.

JORDÁN, *et al.*, (2006) analisaram o óleo essencial *T. vulgaris* espanhol, obtido por hidrodestilação e constataram que β - linalol e borneol estavam entre os principais componentes extraídos como registrado nesse trabalho. Porém apresentaram baixos teores de timol e carvacrol 0,04-0,1% e 0,01-0,02% respectivamente.

OZCAN & CHALCHAT, (2004) em estudo verificaram que o timol (46,2%) foi o componente majoritário. Para a indústria, quanto maior a concentração deste composto, maior será a qualidade e o valor do óleo essencial. Além disso, β -Linalool, Terpinen-4-ol e Borneol estavam entre os componentes que apresentaram percentual significativo. Dados estes que corroboram com o presente trabalho. A quantidade de carvacrol (10,095%) encontrada neste trabalho foi superior em relação ao estudo de OZCAN & CHALCHAT, (2004), que encontrou 2,44% deste composto.

Os componentes *p*-cimeno e γ - terpineno esteve presente na maioria das amostras pesquisadas citadas na literatura como, por exemplo, no *Thymus vulgaris L.* estudado por Hudaib *et al.* (2002) foi encontrado 11,6 a 21,5% para *p*-cimeno e 1,14 a 16,88% γ - terpineno e Jordán *et al.* (2006), foi verificado 0,57 a 1% de *p*-cimeno e 0,38-1,05% de γ - terpineno. As concentrações encontradas neste trabalho ficaram em 0,540% *p*-cimeno e 0,229% γ - terpineno.

Variações de concentração podem ser consideradas normais devido a condições diferenciadas de cultivo, local de armazenamento e processamento das plantas. No entanto, todas as amostras de tomilho, apesar de serem de diferentes épocas do ano e de diferentes procedências, tiveram um comportamento similar em relação à composição dos componentes.

5.2.1.2. EXTRAÇÃO COM SOLVENTE (SE)

Na extração com solvente foram identificados trinta compostos, como descrito na tabela 07. A tabela mostra ainda a comparação entre o índice de retenção calculado e o índice de retenção encontrado na literatura, permitindo uma maior confiança nos resultados. Além disso, na tabela estão descritos os desvios padrões relativos, que apresentam valores compreendidos entre 0,027 a 10,879%.

Os componentes majoritários encontrados por este método extrativo foram: Timol (27,875%), *p*-cimeno (16,540%), carvacrol (4,715%), γ - terpineno (4,615%). Vale ressaltar que β -Mirceno (3,260%), β -Linalol (3,450%), Cariofileno (2,815%) e Borneol (2,960%) também apresentaram um percentual significativo de área relativa.

Na extração com solvente a temperatura de extração e a solubilidade dos componentes podem favorecer a formação de novos compostos. O que não ocorre quando a temperatura não é elevada ou quando não são extraídos devido às características dos processos e dos solventes.

A quantidade de timol e carvacrol obtido por extração com solvente (27,875% e 4,715% respectivamente) foram superiores ao encontrado por GUILLÉN & MANZANOS, (1998) que encontraram apenas traços desses componentes. Esta diferença pode ser atribuída ao quimiotipo das plantas, bem como as condições de cultivo utilizadas.

Os compostos timol, carvacrol, *p*-cimeno e γ - terpineno são encontrados como componentes majoritários em diversos estudo na literatura, como é o caso da pesquisa realizada por HUDAIB, *et al.*, (2002) que encontrou como componentes principais *p*-cimeno (11,61 a 32,18%), γ - terpineno (1,14 a 23,34%), timol (19,38 a 54,10%) e carvacrol (1,43 a 4,00%) e DAFERRERA *et al.*, (2000), que constataram 23,5% de *p*- cimeno, 4,3% de γ -

terpineno, 63,6% de timol e 2,2% de carvacrol . As concentrações encontradas neste trabalho foram: timol (27,875%), carvacrol (4,715%), p-cimeno (16,540%) e γ - terpineno (4,615%) estando de acordo com os autores citados.

O timol apresentou área relativa de 27,875 %, estando abaixo da encontrada por DAFERERA, *et al.*, (2000), que foi de 63,6%.

Tabela 07: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por extração com solvente (etanol).

Nº	TR	Componentes	IK calculado	IK tabelado	Área relativa (%)	RSD (%)
1	6,371	α -Pinene	934	932 ¹	0,075	9,428
2	8,192	1 Octen-3-ol	987	984 ¹	1,865	1,137
3	8,525	β -Myrcene	997	993 ¹	3,260	0,868
4	8,783	α -Phellandrene	1004	1001 ¹	0,570	2,481
5	9,638	P-cymene	1028	1023 ¹	16,540	0,171
6	9,763	D-Limonene	1032	1028 ¹	0,720	7,857
7	10,092	Eucalyptol	1041	1035 ³	0,335	6,332
8	10,835	γ - terpinene	1062	1059 ¹	4,615	1,379
9	11,192	Sabinene hydrate	1072	1068 ¹	0,670	10,554
10	12,359	β -Linalool	1106	1102 ¹	3,450	2,050
11	13,079	2-p-Menthen-1-ol	1128	1139 ⁶	0,065	10,879
12	13,767	Camphor	1148	1144 ¹	0,075	9,428
13	14,542	Borneol	1172	1165 ¹	2,960	0,478
14	14,896	Terpinen-4-ol	1183	1177 ¹	0,525	9,428
15	15,155	P-cymen-8-ol	1191	1187 ²	0,160	8,839
16	15,325	α -terpineol	1196	1191 ¹	0,270	10,476
17	16,765	Thymol methyl ether	1243	1237 ¹	0,079	10,741
18	17,142	Thymoquinone	1255	1252 ¹	0,130	10,879
19	17,296	trans-Geraniol	1260	1258 ⁵	0,325	2,176
20	18,471	Thymol	1299	1292 ¹	27,875	3,830
21	18,700	Carvacrol	1307	1300 ¹	4,715	5,549
22	20,325	Eugenol	1365	1362 ⁴	0,050	0,027
23	20,720	Copaene	1377	1377 ¹	0,735	2,886
24	21,559	Eugenol methyl ether	1409	1405 ⁵	0,565	3,755
25	22,088	Caryophyllene	1429	1424 ²	2,815	3,768
26	23,471	γ - Muurolene	1480	1477 ¹	0,123	8,658
27	24,588	δ cadinene	1525	1523 ¹	0,168	10,554
28	25,926	Spthulenol	1579	1577 ¹	0,185	3,822
29	26,059	Caryophyllene oxide	1584	1581 ¹	0,940	4,513
30	27,796	α -Cadinol	1657	1653 ¹	0,380	3,722

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹ Hudaib *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* 2009, ³Tian *et al.* 2012, ⁴Rather *et al.* 2012, ⁵Wang *et al.* 2012, ⁶Dugo *et al.* (2004).

O método de extração de solvente limita-se à solubilidade do composto no solvente utilizado. Como todos os componentes solúveis em água são extraídos, o extrato contém (além de voláteis, constituintes dos óleos essenciais) outros componentes que pode também ser responsáveis pelo aroma. Além disso, resinas, gorduras e ácidos graxos, ceras, ou pigmentos são geralmente co-extraídos.

5.2.1.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM SOLVENTE.

Os dois tradicionais métodos de extração (hidrodestilação e extração com solvente) foram utilizados para analisar a composição química de *Thymus vulgaris*. A composição, em geral, foi bastante similar para os dois métodos, como pode ser observado na tabela 08. Com exceção do α -pineno, β -mirceno, D-limoneno, timol metil eter, copaeno, γ -muuroleno e δ cadineno que foram extraídos apenas por extração com solvente e o decano que foi extraído apenas por hidrodestilação.

É notório que a extração com solvente consegue obter um maior número de sesquiterpenos quando comparado a hidrodestilação. Já que a SE foi capaz de identificar o copaeno, γ -Muurolene e δ -Cadinene.

Na HD os compostos majoritários do extrato de tomilho foram o timol, carvacrol, β -Linalool, Terpinen-4-ol e Borneol com área relativa de 27,655%, 10,095%, 7,515%, 5,710% e 4,905% respectivamente. Já para SE encontrou-se o timol (27,875%), p-cimeno (16,540%), carvacrol (4,715%), γ - terpineno (4,615%) como componentes predominantes.

Em observação dos resultados, é possível verificar que a extração de timol foi muito parecida nos dois métodos extrativos 27,655% na hidrodestilação e 27,875% na extração com solvente. Em contrapartida a área relativa de carvacrol foi maior na HD 10,095%, contra 4,715% na SE.

Observa-se na tabela 08 que, o método de hidrodestilação foi favorável à extração dos dois principais componentes de interesse comercial (timol e carvacrol). O aumento da área relativa do carvacrol foi bastante significativo, chegando a dobrar a quantidade do composto. Isto sugere que ocorreu uma melhora na qualidade final do extrato quando comparado ao óleo essencial obtido por extração com solvente.

Os componentes cariofileno, γ - terpineno e p- cimeno tiveram maiores concentrações de área relativa (%) na extração com solvente enquanto que terpinen-4-ol, borneol, β -linalol foram melhor extraídos por hidrodestilação. Isso pode estar relacionado às condições de extração e características dos solventes usados.

Pelos dois métodos extrativos foram extraídos diversos monoterpenos (como por exemplo, timol, carvacrol, p-cimeno, D-limoneno e outro), sesquiterpenos (copaeno, cariofileno, espatulenol, α -cadinol e outros), álcoois (trans-geraniol e 1octen-3-ol), éteres (éter metil eugenol e éter metil timol) e hidrocarboneto (decano).

No total foram extraídos trinta e um componentes pelos diferentes métodos de extração realizados, alguns compostos foram particulares a um tipo de extração e outros comuns a duas técnicas extrativas. Como resultado, obtivemos vinte e quatro compostos extraídos por HD e trinta extraído por SE. GUILLÉN & MANZANOS, (1998) conseguiram extrair uma gama maior de componentes por extração com solvente do que o presente estudo, apresentando 116 compostos identificados. Essa diferença pode ser justificada pela diferentes condições experimentais empregadas (solvente utilizado e tempo de extração). Por outro lado RICHTER & SCHELLENBERG, (2007), em condições muito similares ao estudo em questão identificaram por hidrodestilação 23 compostos, ou seja, um resultado muito análogo com a atual pesquisa.

Através das extrações realizadas com a espécie *T. Vulgaris* foi possível identificar 63,091% dos metabólitos por HD e 75,239 % para SE. Sendo assim, a extração com solvente conseguiu identificar uma maior quantidade de componentes presentes no tomilho. Os dois métodos extrativos analisados não identificaram nenhum novo componente que não foi mencionado em outros trabalhos pesquisados.

Tabela 08: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por hidrodestilação e extração com solvente (etanol).

Nº	TR	Componentes	IK calculado	IK tabelado	Área relativa HD (%)	RSD HD (%)	Área relativa SE (%)	RSD SE (%)
1	6,371	α - Pinene	934	932 ¹	-	-	0,075	9,428
	8,123	1 Octen-3-ol	985	984 ¹	1,085	10,776	1,865	1,137
3	8,525	β -Myrcene	997	993 ¹	-	-	3,260	0,868
4	8,667	Decane	1001	1000 ⁷	0,760	9,304	-	-
5	8,783	α - Phellandrene	1004	1001 ¹	0,075	9,428	0,570	2,481
6	9,629	P- Cymene	1028	1023 ¹	0,540	0,025	16,540	0,171
7	9,763	D-Limonene	1032	1028 ¹	-	-	0,720	7,857
8	9,990	Eucalyptol	1038	1035 ³	0,085	8,319	0,335	6,332
9	10,826	γ – terpinene	1062	1059 ¹	0,229	7,443	4,615	1,379
10	11,181	sabinene hydrate	1070	1068 ¹	0,270	0,032	0,670	10,554
11	12,317	β -Linalool	1105	1102 ¹	7,515	2,917	3,450	2,050
12	13,044	2-p-Menthen-1-ol	1127	1139 ⁶	0,145	6,149	0,065	10,879
13	13,744	Camphor	1148	1144 ¹	0,165	4,285	0,075	9,428
14	14,467	Borneol	1170	1165 ¹	4,905	3,316	2,960	0,478
15	14,832	Terpinen-4-ol	1181	1177 ¹	5,710	2,229	0,525	9,428
16	15,140	p-cymen-8-ol	1190	1187 ²	1,075	3,289	0,160	8,839
17	15,313	α -terpineol	1195	1191 ¹	0,790	4,285	0,270	10,476
18	16,765	Thymol methyl ether	1243	1237 ¹	-	-	0,079	10,741
19	17,158	Thymoquinone	1256	1252 ²	0,155	4,562	0,130	10,879
20	17,294	trans-Geraniol	1260	1258 ⁵	0,950	1,489	0,325	2,176
21	18,460	Thymol	1298	1292 ¹	27,655	7,594	27,875	3,830
22	18,703	Carvacrol	1307	1300 ¹	10,095	4,973	4,715	5,549
23	20,317	Eugenol	1364	1362 ⁴	0,205	3,449	0,050	0,027
24	20,720	Copaene	1377	1377 ¹	-	-	0,735	2,886
25	21,575	Eugenol methyl ether	1409	1405 ⁵	0,200	3,536	0,565	3,755
26	22,079	Caryophyllene	1429	1424 ²	0,050	0,020	2,815	3,768
27	23,471	γ -Muurolene	1480	1477 ¹	-	-	0,123	8,658
28	24,588	δ - Cadinene	1525	1523 ¹	-	-	0,168	10,554
29	25,929	Sphulenol	1579	1577 ¹	0,115	6,149	0,185	3,822
30	26,055	Caryophyllene oxide	1584	1581 ¹	0,038	9,428	0,940	4,513
31	27,801	α - Cadinol	1657	1653 ¹	0,280	0,036	0,380	3,722

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹Hudaib *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* 2009, ³Tian *et al.* 2012, ⁴Rather *et al.* 2012, ⁵Wang *et al.* 2012, ⁶Dugo *et al.* (2004), ⁷http://www.flavornet.org/f_kovats.html.

Os óleos essenciais de plantas têm sido geralmente isolados por hidrodestilação ou extração de solvente. As desvantagens dessas estas técnicas são: baixa produtividade, perda de compostos voláteis, tempos longos de extração e produção de resíduos tóxicos que são resultados da degradação de compostos insaturados, devido ao calor (DONEANU & ANITESCU, 1998; YAMINI, *et al.*, 2002).

Desta maneira, a escolha entre HD E SE vai depender dos componentes alvos que se deseja obter e do objetivo em questão (maior número de compostos extraídos, maior área relativa de determinado componente alvo entre outros). Vale ressaltar que essas técnicas possuem vantagens e desvantagens, fatores esses que podem interferir no processo, devendo ser levados em consideração na hora da escolha do método extrativo a ser utilizado.

5.2.1.4. EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Tal como esperado, os compostos extraídos, aumenta significativamente com a elevação da pressão de extração. Em pressões mais elevadas, ocorre aumento da densidade do CO₂ e, portanto, a solubilidade do solvente aumenta e grandes quantidades de material são extraídos. Isto pode ser observado na tabela 09, que mostra a presença dos principais componentes voláteis nas três diferentes pressões.

Tabela 09: Identificação por GC-MS dos principais constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por SFE.

Nº	Componentes	140bar/ 40°C	150bar/ 40°C	160bar/ 40°C
01	α -pinene		X	X
02	α -thujene			X
03	Sabinene			X
04	Camphene		X	X
05	Beta- pinene			X
06	1-octen-3-ol	X	X	X
07	β -myrcene			X
08	β -phellandrene			X
09	P-cymene	X	X	X
10	Limonene			X
11	γ -terpinene	X	X	X
12	Linalool	X	X	X
13	Camphor			X
14	Borneol			X
15	Sabinene hydrate	X	X	X
16	Terpin-4-ol	X	X	X
17	Thymol	X	X	X
18	Carvacrol			X
19	Caryophyllene	X	X	X

Como pode ser notado, a pressão de 160 bar foi capaz de extrair todos os principais compostos presente no extrato de tomilho obtido por SFE, fato este que não foi possível nas demais pressões. GARCÍA-RISCO, *et al.*, (2011), verificaram que a concentração de compostos do tipo terpenóide (timol, carvacrol, borneol, etc) no extrato supercrítico de *T. vulgaris* aumenta significativamente a pressões consideradas médias (em torno de 15Mpa) quando comparadas a pressões de 30 e 40Mpa. Isso acontece porque em pressões mais

elevadas ocorre o aumento da co-extração de compostos que não são determinados/identificados na análise GC-MS e diminuição dos compostos do tipo terpenóide.

Outro ponto muito importante a ser analisado é a presença do carvacrol, este componente foi extraído apenas a pressão de 160bar. É sabido que o timol e o carvacrol são responsáveis pela maioria das atividades biológicas do *T. vulgaris*. (DAFERERA, *et al.*, 2000; KALEMBA & KUNICKA, 2003 e BAGAMBOULA, *et al.*, 2004). Desta forma, a presença desses componentes no extrato obtido da espécie *T. vulgaris* é de extrema importância.

Ademais, foi analisada a quantidade de componentes extraído em cada pressão utilizada nesse estudo, como pode ser visto na tabela 10.

Tabela 10: Números de compostos extraídos de *Thymus vulgaris* com SFE nas diferentes condições estudadas.

	140 bar/ 40°C	150 bar/ 40°C	160 bar/ 40°C
Número de compostos extraídos	21	29	33

A partir do exposto na tabela 10 pode-se afirmar que na totalidade, a pressão de 160bar/40°C é capaz de extrair um maior número de componentes. Desta maneira a pressão de 160bar é considerada como ideal, uma vez que consegue extrair uma maior quantidade de componentes, inclusive o carvacrol, que é um dos componentes alvos da espécie *T.vulgaris*.

As diferentes condições experimentais utilizadas (140bar/40°C, 150bar/40°C e 160bar/40°C) foram analisadas em diferentes tempos de extração. Assim, foi possível estudar as cinéticas de extração, que são apresentadas nas Figuras 16, 17 e 18. As cinéticas demonstram a massa (área relativa %) dos principais componentes, obtida em função do tempo de extração, quando a taxa de fluxo de CO₂ de 15-50 L/h foi empregada.

Como pode ser observada nas figuras 16, 17 e 18, a extração quase completa do material vegetal foi atingida após cerca de 60 min de extração para todas as pressões em estudo. Desta maneira o tempo de 60 minutos é considerado ideal para extração dos componentes voláteis presentes em *Thymus vulgaris*.

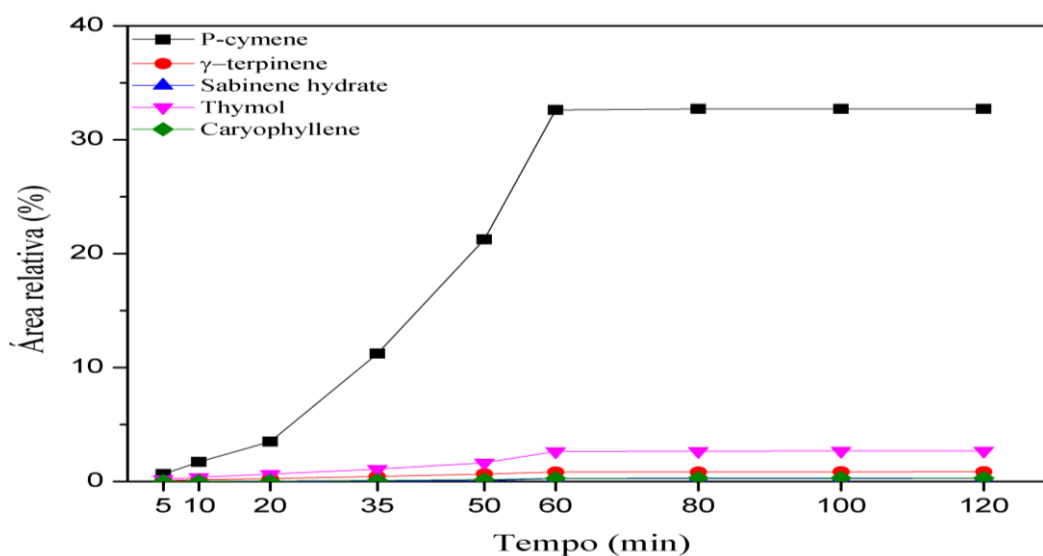


Figura 16: Cinética de extração SFE de folhas de tomilho, a 140 bar, 313K e fluxo de CO₂ 15-50 L / h.

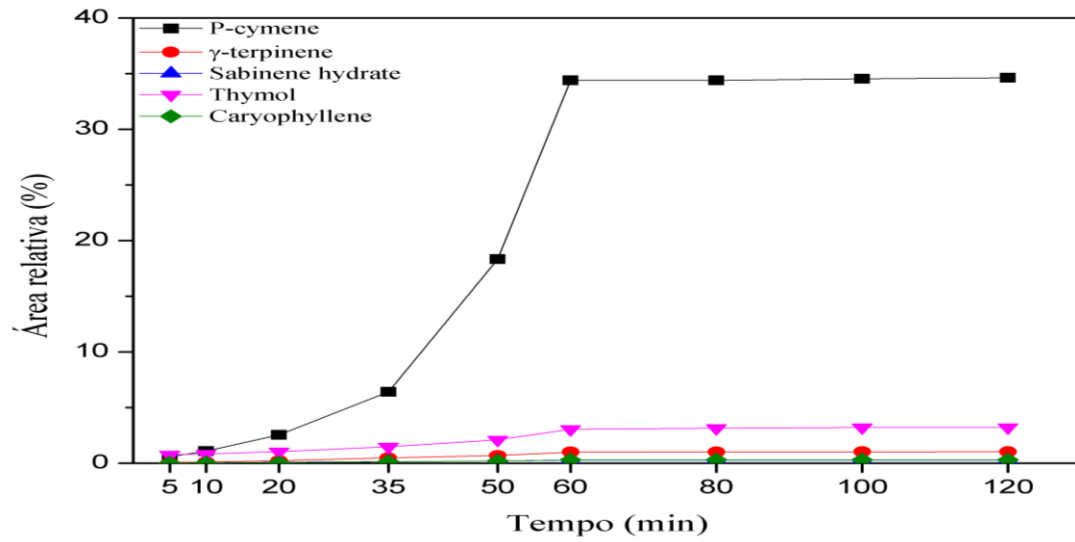


Figura 17: Cinética de extração SFE de folhas de tomilho, a 150 bar, 313K e fluxo de CO₂ 15-50 L/h.

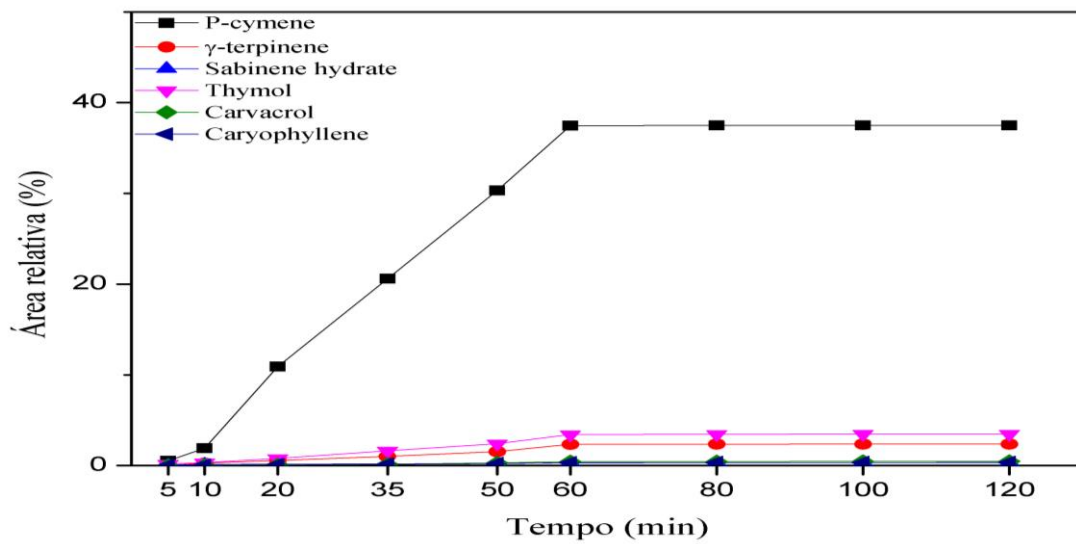


Figura 18: Cinética de extração SFE de folhas de tomilho, a 160 bar, 313K e fluxo de CO₂ 15-50 L/h.

Além disso, foi comparada a área do pico (%) no tempo de 60 min (tempo de extração ideal) dos principais componentes de óleo essencial de tomilho, nas diferentes pressões (Figura 19)

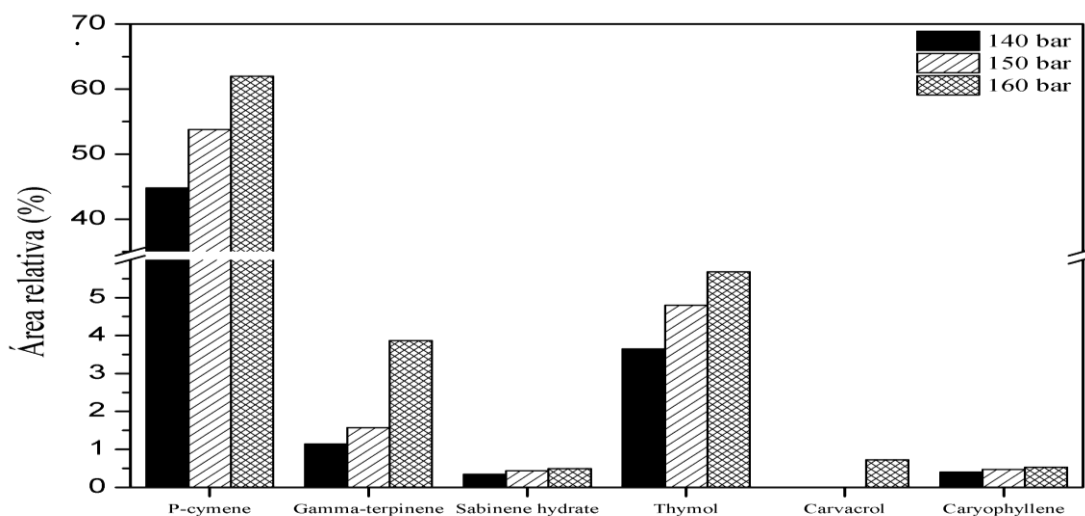


Figura 19: Comparação da área do pico (%) no tempo de 60 min dos principais componentes de óleo essencial de tomilho, em diferentes pressões e temperatura de 40 ° C.

A Figura 19 mostra que as maiores frações dos componentes foram observadas nas condições de pressão mais elevada. HAMDAN, *et al.*, (2008), CORSO (2008) e FREITAS, *et al.*, (2008) também observaram esse mesmo efeito na extração de óleos de cardamomo, gengelim e sementes de uva, respectivamente.

Como é de esperar, a pressão de 160bar teve maior área de pico (%) de todos os compostos estudados, reafirmando mais uma vez que a pressão de 160 bar é a mais adequada para o estudo em questão. Logo, as condições ótimas para a extração com fluido supercrítico de substâncias voláteis de *Thymus vulgaris* foram como se segue: pressão de 160 bar para temperatura de extração de 40 ° C, o tempo de extração estática de 10 min seguido de 60 min de extração dinâmica.

A composição do material recuperado ao total de 60 min de extração foi analisada por GC-MS. A tabela 11 apresenta a composição do extrato, em termos de percentagem da área do pico dos compostos identificados. Também podem ser notados os índices de retenção de Kovats, calculado e tabelado para comparação e reafirmação da identificação do composto, além dos desvios padrões relativos encontrados para cada componente.

A investigação do extrato de *Thymus vulgaris* obtido por SFE revelou a presença de p-cimeno (61,991%) e timol (5,679%) como componentes principais. Estes compostos também foram majoritários em estudo realizado por BLUM, *et al.*, (1997) com extração com fluido supercrítico.

Esse elevado percentual de p-cimeno pode acarretar uma potencialização do efeito biológico do óleo essencial. DORMAN & DEANS, (2000) relataram que p-cimeno não é um eficaz antibacteriano quando usado sozinho, mas quando combinado com o carvacrol ocorre sinergismo. Este fato foi observado contra *Bacillus cereus* in vitro. Esse sinergismo ocorre devido a maior eficiência de p-cimeno a serem incorporadas na bicamada lipídica. Com isso, muito provavelmente o transporte de carvacrol é facilitado através da membrana citoplasmática (ULTEE, *et al.*, 2002).

Tabela 11: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por extração com fluido supercrítico (a pressão de 160bar, temperatura de 40°C e tempo de extração de 60 min).

Nº	TR	Componentes	IK calculado	IK tabelado	Área relativa (%)	RSD (%)
1	6,116	α -thujene	927	926 ¹	0,972	6,889
2	6,502	α -pinene	938	932 ¹	0,431	1,188
3	6,798	Camphene	947	945 ¹	0,069	8,658
4	7,625	Sabinene	971	972 ¹	0,203	5,812
5	7,798	β - pinene	976	973 ¹	5,102	4,710
6	8,105	1-octen-3-ol	984	984 ¹	0,189	8,319
7	8,185	Phenol	987	980 ⁴	0,986	1,598
8	8,393	β -myrcene	993	993 ¹	0,098	4,041
9	8,792	Pentane 2,2,3,4-tetramethyl	1004	-	1,638	5,772
10	8,852	Decane	1006	1000 ⁴	3,834	1,850
11	9,270	3-carene	1018	1010 ¹	0,142	2,773
12	9,605	P-cymene	1027	1023 ¹	61,991	0,009
13	9,651	Limonene	1029	1028 ¹	0,543	7,978
14	9,854	β -phellandrene	1034	1031 ³	0,181	2,176
15	11,029	γ -terpinene	1068	1059 ¹	3,867	0,718
16	11,138	Hexane, 2,2,5,5-tetramethyl	1071	-	0,078	10,102
17	11,250	Sabinene hydrate	1074	1068 ¹	0,490	2,397
18	12,056	Undecane	1097	1100 ⁴	1,190	4,306
19	12,204	β - Linalool	1101	1102 ¹	0,538	2,198
20	12,388	Octane, 2,2-dimethyl	1107	-	0,027	7,443
21	13,792	Camphor	1149	1144 ¹	0,070	5,657
22	14,535	Borneol	1172	1165 ¹	0,184	4,285
23	14,834	Terpin-4-ol	1181	1177 ¹	0,228	3,449
24	15,070	p-cymen-8-ol	1188	1187 ²	0,038	5,238
25	15,538	Dodecane	1287	1200 ⁴	2,006	3,143
26	16,650	Thymol methyl ether	1239	1237 ¹	0,080	7,443
27	17,084	Thymoquinone	1253	1252 ¹	0,075	5,783
28	18,125	Tridecane	1212	1300 ⁴	1,616	0,975
29	18,421	Thymol	1297	1292 ¹	5,679	0,393
30	18,533	Nonane, 3,7-dimethyl	1301	-	0,103	3,822
31	18,709	Carvacrol	1307	1300 ¹	0,726	0,827
32	22,071	Caryophyllene	1428	1424 ²	0,530	3,928
33	26,439	Heptadecane	1543	1700 ⁴	0,119	1,664

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹Hudaib *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* (2009), ³Leela *et al.* (2009), ⁴ http://www.flavornet.org/f_kovats.html

Outro ponto importante a ser analisado é a presença de diversos hidrocarbonetos, como por exemplo, 2,2,3,4-tetrametil pentano, 3,7-dimetil nonano, 2,2-dimetil octano, 2,2,5,5-tetrametil hexano, heptadecano, tridecano, dodecano, undecano e decano. Guillén & Manzanos (1998), também relataram presença de vinte e três diferentes hidrocarbonetos.

Cabe ressaltar que para componentes 2,2,3,4-tetrametil pentano, 3,7-dimetil nonano, 2,2-dimetil octano, 2,2,5,5-tetrametil hexano não foram encontrados na literatura índices de retenção nas condições necessária para comparação. Desta forma, a comparação não foi possível como pode ser visto na tabela 11.

Os resultados da composição química relatado no estudo indicaram que β -pineno (5,102%), γ -terpineno (3,867%) e decano (3,834%) apresentaram área relativa significativa, ou seja, apesar de não estarem entre os compostos majoritários apresentam uma porcentagem de área relativa expressiva.

O carvacrol apresentou uma baixa concentração (0,726%) quando comparado a pesquisa de GARCÍA-RISCO, *et al.*, (2011) que encontrou uma concentração de carvacrol variando de 3,44 a 9,65 % em um estudo do óleo essencial de tomilho obtido por SFE. Além disso, GARCÍA-RISCO, *et al.*, (2011) encontraram como compostos majoritários eucaliptol (1,07 a 7,23%), β - linalol (2,05 a 6,44%), cânfora (1,00 a 9,55%), borneol (3,42 a 4,54%), timol (57,46 a 82,04%) e carvacrol (3,44 a 9,65%). No presente estudo não foi detectado a presença do eucaliptol, e os compentes β -linalol (0,538%), cânfora (0,070%), borneol (0,184) e carvacrol (0,726%) foram encontrados em percentuais menores, não sendo considerados majoritários. Essa diferença deve estar associada às condições de plantio, condições climáticas, tipo de secagem e armazenamento da planta, bem como as condições empregadas na extração com fluido supercrítico.

Os desvios padrões relativos variaram de 0,009 a 10,102% estando dentro do limite aceitável. Sendo o menor desvio encontrado para P-cimeno e o maior para o 2,2,5,5-tetrametil hexano.

5.2.1.5. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A influência dos tipos de fibra de SPME sobre a eficiência da extração foi investigada. Quatro fibras comerciais que consistem de PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA foram utilizados para a extração das substâncias voláteis a partir de *Thymus vulgaris* (1 g) a 20 ° C durante 60 min. As áreas dos picos dos principais compostos (p-cimeno, γ -terpineno, sabineno hidratado, timol, carvacrol, borneol, cânfora, β -cariofileno e β -mirceno) são dadas na Figura 20.

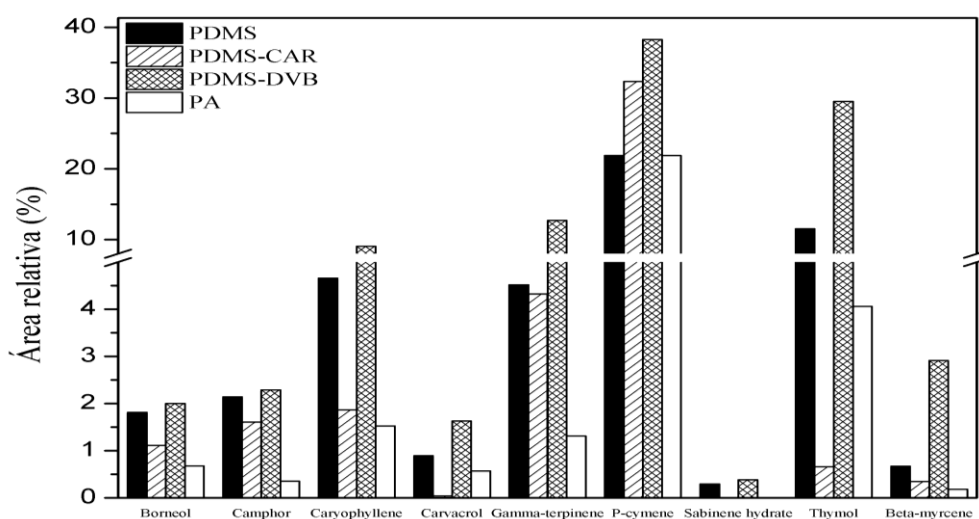


Figura 20: O efeito de diferentes fibras de SPME na eficiência de extração de folhas de tomilho (temperatura de 20°C e tempo de extração de 60 min).

Como esperado, a abundância do pico varia em função da volatilidade e da polaridade dos analitos e da composição do revestimento de fibra. Como podem ser observadas, as maiores áreas relativas foram obtidas com a fibra PDMS/DVB. Portanto esta foi escolhida para posteriores aplicações.

O filme polimérico PDMS/DVB, proporcionou uma extração mais abrangente, isto é, extraiu maior número de compostos (figura 21). O número médio de picos cromatográficos identificados foi: 30 com a fibra PDMS, 19 com a PDMS/CAR, 47 com a PDMS/DVB e 15 com a PA

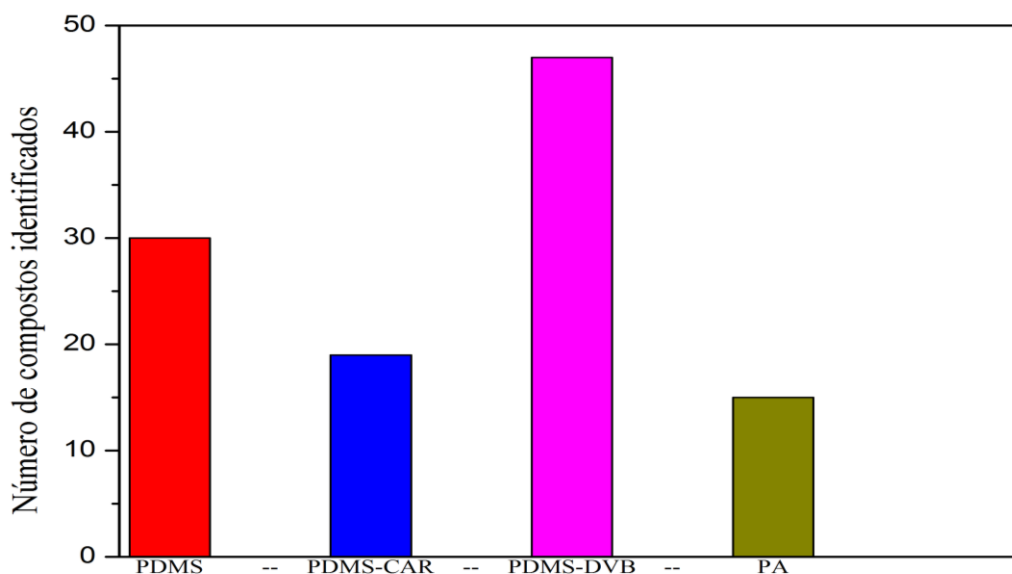


Figura 21: Número de compostos identificados pelas diferentes fibras de SPME de folhas de tomilho (temperatura de 20°C e tempo de extração de 60 min).

A fibra de PDMS/DVB apresenta uma fase porosa e é mais eficiente para analitos que contém entre 6 e 15 átomos de carbonos na molécula. Devido a sua alta capacidade de adsorção, é indicada para analitos presentes em nível de traços (DEMYTTENAERE, *et al.*, 2004). Neste trabalho foi possível observar sua eficiência de extração (número de compostos detectados e intensidade) em relação aos revestimentos anteriormente citados, em especial no que diz respeito a extração de compostos de baixa massa molecular (com tempo de retenção abaixo de 10 min).

BICCHI, *et al.*,(2000) realizaram estudos com diversas fibras de SPME para análise de compostos voláteis de plantas aromáticas, entre elas estava o tomilho. Os autores concluíram PDMS/DVB e PDMS eram muito eficazes na maioria dos componentes investigados. Desta maneira essas fibras apresentaram uma maior abundância de pico para a maioria dos componentes investigados. Fato este que corrobora com a presente pesquisa.

Embora a literatura apresente vários tipos de filmes poliméricos para extração de compostos voláteis de plantas, observa-se que, nos últimos tempos, o uso das fibras mistas, em várias situações tem apresentado uma performance superior em termos de capacidade de extração (PELLATI, *et al.*, 2005).

Outro parâmetro a ser estabelecido, é a temperatura de extração. Sabe-se que a temperatura altera a interação do analito com o revestimento da fibra. Alguns aumentam sua interação e outros diminuem com o aumento da temperatura. Para este estudo foi avaliado o comportamento dos principais componentes presentes em *T. vulgaris*. Os perfis de

temperatura de extração, usando uma fibra de PDMS/DVB 65 μm (0,001 g de amostra e 40 min de tempo de extração) são apresentados na figura 22.

A concentração de todos os nove compostos aumentou com a elevação da temperatura de extração (20°C a 90°C) e alcançou um máximo a 80 ° C. Depois de 80°C todos os componentes se mantiveram estabilizados, ou seja, não tiveram acréscimos significativos de suas respectivas áreas relativas. Desta maneira, uma temperatura de extração de 80 ° C foi utilizado como a melhor escolha.

A área relativa aumentou com a temperatura, atingido o equilíbrio a 80°C e esta temperatura foi escolhida porque temperaturas superiores a 80°C pode levar à formação de artefatos e podem também afetar a adsorção exotérmica dos analitos, especialmente os de maior volatilidade (RIU-AUMATELL, *et al.*, 2011).

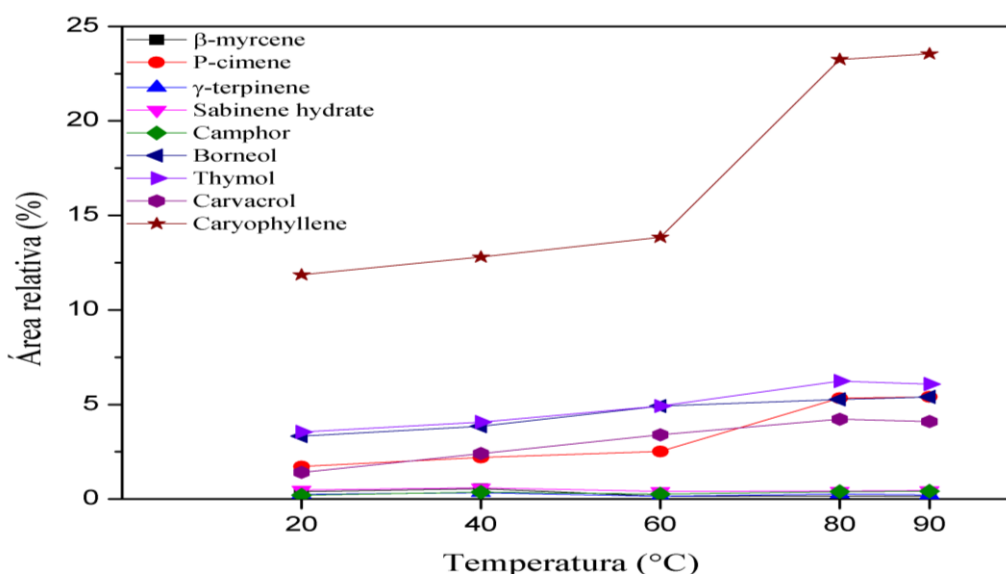


Figura 22: O efeito das diferentes temperaturas de extração da SPME sobre as eficiências de extração de folhas de tomilho (tempo de extração de 40 min com fibra de PDMS/DVB).

De acordo com GUO, *et al.*, (2006), os coeficientes de difusão dos analitos aumentam com a temperatura e a concentração dos componentes voláteis no headspace deve ser aumentada, favorecendo a extração a temperaturas mais elevadas.

A absorção de compostos voláteis aumentou com a temperatura, devido a uma melhor transferência de massa entre a amostra e o headspace. Por outro lado um grande aumento da temperatura reduz os coeficientes de partição dos analitos entre o filme polimérico e a fase headspace, já que o processo de adsorção dos analitos no filme da fibra é exotérmico, ou seja, atinge-se o ponto de saturação da fibra; neste caso, o equilíbrio é deslocado na direção do headspace, com a consequência redução da área relativa dos analitos (PAWLISZYN, 2000).

Uma vez que um curto período de tempo é desejado para o pré-tratamento da amostra, uma série de tempos de extração (10, 20, 30, 40 e 60 min), foi investigada a 80°C com 0,001 g de amostra (Figura 23).

O tempo de exposição da fibra a amostra foi determinado graficando-se a área dos principais analitos pelo tempo de exposição. Idealmente, espera-se que haja um equilíbrio, ou seja, que tenha um tempo de exposição a partir do qual a resposta do analito seja constante. A partir desse tempo, pode-se considerar que o analito tenha atingido o equilíbrio e, portanto pode-se considerar que aquele seja o tempo adequado de exposição.

Os resultados mostraram que 30 minutos eram suficientes para a análise dos nove constituintes-alvo, uma vez que a eficiência de extração de 30 min foi semelhante ao de 60 min. Para a fibra de PDMS/DVB, a condição de equilíbrio para a absorção da maioria dos analitos foi alcançada após 30 min, uma vez que a partir desse tempo de extração, as massas (áreas relativas) extraídas tendem a flutuar em torno de um valor constante. Assim, um tempo de extração de 30 minutos foi escolhido como o tempo ótimo para a análise dos constituintes voláteis de *Thymus vulgaris*.

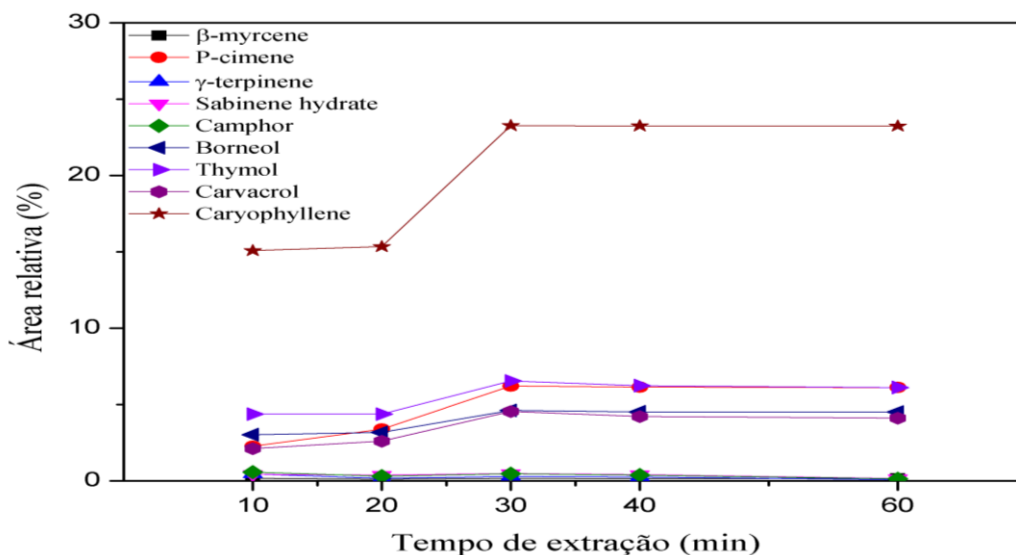


Figura 23: O efeito de diferentes tempos de extração de SPME na eficiência de extração de folhas de tomilho (temperatura extração de 80 ° C com fibra de PDMS/DVB).

BENYELLES, *et al.*, (2011) investigaram a otimização dos parâmetros de SPME para análise do óleo essencial das raízes de *Rhaponticum acaule* L. O valor máximo da área de pico total foi adquirido para uma temperatura de 70 ° C e um tempo de extração de 30 min.

SHEN *et al.*, (2005) realizaram um estudo dos constituintes voláteis de *Fructus Amomi* através da micro extração em fase sólida. Os autores avaliaram e otimizaram 3 parâmetros relacionados a essa técnica, a escolha da fibra, perfil de temperatura e tempo de extração. A partir disso verificaram que a melhor fibra era PDMS atrelado a uma temperatura de extração e de 80°C e 30 min de tempo de extração.

Os constituintes voláteis presentes no headspace *Thymus vulgaris* foram extraídos por SPME sob condições ótimas, e os compostos extraídos foram isolados e identificados por GC-MS, que eram principalmente monoterpênicos tais como timol (6,54%), o carvacrol (4,85%), p-cimeno (6,210%), β -Linalol (5,960%), Terpinen-4-ol (5,770%), borneol (4,15%), γ - terpineno (0,300%) e sabineno hidratado (0,495%) e sesquiterpenos tais como o cariofileno (23,265%) e δ - Cadineno (4,915%) - Tabela 12.

A técnica de micro extração em fase sólida revelou desvios padrões relativos variando de 0,016% a 10,421%, todos desta maneira são consideráveis aceitáveis. Na tabela também podem ser observados os índices de Kovats calculados e tabelados que foram utilizados para comprovação das substâncias que estão sendo identificadas.

Através da técnica de SPME foi possível a extração de um grande número de sesquiterpenos como, por exemplo, α -Cubebeno (2,265%), Copaeno (2,035%), β - Bourboneno (2,400%), β -Cubebeno (2,900%), Cariofileno (23,265%), α -Muuroleno (2,60%), γ - Cadineno (4,290%), δ -Cadineno (4,915%), Sphulenol (1,480%), Cariofileno oxide (3,295%), γ -Eudesmol (0,690%) e Cadaleno (0,610%). O metabólito mais abundante entre os

sesquiterpenos e os demais compostos foi o cariofileno (23,265%), sendo considerado o componente majoritário em *T. vulgaris*. Este sesquiterpeno é descrito em diversos óleos essenciais por possuir forte aroma e diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória (FERNANDES, *et al.*, 2007; PASSOS *et al.* 2007), antialérgica (GHELARDINI, *et al.*, 2001), anestésica local (COSTA, *et al.*, 2000), antifúngica (ZHENG, *et al.*, 1992) e anticarcinogênica (CHINO, *et al.*, 1996).

Na literatura são inúmeros os trabalhos sobre diferentes óleos essenciais ricos em sesquiterpenos apresentando, inclusive, cariofileno como principal componente, com atividade antimicrobiana (FORMISIANO, *et al.*, 2006) e antifúngica (GARG, *et al.*, 1992).

BARANAUSKEINÉ, *et al.*, (2005) relataram que o p-cimeno, timol, carvacrol, β -linalol e cariofileno estavam entre os componentes principais extraídos do tomilho por SPME, fato este também verificado no estudo em questão. No presente estudos estes componentes apresentaram áreas relativas de 6,210%, 6,540%, 4,850%, 5,960% e 23,265% respectivamente.

Tabela 12: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por micro extração em fase sólida (fibra PDMS/DVB, temperatura de 80°C e tempo de extração de 30 min).

N°	TR	Componentes	IK calculado	IK tabelado	Área relativa (%)	RSD (%)
1	6,138	α -thujene	927	926 ¹	0,920	1,537
2	6,375	α - pinene	934	932 ¹	0,495	7,142
3	6,879	Camphene	949	945 ¹	0,855	2,481
4	7,750	β -Pinene	974	973 ¹	0,135	5,238
5	8,095	1-octen-3-ol	984	984 ¹	0,570	2,481
6	8,125	3-octanone	985	986 ⁷	0,056	10,102
7	8,275	β -Terpinene	989	988 ¹⁸	0,111	1,274
8	8,358	β -Myrcene	992	993 ¹	0,180	7,857
9	8,725	α -Phellandrene	1002	1001 ¹	0,191	0,740
10	9,033	3-Carene	1011	1010 ¹	0,143	2,481
11	9,258	α -Terpinene	1017	1014 ¹	0,121	0,587
12	9,550	p- Cymene	1026	1023 ¹	6,210	2,961
13	9,758	β -Phellandrene	1032	1031 ³	0,041	3,449
14	9,800	Eucalyptol	1033	1035 ⁵	0,179	9,111
15	9,921	α -Toluenol	1036	1043 ¹⁶	0,140	10,102
16	10,763	γ - Terpinene	1060	1059 ¹	0,300	9,428
17	11,058	sabinene hydrate	1069	1068 ¹	0,495	5,713
18	11,513	1-nonen-3-ol	1081	1079 ⁸	0,165	4,285
19	11,858	Trans-linalol oxide	1091	1095 ⁹	0,180	7,857
20	12,183	Thujone	1102	1107 ¹⁰	0,160	8,839
21	12,233	β -Linalool	1102	1102 ¹	5,960	2,373
22	12,933	2-p-Menthen-1-ol;	1123	1120 ¹¹	0,165	4,285
23	13,703	Camphor	1147	1144 ¹	0,475	10,421
24	14,150	Isoborneol	1160	1159 ¹²	0,181	0,781
25	14,434	Borneol	1169	1165 ¹	4,615	8,121
26	14,829	Terpinen-4-ol	1181	1177 ¹	5,770	3,676

27	15,075	p-cymen-8-ol	1188	1187 ²	3,610	1,959
28	15,450	p-Menth-8-en-2-one, trans	1199	1203 ¹³	0,515	1,373
29	16,146	Carveol	1222	1225 ¹⁴	0,191	0,371
30	16,608	Thymol methyl ether	1238	1237 ¹	0,870	3,251
31	17,129	Thymoquinone	1255	1252 ¹	1,425	7,443
32	17,350	Carvenone	1262	1258 ¹⁵	0,145	4,877
33	18,404	Thymol	1297	1292 ¹	6,540	9,298
34	18,704	Carvacrol	1307	1300 ¹	4,850	2,041
35	19,795	α - Cubebene	1346	1345 ⁶	2,265	0,312
36	20,595	Copaene	1374	1377 ¹	2,035	1,042
37	20,967	β -Bourbonene	1387	1386 ¹	2,400	2,357
38	21,102	β -Cubebene	1392	1388 ⁶	2,900	3,901
39	22,117	Caryophyllene	1430	1424 ²	23,265	4,042
40	23,990	α -Muurolene	1501	1500 ¹	2,600	2,176
41	24,330	γ - Cadinene	1515	1513 ¹	4,290	0,016
42	24,598	δ - Cadinene	1525	1523 ¹	4,915	1,583
43	25,958	Sphulenol	1580	1577 ¹	1,480	4,778
44	26,021	Caryophyllene oxide	1583	1581 ¹	3,295	0,644
45	26,560	Hexadecane	1605	1600 ⁴	0,345	2,050
46	27,164	γ - Eudesmol	1630	1627 ¹	0,690	6,149
47	28,356	Cadalene	1684	1684 ¹⁷	0,610	4,637

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹Hudaib *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* (2009), ³Leela *et al.* (2009), ⁴http://www.flavornet.org/f_kovats.html, ⁵Tian *et al.* 2012, ⁶Wang *et al.* 2012, ⁷Salido *et al.* 2003, ⁸Costa *et al.* 2008, ⁹Pérez *et al.* 2007, ¹⁰Vagionas *et al.* 2007(a), ¹¹Asuming *et al.* 2005, ¹²Baranauskiene *et al.* 2003, ¹³Chorianopoulos *et al.* 2004, ¹⁴Kim *et al.* 2006, ¹⁵Vagionas *et al.* 2007(b), ¹⁶Setzer *et al.* 2006, ¹⁷Saroglou *et al.* 2006 e ¹⁸Huang *et al.* 2009

O timol apresentou uma menor área relativa (6,540%), quando comparados aos estudos de Dawidowicz, *et al.*, (2008) que relataram uma área relativa de 48,5% para timol. Já o carvacrol apresentou área relativa de 4,850%, enquanto que DAWIDOWICZ, *et al.*, (2008) identificaram 1,7% carvacrol extraídos do tomilho por SPME. Os resultados demonstram no presente estudo, que o carvacrol e o timol juntos apresentaram 11,39% da área relativa total identificada.

Outros componentes que apresentaram área relativa significativa são: borneol (4,615%), terpinen-4-ol (5,770%), p-cymen-8-ol (3,610%), ou seja, não são majoritários, porém possuem um percentual relevante.

LOZIENE, *et al.*, (2003), realizaram estudo com partes aéreas de *Thymus pulegioides* por hidrodestilação e os principais compostos encontrados foram: timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno e cariofileno. Em outra pesquisa, NICKAVAR, *et al.*, (2005), estudaram a composição química de *Thymus daenensis* através da hidrodestilação e encontraram o timol, p-cimeno e cariofoleno. Os compostos principais encontradas neste trabalho foram: p-cimeno (6,210%), timol (6,540%) e cariofileno (23,265%) estando de acordo com os autores citados.

VENSKUTONIS, *et al.*, 1996, LEE, *et al.*, 2005 e EL-NEKEETY, *et al.*, 2011, analisaram óleo essencial de *T. vulgaris* obtido por destilação, destilação a vapor sob pressão reduzida e hidrodestilação respectivamente e observaram que timol e carvacrol estavam sempre entre os componentes principais. Este fato corrobora com os resultados obtidos pelo presente trabalho.

5.2.1.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO, EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.

As duas técnicas extrativas foram utilizadas para comparar a composição química de *Thymus vulgaris*. Os métodos em questão são relativamente mais modernos desta maneira, precisam de aparatos experimentais mais especializados. Os resultados dessa comparação podem ser observados na tabela 13

Quando comparado à composição química obtida por extração com fluido supercrítico e aquele resultante da SPME no modo headspace, um dos principais aspectos a ser considerado é a proximidade de área relativa do timol (5,679% para SFE e 6,54% para SPME). Já quando analisado o carvacrol, a maior área relativa por SPME 4,85% contra 0,76% na SFE.

Tabela 13: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por extração com fluido supercrítico e micro extração em fase sólida.

N°	Componentes	TR	IK calculado	IK tabelado	ÁREA RELATIVA SFE (%)	RSD SFE (%)	ÁREA RELATIVA SPME (%)	RSD SPME (%)
1	α - thujene	6,127	927	926 ¹	0,972	6,889	0,920	1,537
2	α - pinene	6,4385	936	932 ¹	0,431	1,188	0,495	7,142
3	Camphene	6,8385	948	945 ¹	0,069	8,658	0,855	2,481
4	Sabinene	7,625	971	972 ¹	0,203	5,812	-	-
5	β -Pinene	7,774	975	973 ¹	5,102	4,71	0,135	5,238
6	1-octen-3-ol	8,100	984	984 ¹	0,189	8,319	0,570	2,481
7	3-octanone	8,125	985	986 ⁷	-	-	0,056	10,102
8	Phenol	8,185	987	980 ⁴	0,986	1,598	-	-
9	β - terpinene	8,275	989	988 ¹⁸	-	-	0,111	1,274
10	β - Myrcene	8,375	992	993 ¹	0,098	4,041	0,18	7,857
11	α - Phellandrene	8,725	1002	1001 ¹	-	-	0,191	0,74
12	Pentane 2,2,3,4-tetramethyl	8,792	1004	-	1,638	5,772	-	-
13	Decane	8,855	1006	1000 ⁴	3,834	1,85	-	-
14	3-Carene	9,152	1014	1010 ¹	0,142	2,773	0,143	2,481
15	α -Terpinene	9,258	1017	1014 ¹	-	-	0,121	0,587
16	P- Cymene	9,578	1027	1023 ¹	61,991	0,009	6,210	2,961
17	Limonene	9,651	1029	1028 ¹	0,543	7,978	-	-
18	β -Phellandrene	9,806	1032	1031 ³	0,181	2,176	0,041	3,449
19	Eucalyptol	9,808	1033	1035 ⁵	-	-	0,179	9,111
20	α - Toluene	9,921	1036	1043 ¹⁶	-	-	0,140	10,102
21	γ - Terpinene	10,896	1064	1059 ¹	3,867	0,718	0,300	9,428
22	Hexane, 2,2,5,5-tetramethyl	11,138	1071	-	0,078	10,102	-	-
23	sabinene hydrate	11,154	1071	1068 ¹	0,49	2,397	0,495	5,713
24	1-nonen-3-ol	11,513	1081	1079 ⁸	-	-	0,165	4,285
25	Trans-linaloloxide	11,858	1091	1095 ⁹	-	-	0,180	7,857
26	Undecane	12,056	1097	1100 ⁴	1,19	4,306	-	-
27	Thujone	12,183	1100	1107 ¹⁰	-	-	0,160	8,839
28	β - Linalool	12,219	1102	1102 ¹	0,538	2,198	5,960	2,373
29	Octane, 2,2-dimethyl	12,388	1107	-	0,027	7,443	-	-

30	2-p-Menthen-1-ol	12,933	1123	1120 ¹¹	-	-	0,165	4,285
31	Camphor	13,748	1148	1144 ¹	0,07	5,657	0,475	10,421
32	Isoborneol	14,15	1160	1159 ¹²	-	-	0,181	0,781
33	Borneol	14,485	1170	1165 ¹	0,184	4,285	4,615	8,121
34	Terpinen-4-ol	14,832	1181	1177 ¹	0,228	3,449	5,770	3,676
35	P-cymen-8-ol	15,073	1188	1187 ²	0,038	5,238	3,610	1,959
36	p-Menth-8-en-2-one, trans	15,450	1199	1203 ¹³	-	-	0,515	1,373
37	Dodecane	15,538	1202	1200 ⁴	2,006	3,143	-	-
38	Carveol	16,146	1222	1225 ¹⁴	-	-	0,191	0,371
39	Thymol methyl ether	16,629	1238	1237 ¹	0,08	7,443	0,870	3,251
40	Thymoquinone	17,107	1254	1252 ¹	0,075	5,783	1,425	7,443
41	Carvenone	17,350	1262	1258 ¹⁵	-	-	0,145	4,877
42	Tridecane	18,125	1287	1300 ⁴	1,616	0,975	-	-
43	Thymol	18,413	1297	1292 ¹	5,679	0,393	6,54	9,298
44	Nonane, 3,7-dimethyl	18,533	1301	-	0,103	3,822	-	-
45	Carvacrol	18,707	1307	1300 ¹	0,726	0,827	4,850	2,041
46	α -Cubebene	19,795	1346	1345 ⁶	-	-	2,265	0,312
47	Copaene	20,595	1374	1377 ¹	-	-	2,400	1,042
48	β -Bourbonene	20,967	1387	1386 ¹	-	-	2,400	2,357
49	β -Cubebene	21,102	1392	1388 ⁶	-	-	2,900	3,901
50	Caryophyllene	22,094	1429	1424 ²	0,530	3,928	23,265	4,042
51	α -Muurolene	23,990	1501	1500 ¹	-	-	2,600	2,176
52	γ -Cadinene	24,330	1515	1513 ¹	-	-	4,290	0,016
53	δ -Cadinene	24,598	1525	1523 ¹	-	-	4,915	1,583
54	Spathulenol	25,958	1580	1577 ¹	-	-	1,480	4,778
55	Caryophyllene oxide	26,021	1583	1581 ¹	-	-	3,295	0,644
56	Heptadecane	26,439	1600	1700 ⁴	0,119	1,664	-	-
57	Hexadecane	26,560	1605	1600 ⁴	-	-	0,345	2,050
58	γ -Eudesmol	27,164	1630	1627 ¹	-	-	0,690	6,149
59	Cadalene	28,356	1681	1684 ¹⁷	-	-	0,610	4,637

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹Hudaib *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* (2009), ³Leela *et al.* (2009), ⁴http://www.flavornet.org/f_kovats.html, ⁵Tian *et al.* 2012, ⁶Wang *et al.* 2012, ⁷Salido *et al.* 2003, ⁸Costa *et al.* 2008, ⁹Pérez *et al.* 2007, ¹⁰Vagionas *et al.* 2007(a), ¹¹Asuming *et al.* 2005, ¹²Baranauskiene *et al.* 2003, ¹³Chorianopoulos *et al.* 2004, ¹⁴Kim *et al.* 2006, ¹⁵Vagionas *et al.* 2007(b), ¹⁶Setzer *et al.* 2006, ¹⁷Saroglou *et al.* 2006 e ¹⁸Huang *et al.* 2009

Alguns componentes foram extraídos exclusivamente por um método extrativo, como é o caso sabineno, fenol, 2,2,3,4-tetrametil pentano, decano, limoneno, 2,2,5,5-tetrametil hexano, undecano, 2,2-dimetil octano, dodecano, tridecano, 3,7-dimetil nonano e heptadecano que foram identificados apenas pela SFE. Enquanto que 3-octanona, β -terpineno, α -felandreno, α -terpineno, eucaliptol, α -toluenol, 1-nonen-3-ol, trans óxido de linalol, Thujone, cis-2-p-Menthen-1-ol, Isoborneol, p-Menth-8-en-2-ona trans, carveol, carvenone, α -cubebene, copaeno, β -bourbonene, β -cubebene, α -muurolene, γ -cadineno, δ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno, hexadecano, γ -eudesmol e cadalene foram identificados apenas por SPME. Desta maneira, pode-se perceber que a SFE foi capaz de extrair maior quantidade de hidrocarbonetos quando comparado a SPME, enquanto que a SPME conseguiu extrair maior quantidade de sesquiterpenos. Estas diferenças qualitativas na composição podem ser justificadas em função da técnica de extração usada.

Outro componente importante a ser analisado é p-cimeno, através da SPME foi capaz de detectar 6,21% ao passo que a SFE conseguiu atingir uma área relativa de 61,991%. Já o

cariofileno obteve uma maior área relativa (23,265%) na SPME quando comparado a SFE (0,53%). Essas diferenças evidenciam que cada método extrativo tem afinidades por determinados tipos de moléculas. Outros componentes também tiveram maior área relativa através da SPME, como por exemplo, cânfora, borneol, terpen-4-ol, p-cimen-8-ol, β -linalol e canfeno. Enquanto que γ -terpineno e β -pineno tiveram melhores resultados por SFE.

No presente trabalho foi possível identificar 47 compostos por SPME, enquanto que DAWIDOWICZ, *et al.*, (2008) detectaram apenas 18 componentes pelo mesmo método extrativo. GARCÍA-RISCO, *et al.*, (2011) identificaram 17 compostos de *T. vulgaris* por SFE, a medida que este estudo revelou a presença de 33 compostos. Essa diferença deve estar atrelada a origem do material vegetal (local onde a planta foi adquirida). Além das diferenças operacionais utilizadas como, por exemplo, a fibra e temperatura de extração.

A comparação das duas técnicas de amostragem para análise do *Thymus vulgaris* identificou um total de 59 compostos. Foi possível identificar 94,024 % metabólitos para SFE e 98,050% metabólitos para SPME. Vários compostos químicos isolados por SFE e SPME de *T. vulgaris* tem atividade direta contra muitas espécies de microrganismos, como por exemplo, o α -Terpinene (DORMAN & DEANS 2000) e o carvone (OOSTERHAVEN, *et al.*, 1995).

A partir do exposto pode-se dizer que a SPME é capaz de extrair um maior número de componentes do tomilho quando comparado a SFE. Por outro lado através da SFE é uma técnica que produziu grande porcentual de área relativa de componentes importantes, como é o caso do p-cimeno. Desta maneira a escolha do método extrativo vai depender do objetivo em questão.

A presença dos compostos β -terpineno, α -Cubebene e Cidalene não foram mencionadas em outros trabalhos pesquisados, desta forma merecem destaque. Vale lembrar que estes componentes só foram detectados na SPME.

5.2.1.7. COMPARAÇÃO DE TODOS OS MÉTODOS

Hidrodestilação, extração com solvente, extração com dióxido de carbono supercrítico, e, finalmente, microextração em fase sólida foram utilizados para a preparação de amostras para comparação das diferentes técnicas. Além da análise do padrão do óleo essencial de tomilho obtido da sigma. No total, 65 substâncias foram identificadas pelos diferentes métodos como pode ser visto na tabela 14. No anexo B são mostrados a estrutura química, fórmula e peso molecular e número CAS (Chemical Abstract Service).

Tabela 14: Identificação por GC-MS de constituintes voláteis em *Thymus vulgaris* obtidos por HD, SE, SFE, SPME e o padrão da sigma.

N°	Componentes	TR	IK cal	IK tab	ÁREA PADRÃO (%)	RSD PADRÃO (%)	ÁREA HD (%)	RSD HD (%)	ÁREA SE (%)	RSD SE (%)	ÁREA SFE (%)	RSD SFE (%)	ÁREA SPME (%)	RSD SPME (%)
01	α - thujene	6,136	927	926 ¹	0,305	6,955	-	-	-	-	0,972	6,889	0,920	1,537
02	α - pinene	6,409	935	932 ¹	0,680	2,08	-	-	0,075	9,428	0,431	1,188	0,495	7,142
03	Camphene	6,859	948	945 ¹	0,225	3,143	-	-	-	-	0,069	8,658	0,855	2,481
04	Sabinene	7,746	974	972 ¹	0,085	8,319	-	-	-	-	0,203	5,812	-	-
05	β -Pinene	7,774	975	973 ¹	-	-	-	-	-	-	5,102	4,710	0,135	5,238
06	1-octen-3-ol	8,088	984	984 ¹	0,230	6,149	1,085	10,776	1,865	1,137	0,189	8,319	0,570	2,481
07	3-octanone	8,125	985	986 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	0,056	10,102
08	Phenol	8,185	987	980 ⁴	-	-	-	-	-	-	0,986	1,598	-	-
09	β - terpinene	8,275	989	988 ¹⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	0,111	1,274
10	β - Myrcene	8,412	993	993 ¹	1,48	1,911	-	-	3,260	0,868	0,098	4,041	0,180	7,857
11	α - Phellandrene	8,78	1004	1001 ¹	0,21	6,734	0,075	9,428	0,570	2,481	-	-	0,191	0,740
12	Pentane 2,2,3,4- tetramethyl	8,792	1004	-	-	-	-	-	-	-	1,638	5,772	-	-
13	Decane	8,761	1003	1000 ⁴	-	-	0,760	9,304	-	-	3,834	1,850	-	-
14	3-Carene	9,115	1013	1010 ¹	0,068	5,238	-	-	-	-	0,142	2,773	0,143	2,481
15	α -Terpinene	9,262	1018	1014 ¹	1,68	1,684	-	-	-	-	-	-	0,121	0,587
16	P- Cymene	9,594	1027	1023 ¹	7,765	8,105	0,54	0,025	16,540	0,171	61,991	0,009	6,210	2,961
17	Limonene	9,707	1030	1028 ¹	-	-	-	-	0,720	7,857	0,543	7,978	-	-
18	β -Phellandrene	9,806	1033	1031 ³	-	-	-	-	-	-	0,181	2,176	0,041	3,449
19	Eucalyptol	9,929	1037	1035 ⁵	-	-	0,085	8,319	0,335	6,332	-	-	0,179	9,111
20	Alpha Toluenol	9,921	1036	1043 ¹⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	0,140	10,102
21	γ - Terpinene	10,842	1062	1059 ¹	5,535	2,427	0,229	7,443	4,615	1,379	3,867	0,718	0,300	9,428
22	Hexane, 2,2,5,5- tetramethyl	11,138	1071	-	-	-	-	-	-	-	0,078	10,10	-	-
23	Sabinene hydrate	11,152	1071	1068 ¹	0,138	2,571	0,270	0,032	0,67	10,554	0,490	2,397	0,495	5,713
24	1-nonen-3-ol	11,513	1081	1079 ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	0,165	4,285
25	Trans linaloloxide	11,858	1091	1095 ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	0,180	7,857
26	Undecane	12,056	1097	1100 ⁴	-	-	-	-	-	-	1,190	4,306	-	-

27	Thujone	12,183	1100	1107 ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	8,839
28	β- Linalool	12,253	1103	1102 ¹	1,100	7,714	7,515	2,917	3,450	2,050	0,538	2,198	5,960	2,373
29	Octane, 2,2-dimethyl	12,388	1107	-	-	-	-	-	-	-	0,027	7,443	-	-
30	2-p-Menthen-1-ol;	13,007	1125	1120 ¹¹	-	-	0,145	6,149	0,065	10,879	-	-	0,165	4,285
31	Camphor	13,746	1148	1144 ¹	-	-	0,165	4,285	0,075	9,428	0,07	5,657	0,475	10,421
32	Isoborneol	14,15	1160	1159 ¹²	-	-	-	-	-	-	-	-	0,181	0,781
33	Borneol	14,467	1170	1165 ¹	0,960	1,473	4,905	3,316	2,960	0,478	0,184	4,285	4,615	8,121
34	Terpinen-4-ol	14,825	1181	1177 ¹	1,055	0,670	5,710	2,229	0,525	9,428	0,228	3,449	5,770	3,676
35	P-cymel-8-ol	15,098	1189	1187 ²	0,043	8,319	1,075	3,289	0,160	8,839	0,038	5,238	3,610	1,959
36	α-terpineol	15,288	1195	1191 ¹	0,153	6,955	0,79	4,285	0,270	10,476	-	-	-	-
37	p-Menth-8-en-2-one, trans	15,45	1199	1203 ¹³	-	-	-	-	-	-	-	-	0,515	1,373
38	Dodecane	15,538	1202	1200 ⁴	-	-	-	-	-	-	2,006	3,143	-	-
39	Carveol	16,146	1222	1225 ¹⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	0,191	0,371
40	Thymol methyl ether	16,674	1240	1237 ¹	-	-	-	-	0,079	10,741	0,080	7,443	0,870	3,251
41	Thymoquinone	17,133	1255	1252 ¹	-	-	0,155	4,562	0,130	10,879	0,075	5,783	1,425	7,443
42	trans-Geraniol	17,294	1260	1358 ⁶	-	-	0,950	1,489	0,325	2,176	-	-	-	-
43	Carvenone	17,35	1262	1258 ¹⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	0,145	4,877
44	Tridecane	18,125	1287	1300 ⁴	-	-	-	-	-	-	1,616	0,975	-	-
45	Thymol	18,419	1297	1292 ¹	0,530	5,337	27,655	7,594	27,875	3,830	5,679	0,393	6,540	9,298
46	Nonane, 3,7-dimethyl	18,533	1301	-	-	-	-	-	-	-	0,103	3,822	-	-
47	Carvacrol	18,691	1306	1300 ¹	56,850	2,587	10,095	4,973	4,715	5,549	0,726	0,827	4,850	2,041
48	α- Cubebene	19,795	1346	1345 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	2,265	0,312
49	Eugenol	20,317	1364	1362 ¹⁹	-	-	0,205	3,449	0,050	0,027	-	-	-	-
50	Copaene	20,658	1376	1377 ¹	-	-	-	-	0,735	2,886	-	-	2,400	1,042
51	β-Bourbonene	20,967	1387	1386 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	2,400	2,357
52	β-Cubebene	21,102	1392	1388 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	2,900	3,901
53	Eugenol methyl ether	21,576	1404	1405 ⁶	-	-	0,200	3,536	0,565	3,755	-	-	-	-
54	Caryophyllene	22,073	1424	1424 ²	5,195	1,497	0,050	0,020	2,815	3,768	0,530	3,928	23,265	4,042
55	γ- Muurolene	23,471	1480	1477 ¹	-	-	-	-	0,123	8,658	-	-	-	-
56	α-Muurolene	23,99	1501	1500 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	2,600	2,176
57	γ- Cadinene	24,330	1515	1513 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	4,290	0,016
58	δ -Cadinene	24,593	1525	1523 ¹	-	-	-	-	0,168	10,554	-	-	4,915	1,583
59	Sphulenol	25,939	1579	1577 ¹	-	-	0,115	6,149	0,185	3,822	-	-	1,480	4,778

60	Caryophyllene oxide	2619,0 43	1584	1581 ¹	-	-	0,038	9,428	0,940	4,513	-	-	3,295	0,644
61	Heptadecane	26,439	1600	1700 ⁴	-	-	-	-	-	-	0,119	1,664	-	-
62	Hexadecane	26,56	1605	1600 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	0,345	2,05
63	γ - Eudesmol	27,164	1630	1627 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	0,690	6,149
64	α -Cadinol	27,801	1657	1653 ¹	-	-	0,28	0,036	0,380	3,722	-	-	-	-
65	Cadalene	28,356	1681	1684 ¹⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	0,610	4,637

TR= tempo de retenção, IK calculado com uma coluna não polar Rtx-5MS; IK tabelado obtido das seguintes literaturas: ¹Hudaib *et al.* (2002), ²Souza Filho *et al.* (2009), ³Leela *et al.* (2009), ⁴ http://www.flavornet.org/f_kovats.html, ⁵Tian *et al.* 2012, ⁶Wang *et al.* 2012, ⁷Salido *et al.* 2003, ⁸Costa *et al.* 2008, ⁹Pérez *et al.* 2007, ¹⁰Vagionas *et al.* 2007(a), ¹¹Asuming *et al.* 2005, ¹²Baranauskiene *et al.* 2003, ¹³Chorianopoulos *et al.* 2004, ¹⁴Kim *et al.* 2006, ¹⁵Vagionas *et al.* 2007(b), ¹⁶Setzer *et al.* 2006, ¹⁷Saroglou *et al.* 2006, ¹⁸Huang *et al.* 2009 e ¹⁹Rather *et al.* 2012.

O primeiro aspecto a ser analisado são os compostos que estão presentes em todas as frações analisadas, neste caso temos o 1-octen-3-ol, p-cimeno, γ -terpineno, sabineno hidratado, β -linalol, borneol, terpinen-4-ol, p-cymel-8-ol, timol, carvacrol e cariofileno. Vale ressaltar que estes compostos estavam entre os componentes majoritários da maioria dos autores pesquisados.

Um dos componentes alvos do *T.vulgaris*, o timol, teve maior área relativa pelo método de SE (27,875%), seguido por HD (27,655%), SPME (6,50%), SFE (5,679%) e padrão (0,530%). Já o carvacrol apresentou melhor resultado na análise do padrão (56,850%), seguido por HD (10,095%), SPME (4,850%), SE (4,715%) e SFE (0,726%).

A SPME foi a mais eficaz para identificação dos sesquiterpenos, uma vez que conseguiu extrair uma gama maior destes componentes quando comparados aos outros métodos. Já os monoterpenos de baixo peso molecular (tempo de retenção de até 10 min) foram bem identificados pelos métodos de SFE e SPME, porém os outros métodos também apresentaram resultados satisfatórios.

Analisando os métodos HD, SE, SFE e SPME pode-se observar que foram identificados 24, 30, 33, 47 compostos voláteis em *Thymus vulgaris*, correspondendo a 63,091, 75,239, 94,024 e 98,050% respectivamente do total das áreas de picos. Desta maneira, a fração não identificada para o tomilho foi menor com a microextração em fase sólida e a extração com fluido supercrítico em comparação com a hidrodestilação e extração com solvente.

A repetibilidade dos quatro métodos foi determinada por meio de cálculo, os desvios relativos padrões (RSD) que também são listados na tabela 14. Os valores do RSD variam 0,20 - 10,776% para HD, 0,27 - 10,879% para SE, 0,009- 10,102% para SFE e 0,016-10,421% para SPME. Sendo os melhores desvios obtidos por SFE, em seguida por SPME, HD e por último SE.

Quando analisado o padrão do óleo essencial de tomilho, foi possível identificar 20 componentes. Quando avaliado o RSD, os valores encontrados variam de 0,670-8,319%. Outro fator a ser observado é a composição química obtida do óleo essencial padrão que, em geral, foi mais similar com ao obtido por HD e SE.

Outro aspecto a ser considerado é a comparação dos parâmetros utilizados nos diferentes métodos de extração. Os resultados dessas comparações são resumidos na tabela 15.

Tabela 15: Comparação dos parâmetros de extração para hidrodestilação (HD), extração com solvente (SE), extração com fluido supercrítico (SFE) e microextração em fase sólida (SPME).

Parâmetros	HD	SE	SFE	SPME
Quantidade de matéria-prima (g)	30	3	3	0,001-0,1
Tempo de extração (min)	120	240	60	30
Necessidade de evaporação do solvente	Sim	Sim	Não	Não
Transformação de compostos sensíveis	Alto	Média	Baixa	Baixa
Solvente orgânico utilizado para extração	Não	Sim	Não	Não

Através da observação da tabela 15 pode-se afirmar que grande quantidade de amostra (30g) é requerida para técnica convencional de hidrodestilação, enquanto que as técnicas SFE, SPME e SE necessitam relativamente de uma quantidade menor de amostra. Porém é notório

que a SPME é a técnica que utiliza a menor quantidade de amostra, podendo ser mais viável quando se trata de muitas análises.

As quatro técnicas de amostragem HD, SE, SFE e SPME foram analisadas em relação ao tempo necessário para extração dos compostos presentes em *Thymus vulgaris*. A SPME necessitou de um menor tempo de análise, 30min em seguida a SFE com 60min. As técnicas convencionais (SE e HD) apresentaram um maior tempo necessário para extração, aumentando a possibilidade de transformação de compostos voláteis. Além disso, os métodos convencionais necessitam de solventes neste caso o extrato se encontra contaminado, perdendo seu valor e necessitando ser evaporados.

Durante a hidrodestilação apenas os compostos voláteis das plantas aromáticas podem ser extraídos. Também dentro dessas investigações, substâncias como, por exemplo, p-cimeno, γ -terpineno, sabineno hidratado e cariofileno foram encontrados em porções claramente menores na hidrodestilação do que nos outros métodos, o motivo é a transformação das substâncias que ocorre durante processo, muito provavelmente devido a elevada temperatura utilizada. Por outro lado, as substâncias como o carvacrol, timol, borneol e terpen-4-ol são encontrados em maiores quantidades nos extratos hidrodestilados. No entanto, como a hidrodestilação é também muito demorado (2 h), o uso deste método não é muito viável.

Entre a extração com solvente e a extração com fluido supercrítico, as diferenças relativas à composição são reconhecíveis. A SFE apresentou claramente maior conteúdo relativo de p-cimeno, em contrapartida a SE teve melhores resultados na extração do carvacrol, isto acontece porque o p-cimeno é o precursor biológico de carvacrol (ULTEE, et al., 2002).

Comparando-se o dispêndio de tempo para as diferentes extrações, a extração com solvente não representa uma alternativa viável. SFE ainda oferece um pequeno tempo de vantagem em comparação com a SE, uma vez que os extratos de não precisam ser evaporados. Pela não necessidade da evaporação, a perda de componentes voláteis pode ser diminuída. Entre os dois métodos de preparo de amostra descritos acima, SFE parece ser o mais adequado para a extração dos compostos do tomilho.

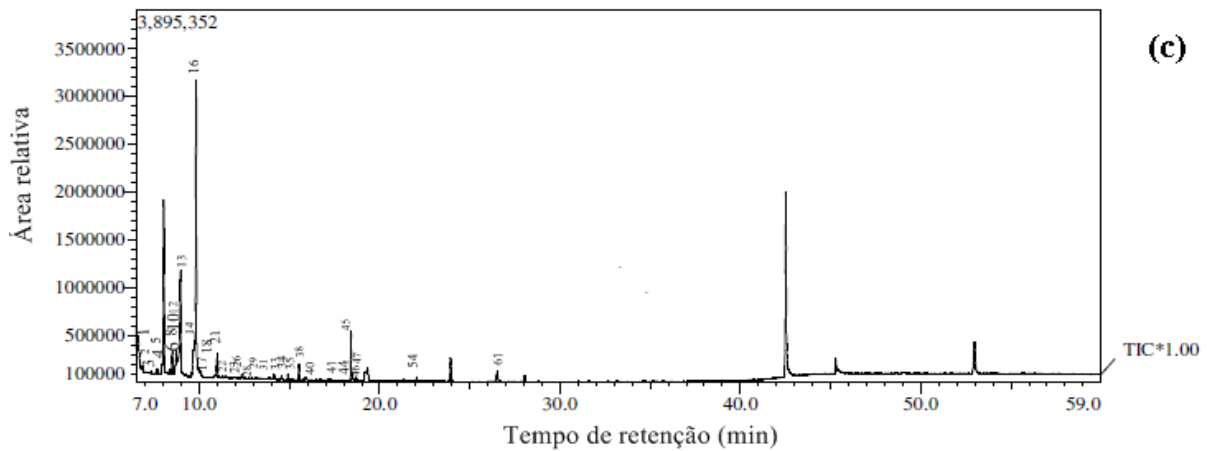
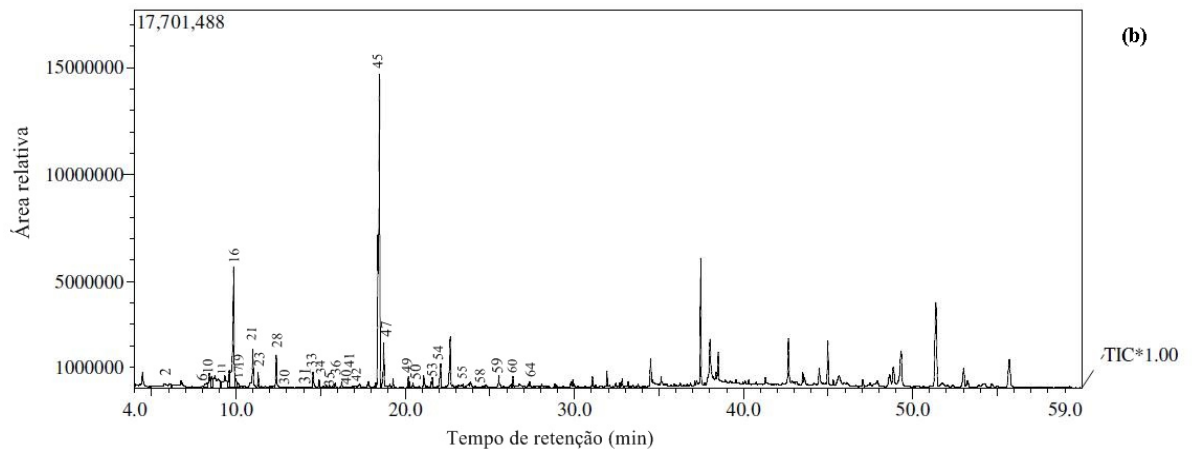
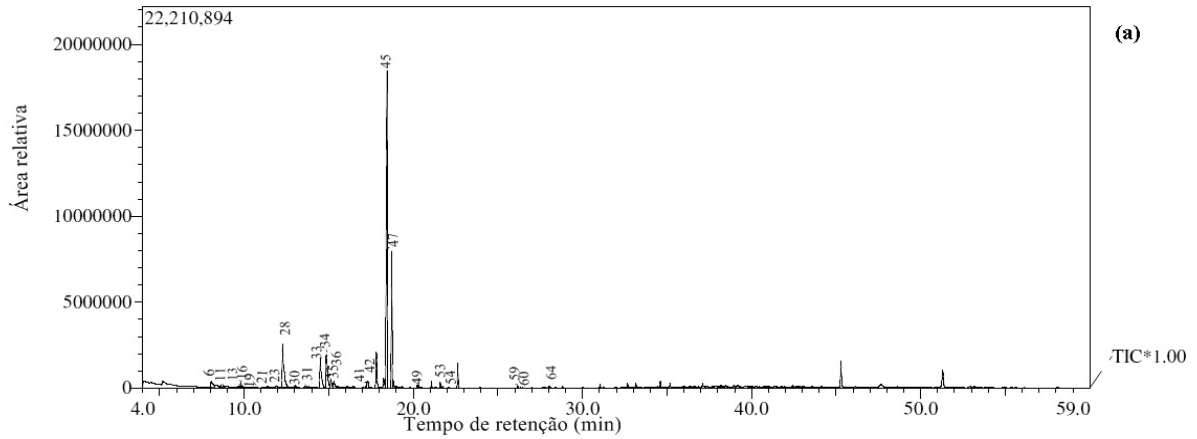
Como um procedimento de extração mais estável com despesas de tempo ainda menor, a microextração fase sólida mostrou algumas vantagens para a extração de compostos de *T. vulgaris*. Tal como acontece com hidrodestilação, as substâncias não voláteis não são detectadas com SPME.

Por outro lado, SPME e SFE possuem qualidades semelhantes em relação a não utilização de solvente. Um dos principais componentes alvos, o timol, pode ser encontrado em quantidade semelhante nesses dois métodos, embora as suas proporções sejam diferentes em comparação com os outros métodos de extração. No entanto, a maior vantagem do método SPME é o alto grau de automação, o trabalho manual é apenas para a pesagem das amostras e isto também leva a uma rotina de segurança e reprodutibilidade elevadas.

RICHTER & SCHELLENBERG, (2007) e DAWIDOWICZ, et al., (2008) também realizaram pesquisas em relação a composição química de plantas aromáticas tendo como objetivo a comparação de métodos extrativos. E os estudos dos autores citados foram similares aos do presente trabalho, ou seja, teve SPME como a técnica mais vantajosa, pois necessita de pouca quantidade de amostra e curto período de tempo para realização das análises. Isso tudo atrelado a melhor capacidade de identificação dos compostos presentes nas plantas.

As diferenças de composição química obtida pelos diferentes métodos extrativos podem ser observadas na figura 24, onde são mostrados os cromatogramas de ions total (TIC) com os respectivos picos identificados de acordo com a tabela 14. Na figura 24 também pode ser visto o TIC do padrão de óleo essencial de tomilho, obtido da sigma.

Vale ressaltar que a SPME é a melhor técnica para a identificação de compostos voláteis, porém não gera um extrato para que possa ser aplicado. Desta maneira, se o objetivo for aplicações em geral deve-se ter como foco a hidrodestilação, extração com solvente ou extração com fluido supercrítico.



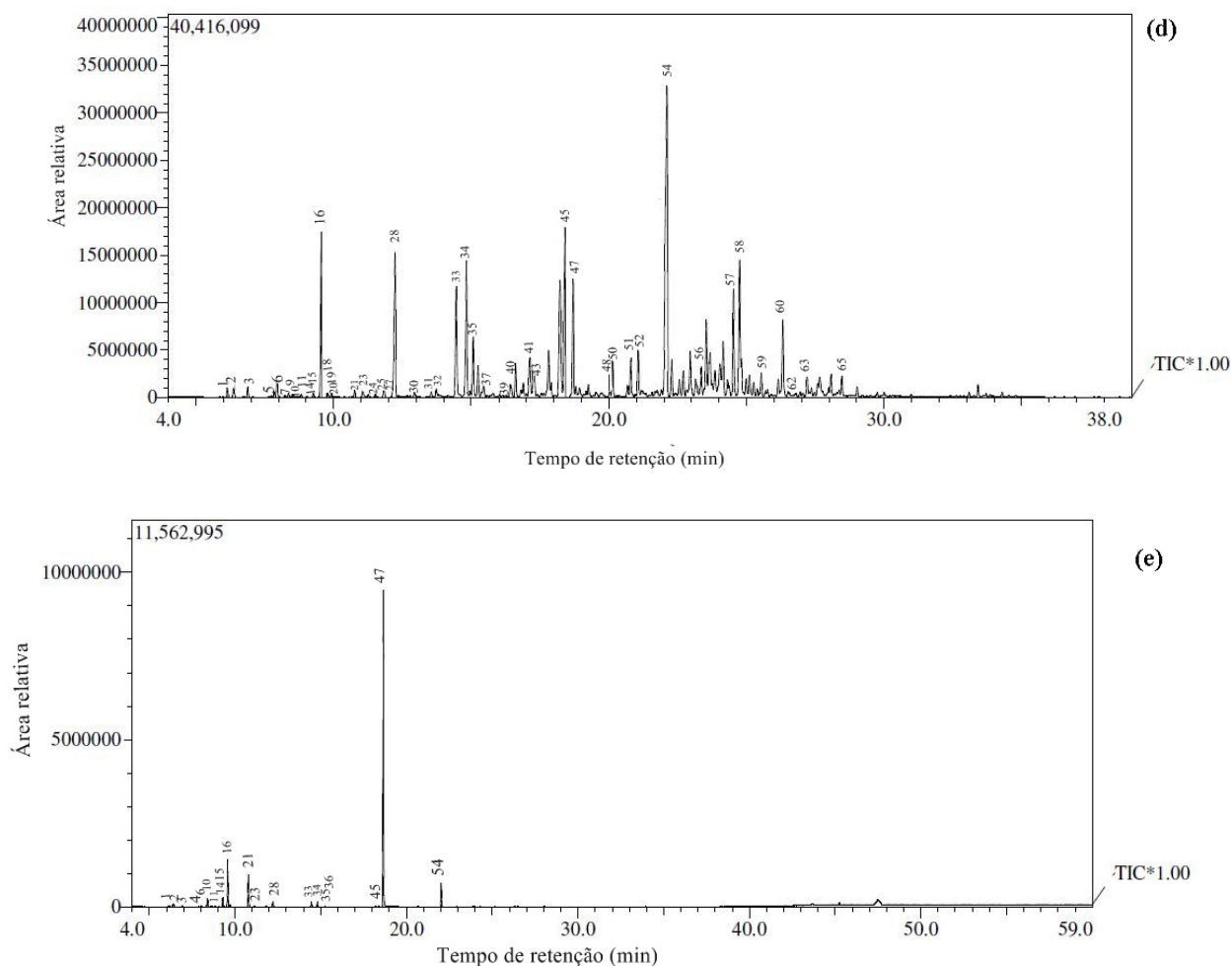


Figura 24: Cromatograma de íon total dos compostos de *Thymus vulgaris* obtido por HD (a), SE (b), SFE (c), SPME (d) e o padrão do óleo essencial de tomilho (e).

As técnicas hidrodestilação, extração com solvente, a extração com fluido supercrítico, e microextração fase sólida foram utilizadas para análise da composição química de *T. vulgaris*, a última técnica revelou-se mais adequada para a pesquisa rápida de um número elevado de compostos ativos. E é, portanto, bastante útil para a triagem de grandes quantidades de amostras. Para a determinação do teor de óleo essencial e para a preparação de extratos de óleo essencial, a hidrodestilação é inevitável uma vez que o "óleo essencial" está definido na farmacopéias acordo com a utilização deste processo.

Na extração por solvente e SFE compostos não voláteis foram co-extraídos. Entre estes métodos SFE foi o que detectou maior quantidade de compostos, mas foi pouco específico para os componentes alvos timol e carvacrol.

A microextração em fase sólida pode ser executada de forma mais automática. Assim, o trabalho manual é reduzido, isso proporciona não só condições muito rápidas de análise, mas também leva segurança a rotina do processo, que por sua vez resulta em desvios padrão muito pequenos.

Analisando as particularidades das técnicas de extração estudadas e os princípios de cada uma delas foi possível realizar uma comparação das vantagens e desvantagens, segundo as literaturas consultadas e os resultados obtidos, como pode ser observado na tabela 16.

Tabela 16: Vantagens e desvantagens dos métodos extrativos utilizados nesse estudo.

Método Extrativo	Vantagens	Desvantagens
Hidrodestilação	<ul style="list-style-type: none">*Utilização de equipamentos mais baratos;*Técnica simples;*Utiliza a água como agente de separação, que torna o método mais viável;	<ul style="list-style-type: none">*Rendimento baixo;*Precisa de maior quantidade de amostra;*Precisa de mais tempo para realização;*Pode ocorrer degradação térmica e hidrólise de alguns componentes químicos voláteis devido a elevadas temperaturas
Extração com Solvente	<ul style="list-style-type: none">*Utilização de equipamentos mais baratos;*Método simples/ padrão;*Não depende da matriz;*Apresenta maior rendimento, porém não seletivo;	<ul style="list-style-type: none">*Precisa de maior quantidade de amostra e de solventes;*Precisa de mais tempo para realização;*Uso de determinado solvente que podem ocasionar impacto ambiental;*Pode ocorrer degradação térmica e a contaminação dos componentes químicos voláteis devido ao uso do solvente;*Os extratos precisam ser evaporados.
Extração com Fluido Supercrítico	<ul style="list-style-type: none">*Rápido e apresenta bom rendimento;*Uso de solventes praticamente atóxico nas condições de uso e com fácil remoção, como é o caso do dióxido de carbono ;*A separação de materiais é feita a baixas temperaturas, o que é extremamente importante quando se extraem substâncias naturais;*Método seletivo evitando a necessidade de etapas adicionais de purificação.	<ul style="list-style-type: none">*Necessidade de caros instrumentos especializados, principalmente no investimento inicial;*Problemas com segurança, devido ao uso de elevada pressão;*Para extração de compostos polares é necessário adição de modificadores.
Micro extração em Fase Sólida	<ul style="list-style-type: none">*Método seguro, simples, seletivo e com baixo custo;*São realizados com maior velocidade;*Obtenção de uma análise mais pura pois elimina o uso de solvente;*Necessidade de pouca quantidade de amostra;	<ul style="list-style-type: none">*O analito necessita ser volátil e termicamente estável para ser desorvido e identificado por CG;*Fragilidade das fibras utilizadas para extração.

5.2.1.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens das glândulas das folhas de tomilho obtidas por microscopia eletrônica de varredura, antes e depois do processo de extração são mostradas na figura 25. A Fig. 25a é uma micrografia da glândula não tratada (isto é, antes a extração). Fig. 25b e c mostram as imagens de MEV das glândulas de tomilho que haviam sido submetidos a extração com solvente e extração com fluido supercrítico respectivamente para obtenção de óleo essencial.

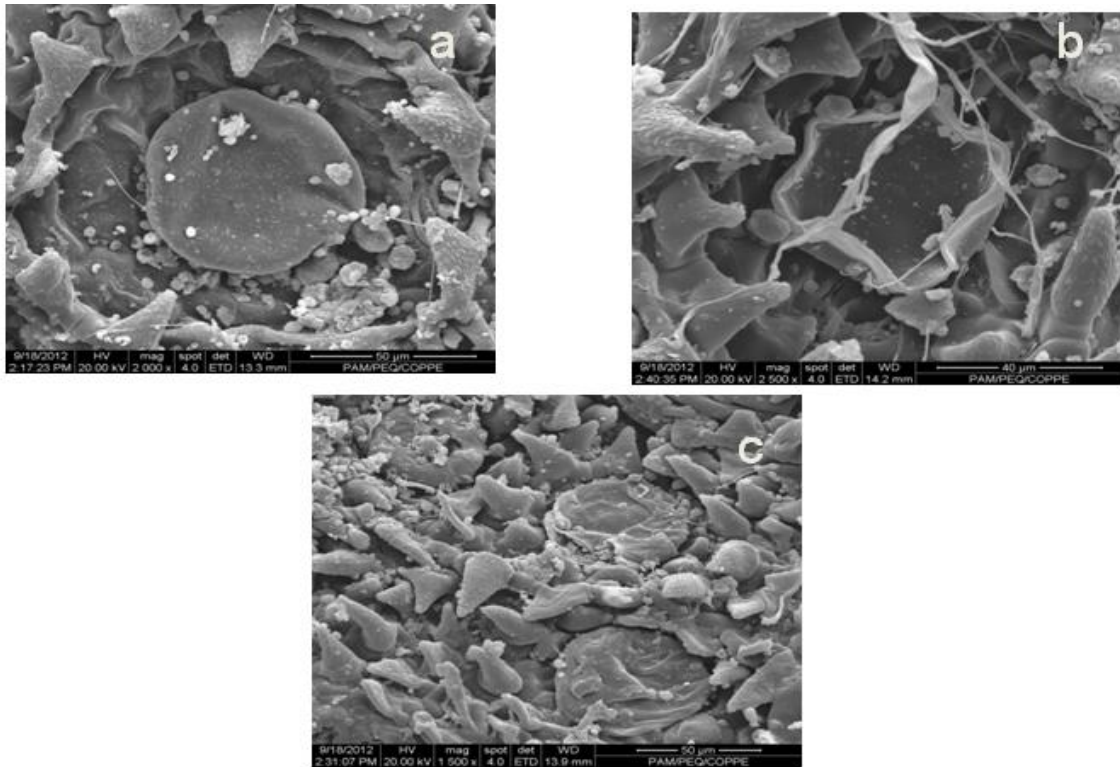


Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura das glândulas de folhas de tomilho: (a) sem tratamento, (b) após SE, (c) após SFE.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para os métodos de extração SE e SFE com o objetivo de verificar a influência do solvente etanol (SE) na estrutura da glândula secretora do óleo essencial e a despressurização nestas estruturas na SFE.

As glândulas presentes nas folhas de tomilho desidratado (não tratado) apresentaram-se com aspecto arredondado e cheio (Figura 25 a). Diferentemente, as glândulas presentes nas folhas de tomilho utilizadas na SE apresentaram extravassamento do óleo essencial com aspecto de vazia, como pode ser visto na figura 25 b. Este fenômeno pode estar relacionado com alta taxa de transferência de calor, devido ao uso de elevadas temperaturas.

As glândulas que se submetem a SFE foram rompidas pela elevada pressão utilizada (160 bar) e posterior despressurização.

5.CONCLUSÃO

Em sua totalidade, os métodos de extrações mostraram-se eficientes para a separação e caracterização do *Thymus vulgaris*, com a obtenção de 65 compostos. Em um contexto geral, as composições químicas obtidas pelos métodos utilizados foram semelhantes tendo sempre como componentes principais 1-octen-3-ol, p-cimeno, γ -terpineno, sabineno hidratado, β -linalol, borneol, terpinen-4-ol, p-cymel-8-ol, timol, carvacrol e cariofileno.

A hidrodestilação extraiu, ao total, 24 compostos. Além disso, foi uma das técnicas mais eficazes para extração de timol e carvacrol, compostos estes principais responsáveis pela atividade biológica de *Thymus vulgaris*. Vale ressaltar que a HD foi responsável pelo maior percentual de Carvacrol. Por outro lado, essa técnica apresenta como desvantagem a perda dos compostos mais voláteis devido ao uso de elevadas temperaturas. A grande quantidade de amostra utilizada para análise (30g) e o elevado período de tempo (2h) também são desvantagens da técnica.

Já a extração com solvente identificou 33 componentes, sendo este método responsável pela maior concentração de timol detectada. A área relativa do timol foi de 27,875% para duas horas de extração com etanol. Em contrapartida, o óleo essencial obtido por extração com solvente é considerado contaminado porque apresenta impurezas, como por exemplo, resinas, pigmentos, entre outros. O tempo envolvido na análise (4h) é um ponto negativo para o método extrativo.

A otimização da extração com fluído supercrítico foi realizada e verificou-se que a pressão mais elevada (160bar) foi capaz de extrair uma maior quantidade de componentes. Também foi observado que o tempo de 60min é ideal para extração dos principais compostos de *T.vulgaris*, não sendo necessário, desta forma, prolongar a extração até 120 min. O extrato obtido com CO₂ a altas pressões em condições otimizadas apresentou como característica evidente um grande percentual de p-cimeno (61,991%) e timol (5,679%) e carvacrol (0,726%) em percentuais mais amenos. O baixo percentual de carvacrol atrelado à elevada concentração de p-cimeno está relacionado ao fato de o p-cimeno ser o precursor biológico do carvacrol. No total foram identificados 33 componentes, entre eles um considerável número de hidrocarbonetos.

A investigação dos parâmetros utilizados na microextração em fase sólida foi realizada com sucesso. A fibra de PDMS/DVB foi selecionada como ideal, pois extraiu uma maior quantidade de compostos e uma maior concentração dos componentes alvos. O perfil de temperatura e o tempo de extração foram determinados, sendo ideal 80°C e 30min respectivamente. A SPME em condição otimizada, apresentou um alto número de componentes extraídos, um total de 47. Esta técnica extrativa apresentou em sua composição química um grande número de sesquiterpenos. O cariofileno (23,265%) foi o composto presente em maior proporção entre os sesquiterpenos e os demais compostos. Além disso, a SPME foi a única técnica extrativa capaz de identificar compostos não mencionados em outros trabalhos pesquisados de *Thymus vulgaris*, como foi o caso do β -terpineno, α -Cubebene e Cadalene.

A partir disso, pode-se verificar que entre os métodos convencionais (SE e HD) a extração com solvente apresentou melhor resultado. Porém, a hidrodestilação não pode ser desconsiderada, uma vez que a obtenção de óleo essencial por essa técnica é padrão na farmacopéia. Cabe ressaltar que os resultados da composição química das extrações convencionais foram as que mais se assemelharam a composição química obtida pelo padrão do óleo essencial de tomilho, da Sigma.

Comparando-se o SFE e SE, é notório que a SFE é mais adequada, uma vez que extrai uma maior quantidade de compostos e não possui influência do solvente no extrato. Além disso, a SFE apresentou os menores desvios, sendo considerado de boa repetibilidade.

Em contrapartida a microextração em fase sólida, se destacou na caracterização de *T.vulgaris*, pois conseguiu extrair uma maior quantidade de compostos, com menor quantidade de tempo e amostra. No entanto, a maior vantagem do método de SPME é o alto grau de automação. O trabalho manual é apenas para a pesagem das amostras e isto também leva a uma rotina de segurança e reprodutibilidade elevadas.

Por fim, através de todas as pesquisas realizadas podemos concluir que a SPME é técnica mais eficaz para extrair uma maior quantidade de compostos de *T. vulgaris*. Por outro lado a hidrodestilação consegue extrair uma grande quantidade de timol e carvacrol, componentes biologicamente ativos. Desta forma, a escolha do método extrativo a ser utilizado dependerá do objetivo do trabalho em questão e a finalidade do uso do óleo essencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M. J; ANSUATEGUI, M; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc Online Ed.*, v.vii, p. 116-145, 2007.
- ADAM, K; SIVROPOULOU, A; KOKKINI, S.; LANARAS, Th; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal Agricultural Food Chemistry* v.46, p. 1739-1745, 1998.
- ALMEIDA, L.F.D; CAVALCANTI, Y.W; VIANA, W.P; LIMA, E. O. *Screening* da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida Albicans*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v.14, n.4, p.51-56, 2011.
- ÁLVARES, C.A; SVIDZINSKI, T.IE; CONSOLARO, M.E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- Aquino, F. W. B.; Amorin, A. G. N.; Prata, L. F.; Nascimento, R. F.; Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.24 ,n. 1, p.32-38, 2004.
- ARABHOSSEINI, A; HUISMAN, W; VAN BOXTEL, A; MULLER, J. Long-term effects of drying conditions on the essential oil and color of tarragon during storage. *Journal food Engeneer*, v. 79, p. 561-566, 2007.
- ARTHUR C.L; PAWLISZYN J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using silica optical fibers. *Anal.Chem.*, v.62, p.2145–2148, 1990.
- ASUMING, W.A.; BEAUCHAMP, P.S.; DESCALZO, J.T.; DEV, B.C.; DEV, V.; FROST, S.; MA, C.W., Essential oil composition of four *Lomatium Raf.* species and their chemotaxonomy, *Biochem. Syst. Ecol.*, v.33, p.17-26, 2005
- BAGAMBOULA, C.F; UYTTENDAELE, M; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, v. 21, p.33–42,2004.
- 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.
- BARANAUSKIEN, R. P; VENSKUTONIS R; GALDIKAS, A; SENULIEN, D; SETKUS, A. Testing of microencapsulated flavours by electronic nose and SPME–GC. *Food Chemistry*, v. 92,p.45–54, 2005.
- BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P.R.; VISKELIS, P.; DAMBRAUSKIENE, E., Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*), *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.7751-7758, 2003.

BARANAUSKIENÉ, V; VENSKUTONIS, P.R; GALDIKAS, A; SENULIENE, D; SETKUS, A. Testing of microencapsulated flavours by electronic nose and SPME–GC. **Food Chemistry**, v. 92, p.45–54, 2005.

BARBARO, N. R.; STELATO, M. M. Atividade anti-*candida* de óleos essenciais de plantas utilizadas na culinária. **Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC Campinas**. 2009.

BENYELLES, B; ALLALI, H; DIB, M.EA; DJABOU, N; TABTI, B; COSTA, J. Essential oil from *Rhaponticum acaule* L. roots: Comparative study using HS-SPME/GC/GC–MS and hydrodistillation techniques. **Journal of Saudi Chemical Society** 2011 article impress.

BETTS, T. J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gás chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography**, v. 936, p.33-46, 2001.

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

BLAJOLI, A.F.P. **Fibras para SPME (microextração em fase sólida) recobertas com novos ormosil SOL-GEL**. 2008, 79f. Dissertação (mestrado de Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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

BIZZO, H.R; HOVELL, AM. C; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009

BLANCO, E; MORALES, R; PELLIN, R.. Harvesting and trade of *Thymus* in Spain. Medicinal plant trade in Europe: conservation and supply. In: **Proceedings of the First International Symposium on the Conservation of Medicinal Plants in Trade in Europe**, Brussel, Belgium, p. 50–54, 1998.

BLANK A.F; FONTES S.M; OLIVEIRA A.S; MENDONÇA M.C; SILVA-MANN R; ARRIGONIBLANK M.F. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em melissa. **Horticultura Brasileira**, v. 3, p. 780-784, 2005.

BLUM C; KUBECZKA, KH; BECKER, K. Supercritical fluid chromatography–mass spectrometry of thyme 1 extracts (*Thymus vulgaris* L.). **Journal of Chromatography A**, v.773, p.377–380, 1997.

BOZIN, B., MIMICA-DUKIC N., SIMIN N., ANACKOV G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.54, n.5, p.1822-1828, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária portaria 971, de 03 de maio de 2006. Aprova política Nacional de práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da republica federativa do

Brasil, poder executivo, Brasília, DF, 4 março, 2006. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BROWN, A. J.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. R. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 307-313, 2007.

BRUNETTI, L. Deacidification of olive oil by supercritical carbon dioxide. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 66, n.2, p. 209-217, 1989.

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

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais: condimentares e aromáticas**. Guairá: Agropecuária, 1995.194 p.

CASTRO, L.O., CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais: condimentares e aromáticas**. Guairá: Agropecuária, p.194, 1995.

CHAI, M. & PAWLISZYN, J. Analysis of environmental air samples by solid phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Environ. Sci. Technol.** v.29, p.693-701, 1995.

CHARLES, D.J; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil (*Ocimum spp.*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, n.3, p.458-62, 1990.

CHESTER, T.L; PINKINSON, J.D; RAYNIE, D.E. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. **Anal Chem**, v.70, n. 12, p.301R-319R, 1998.

CHINOU, I.B; ROUSSIS, V; PERDETZOGLOU, D; LOUKIS, A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. **Planta Medica**, v.62, n.4, p.377-379, 1996.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G.-J.; HAROUTOUNIAN, S.A., Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens, **J. Agric. Food Chem.**, n.52, p.8261-8267, 2004.

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

CORSO, M. P. **Estudo da extração de óleo de sementes de gergelim (*Sesamun indicum L.*) empregando os solventes dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado**. 2008, 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.

CORTICCHIATO, M; TOMI, F; BERNARDINI, A.F; CASANOVA, J. Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba barona* Lois. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p.915-932, 1998.

COSENTINO, S; TUBEROSO, C.I.G; PISANO, B; SATTA, M; MASCIA, V; ARZEDI, E; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.130–135, 1999.

COSTA, P; GROSSO, C; GONCALVES, S; ANDRADE, P.B; VALENTAO, P; BERNARDO-GIL, M.G; ROMANO, A. Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Her. **Food Chemistry**, n.135, p.112–121, 2012.

Costa, R.; De Fina, M.R.; Valentino, M.R.; Rustaiyan, A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., An investigation on the volatile composition of some *Artemisia* species from Iran, **Flavour Fragr. J.**, v.24, p.75-82, 2008.

COSTA, T.R; FERNANDES, O.F.L; SANTOS, S.C; OLIVEIRA, C.M.A; LIÃO, L.M.; FERRI, P.H; PAULA, J.R; FERREIRA, H.D; SALES, B.H.N; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.111-117, 2000.

DAFERERA, D.J; ZIOGAS, B.N; POLISSIOU, M.G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plant and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2576-2581, 2000.

DAVIDSON, P.M. & PARISH, M.E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology** v.43, p.148–155, 1989.

DAWIDOWICZ, A.L; RADO, E; WIANOWSKA, D; MARDAROWICZ, M; GAWDZIK, J. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, v.76, p. 878–884, 2008.

DELAMARE, A.P; PISTORELLO, I.T.M; ARTICO, L; SERAFINI, L.A; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brasil. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 603–608, 2007.

DELAQUIS, P.J; STANICH, K; GIRARD, B; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology** v.74, p.101–109, 2002.

DEMYTTENAERE, J.C.R; MORINA, R.M; KIMPE, N.D; SANDRA, P. Use of headspace solid-phase, microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by fusarium species. **Journal of Chromatography A**, v.1027, n.1-2, p.147-154, 2004.

DIAZ-MAROTO, M.C; PEREZ-COELHO, M.S; CABEZUDO, M.D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices comparison with simultaneous distillation. **Journal of Chromatography A**, v.947, p.23-29, 2002.

- DIAZ-MAROTO, M.C; PÉREZ-COELHO, M.S; GONZALES-VINAS, M.A; CABEZUDO, M.D. Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). . **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.51, n.5, p. 1265–1269, 2003.
- DONEANU, C. ANITESCU, G.. Supercritical carbon dioxide extraction of *Angelica archangelica* L. root oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v.12, p. 59–67, 1998.
- DÓREA, H. S; GAUJA, A; NAVICKIENE, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e Cinéticos **SCIENTIA PLENA**, v. 4, n.7, p. 1-7, 2008.
- DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
- DOYMAZ, I. Drying of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and selection of a suitable thin-layer drying model. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.35, p.458–465, 2011.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytoterapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.
- EL-NEKEETY, A.A; MOHAMED, S.R; HATHOUT, A.S; HASSAN, N.S ; ALY, S.E; ABDEL-WAHHAB, M.A. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. **Toxicon**, v. 57, p.984–991, 2011.
- FARAG, R.S; DAW, Z.Y; HEWEDI, F.M; EL-BAROLY, G.S.A. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 665-667, 1989.
- FERNANDES, E.S; PASSOS, G.F; MEDEIROS, R; DA CUNHA, F.M; FERREIRA, J; CAMPOS, M.M; PIANOWSKI, L.F; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, n.3, p. 228-236, 2007.
- FERREIRA, M.S.C.; FONTELES, M.C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.70, n.4, p.94-97 1989.
- FONSECA, D. B ; Coelho, G. L. V . Determinação do coeficiente de atividade na diluição infinita através da micro-extração em fase sólida (SPME). **Química Nova**, v. 30, p. 1606-1608, 2007.
- FORMISIANO, C; SENATORE, F; BRUNO, M; BELLONE, G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Phlomis ferruginea* Ten. (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. **Flavour Fragr. J.**, v.21, p.848–851, 2006.
- FREITAS L. S; OLIVEIRA J.V; DARIVA C; JACQUES R. A; CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. **J. Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2558-2564, 2008.

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

GARCÍA-RISCO, M.R; VICENTE, G; REGLERO, G; FORNARI, T. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. **J. of Supercritical Fluids**, v.55, p. 949–954, 2011.

GARG, S. C; SIDDIQUI, N. Antifungal activity of some essential oil isolates. **Pharmazie**, v.47, p.467-468, 1992,

GHELARDINI, C; GALEOTTI, N; DI CESARE MANNELLI, L; MAZZANTI, G; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **II Farmaco**, v.56, p.387-389, 2001.

GILFILLAN, G. D.; SULLIVAN, D. J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D. C.; GOW, N. A. R. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v. 144, p. 829-838, 1998

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

GOLMAKANI, M. T. & REZAEI, R. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. **Food Chemistry**, v.109, p.925–930, 2008.

GRANGER, R. & PASSET, J. THYMUS VULGARIS SPONTANE DE FRANCE: RACES CHIMIQUES ET CHEMOTAXONOMIE. **Phytochemistry**, v.12, p. 1683-1691, 1973.

GROSSMAN, L., **Óleos Essenciais na culinária, cosmética e saúde**, Editora Optionline, São Paulo, 301 p. 2005.

GUILLÉN, M.D.; MANZANOS, M.J. Study of the composition of the different parts of a Spanish Thymes *vulgaris* L. Plant. **Food Chemistry**, v.63, n.3, p.373-383, 1998.

GUO, F.Q; HUANG, L.F; ZHOU, S.Y; ZHANG, T.M; LIANG, Y.Z. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes* medicinal plants by headspace solidphase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v.570, p.73-78, 2006.

HAMDAN, S; DAOOD, H. G; TOTH-MARKUS, M; ILLÉS, V. Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v.44, p.25-30, 2008.

HAMMER K.A, CARSON C.F, RILEY T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p.985-990, 1999.

HAMROUNI-SELLAMI, I., BETTAIEB REBEY, I., SRITI, J., ZOHRA RAHALI, F., LIMAM, F., MARZOUK, B. Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its effects on content, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. **Food Bioprocess Technology**, v.5, n.8, p. 2978-2989, 2011.

HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS, R.G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied microbiology**, v.24, p.269-275, 1997.

HUANG, B.; QIN, L.; CHU, Q.; ZHANG, Q.; GAO, L.; ZHENG, H., Comparison of headspace SPME with hydrodistillation and SFE for analysis of the volatile components of the roots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*, **Chromatographia**, v.69, n.5-6, p.489-496, 2009.

HUDAIB, M., SPERONI, E., PIETRA, A.M.D., CAVRINI, V. CG/EM evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p. 691–700, 2002.

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

ILLÉS, V; SZALAI, O; THEN, M; DAOOD, H; PERNECZKI, S. Extraction of hiprose fruit by supercritical CO₂ and propane. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 10, p. 209-218, 1997.

JALALI-HERAVI, M; MANI-VARNOSFADERANI, A; P. JAHROMI, E; MAHMOODI, M.M; TAHERINIA, D. Classification of anti-HIV compounds using counterpropagation artificial neural networks and decision trees. **SAR and QSAR in Environmental Research**. v. 22, p.639–660, 2011.

JANZANTTI, N.S., FRANCO M.R.B, LANÇAS F.M. Identificação de Compostos Voláteis de Maçãs (*Malus Domestica*) Cultivar Fuji por Cromatografia Gasosa — Espectrometria de Massas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n. 2, p. 164-171, 2000.

JORDÁN, M.J; MARTÍNEZ, R.M.; GOODNER, K.L; BALDWIN, E.A; SOTOMAYOR, J.A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, v. 24, p.253–263, 2006.

KALEMBA, D; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry** v.10, p.813–829, 2003.

KHAJEH, M; YAMINI, Y; SEFIDKON, F; BAHRAMIFAR, N. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**, v. 86, p. 587–591, 2004.

KIM, J. M.; MARSHALL, MR.; CORNELL, J.A.; PRESTON III, J.F.; WEI, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against salmonella typhimurium in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1364-1368, 1995.

KIM, M.R.; ABD EL-ATY, A.M.; KIM, I.S.; SHIM, J.H., Determination of volatile flavor components in danggui cultivars by solvent free injection and hydrodistillation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis, **J. Chromatogr. A**, v.1116, p.259-264, 2006.

KOSHIMA, F.A.T.; MING, L.C; MARQUES, M.O.M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus*, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.112-116, 2006.

KUBOTA, T. **Contribuição á química dos compostos voláteis dos frutos do nordeste: Hancornia speciosa gomes**. 2007, 143f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe. 2007.

LACAZ, C.S; PORTO, E; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

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

LANÇAS, F.M. EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO: QUO VADIS?, **Revista Analytica**, v.2, p. 30-37, 2002.

LEE, SJ; UMANO, K; SHIBAMOTO, T; LEE, KG; Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, p. 131–137, 2005.

LEELA, N.K.; VIPIN, T.M.; SHAFEEKH, K.M; PRIYANKA, V.; REMA, J. Chemical composition of essential oils from aerial parts of *Cinnamomum malabattrum* (Burman f.) Bercht & Presl., **Flavor Fragr. J.**, v. 24, p.13-16, 2009.

LEMOES, G.S; SANTOS, J.S; SANTOS, M.L.P. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. **Quim. Nova**, v. 33, n.8, p.1682-1685, 2010

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R.C.; D'SOUSA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W.; WANG, P.; PAN, X.; WAUGH, M.; HEITMAN, J. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal Development and Virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 746-785, 2000.

LOCK DE UGAZ, O. **Investigación Fitoquímica. Métodos em el estudio de productos naturales**. Pontífica Universidad Católica del Perú: Fondo editorial, 1994, p.290.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 153-193, 2000.

LOU, X., JANSSEN, H. C., CRAMERS, C. A. "Quantitative Aspects of Directly Coupled Supercritical Fluid Extraction - Capillary Gas Chromatography with a Conventional Split/Splitless Injector as Interface" **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 16, p.425, 1993.

LOZIENE, K; VAICIUNIENE, J; VENSKUTONIS. P. R. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p. 249–259, 2003.

MARENTIS, R. T. **Steps to development a commercial carbon dioxide processing plant, Supercritical Fluid Extraction and Chromatography – Techniques and Applications**, Am. Chem. Soc. Symposium Series, U.S.A., 1988.

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

MASTELIC, J; JERKOVIC, I; BLAZEVIC, I; POLJAK-BLAZI, M; BOROVIĆ, S; IVANCIC-BACE, I; SMRECK, I.V; ZARKOVIC, N; BRCIC-KOSTIC, K; VIKIC-TOPIC, D; MULLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 3989–3996, 2008.

MATISOVÁ, E; MEDVED'OVÁ, M; VRANIAKOVÁ, J; SIMON, P. Optimisation of solid-phase microextraction of volatiles. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.159-164, 2002.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol. 5, pg. 185-200, 1998.

MEJRI, J.; ABDERRABBA, M.; MEJRI, M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. **Industrial Crops and Products**, v.32, n.1, p.671–673, 2010.

MERCK, **Ficha de informação de segurança de produtos químicos, etanol absoluto**. Merck, p.6, 2006.

MEWES, S; KRUNGER, V; PANK, F. Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.55, p.1303–1311, 2008.

MILLEZI, A.F, CAIXETA, D.S; ROSSONI, D.F.; CARDOSO, M.G.; PICCOLI, R.H. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.32, n.1, p. 167-172, 2012.

MISHRA A.K; DUBEY N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1101-1105, 1977.

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

NASCIMENTO I.B; INNECCO R; MATOS S.H; BORGES N.S.S; MARCO C.A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim santo (*Andropogon sp.*). **Revista Caatinga**, v. 19, p. 123-127, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F; LOCATELLI J; FREITAS P.C; Silva, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.21, n.4, p.247–256, 2000.

NEWALL, C. A., ANDERSON, L. A., PHILLIPSON, J. D., **Plantas Mediciniais - Guia para profissional de saúde**. Ribeirão Preto-SP: Premier, 2002. 308p.

NICKAVAR B, MOJAB F, DOLAT-ABADI R. Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, v.90, p.609-611, 2005.

NUNES, X.P; MAIA, G.L. A; ALMEIDA, J.R.G.S; PEREIRA, F.O; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Revista Brasileira farmacognosia*, v.16, p. 642-644, 2006.

OLOJEDE, F., ENGELHART, G., WALLNOFER, P. R. & ADEGOKE, G. O. Decrease of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by spices. *World Journal Microbiology Biotechnology*. v.9, p.605–606, 1993.

OOSTERHAVEN, K., POOLMAN, B., SMID, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. *Industrial Crops and Products*, v. 4, p.23–31, 1995.

O'SULLIVAN, J. M.; JENKINSON, H. F.; CANNON, R. D. *Adhesion of Candida albicans to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal*. *Microbiology*, v. 146, p. 41-48, 2000.

OUTTARA, B; SIMARD, R.E; PIETTE, G.; BÉGIN, A; HOLLEY, R.A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p. 139–148, 2000.

OZCAN, M. & CHALCHAT, J.C. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.*, v.30, p.68-73, 2004.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, n.2, p.323-333, 2007.

PAWLISZYN, J. Theory of solid phase microextraction. *Journal of Chromatography Science*, v. 38, p.270-277, 2000.

PELLATI, F; BENVENUTI, S; YOSHIZAKI, F; BERTELLI, D; ROSSI, M.C. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. *Journal of Chromatography A*, v.1087, n.1-2, p.265, 273, 2005.

PEREIRA, F.V; CARDEAL, Z.L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. *Química Nova*, v.39, p. 5979-5990, 2005.

PEREIRA, H.M.G; MARQUES, M.A.S; CARDOSO, J.N; NETO, F.R.A. Análise de glicocorticosteróides por GC-EM: uma nova abordagem de derivação para o controle de dopagem no esporte. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6B, p.1096-1102, 2002

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10, 2004

PÉREZ, R.A.; NAVARRO, T.; DE LORENZO, C., HS-SPME analysis of the volatile compounds from spices as a source of flavour in 'Campo Real' table olive preparations, **Flavour Fragr. J**, v.22, p.265-273, 2007.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: natures diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p.808-811, 2006.

PORTE, A., GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. **Boletim CEPPA**. V. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001.

PORTELA, M. B.; SOUZA, I. P.; COSTA, E. M.; HAGLER, A. N.; SOARES, R. M.; SANTOS, A. L. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p. 5925-5927, 2004.

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

POZZATTI, P; LORETO, E.S; LOPES, P.G.M.. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v.53, p.12-15, 2010.

QUEIROZ, M.E.C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluídos biológicos. **Scientia Chromatography**, v.1, n.3, p.11-19, 2009.

RATHER, M.A; DAR, B. A; DAR, M.Y; WANI, B.A; SHAH,W.A; BHAT, B.A; GANAI, B.A; BHAT, K.A; ANAND, R; QURISHI, M.A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. **Phytomedicine**, v.19, 1185– 1190, 2012.

REIS, M. S., MARIOT, A., STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004. p. 43-74.

RICHTER, J. & SCHELLENBERG, I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. **Anal Bioanal Chem**, v.387, p.2207–2217, 2007.

RIU-AUMATELL, V; VARGAS, L; VICHI, S; GUADAYOL, VE. LOPEZ-TAMAMES, J.M; BUXADERAS, S . Characterisation of volatile composition of white salsify (*Tragopogon porrifolius* L.) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and

simultaneous distillation–extraction (SDE) coupled to GC–MS. **Food Chemistry**, v.129, p.557–564, 2011.

ROBBERS, J.E; SPEEDIE, M.K; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

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

SALIDO, S.; ALTAREJOS, J.; NOGUERAS, M.; SÁNCHEZ, A.; LUQUE, P., Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from Southern Spain, **J. Essent. Oil Res.**, v.15, n.1, p.10-14, 2003.

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

SANTOS, S.C., COSTA, W.F., BATISTA, F., SANTOS, L.R., FERRI, P.H., FERREIRA, H. D. SERAPHIN, J.C. Variações Sazonais dos teores de taninos em casca de espécie de barbatimão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 4, 2006.

SANTOS, T.G; REBELO, R.A; DALMARCO, E.M; GUEDES, A; GASPER, A.L; CRUZ, A.B; SCHMIT, AP; CRUZ, R.C.B; STEINDEL, M; NUNES, R.K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v.35, n.3, p.477-481, 2012.

SAROGLOU, V.; DORIZA, N.; KYPRIOTAKIS, Z.; SKAL TSA, H.D., Analysis of the essential oil composition of eight Anthemis species from Greece, **J. Chromatogr. A**, v.1104, p.313-322, 2006

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

SCHNEIDER, G. M. Physicochemical aspects of fluid extraction. **Fluid Phase Equil.**, v.10, p.141-157, 1983.

SETZER, W.N.; NOLETTO, J.A.; LAWTON, R.O., Chemical composition of the floral essential oil of *Randia matudae* from Monteverde, Costa Rica, **Flavour Fragr. J.**, v.21, p.244-246, 2006.

SHEN, S; SHA, Y; DENG, C; FU, D; CHEN, J; ZUANG, X. Comparison of solid-phase microextraction, supercritical fluid extraction, steam distillation and solvent extraction techniques for analysis of volatile constituents in *fructus amomi*. **Journal of AOAC international**, v.88, n.2, p.418-423, 2005.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L. B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

SILVA F; SANTOS R.H.S; DINIZ E.R; BARBOSA L.C.A; CASALI V.W.D; LIMA R.R. Teor e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em dois horários e duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, p. 33-38, 2003.

SILVA, T.B; RANGEL, E.T. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico do tomilho (*Thymus vulgaris* L.) in vitro. **Revista Eletrônica de Farmácia** v.7, n.2, p.48 – 58, 2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al* (org.) **Farmacognosia – Da Planta ao Medicamento**. 5ª ED. VER. AMPL. primeira reimpressão- Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004.

SOARES, V. B; COELHO, G. L. V. Safety study of an experimental apparatus for extraction with supercritical CO₂. **Brazilian Journal of Chemical Engineering (Impresso)**, v. 29, p. 677-682, 2012.

SOUZA FILHO, A.P.S; VASCONCELOS, M.A.M; ZOGHBI, M.G.B; CUNHA, R.L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**. v. 39, n. 2, p. 389-396, 2009.

SOUZA, T.M., MORREIRA, R.R.D., PIETRO, R. C.R.L., ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade asséptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (MART) Collive e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.1, p.71-75, 2007.

SPADACIO, C.; BARROS, N. F. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública**, v.42, n.1, p.7-13, 2008.

TEISSEDRE, P. & WATERHOUSE, A. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3801–3805, 2000.

TELES, S; JOSÉ ALBERTO PEREIRA, JA ; SANTOSA, C.H.B; MENEZESA, R.V; MALHEIROB, R; LUCHESE, A.M; SILVA, F. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Industrial Crops and Products**, n.37, p. 247– 252, 2012.

TEMELLI, F.; SALDAÑA, M.D.A.; MOQUIN, P.H.L.; MEI SUN, M. Supercritical Fluid Extraction of Specialty Oils.. In.: **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**, Edited by MARTÍNEZ, J.L. Boca Raton: CRC Press. 2007, p.91.

TENA, M.T; VARCÁCEL, M; HIDALGO, J; UBERA, L. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from Rosemary. Comparison with liquid solvent sonication. **Analytical Chemistry**, v.69, p.521-526, 1997.

TIAN, J; HUANG, B; LUO, X; ZENG, H; BAN, X; HE, J; WANG, Y. 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.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. São Paulo: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R. *et al.*, (org) **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

ULTEE, A., BENNINK, M.H.J., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1561–1568, 2002.

VAGIONAS, K.; GRAIKOU, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; CHINOU, I., Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tansania, **Food Chem.**, , v.103, p.319-324, 2007(b).

VAGIONAS, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; GRAIKOU, K.; GORTZI, O.; CHINOU, I., Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania, **Food Chem.**, , v.105, p.1711-1717, 2007(a).

VALENTE, A.L.P. & AUGUSTO, F. MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA. **QUÍMICA NOVA**, v.23, n.4, p. 523- 530, 2000.

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

VENSKUTONIS,R.; POLL, L.; LARSEN, M. Influence of Drying and Irradiation on the Composition of Volatile Compounds of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Flavour and Fragrance Journal**, v.11, p.123 – 128, 1996.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; ANDREI, C. C.; Plantas inseticidas. In: Simões CMO et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. 2004 p. 751-766.

VIUDA-MARTOS, M; RUIZ-NAVAJASa, Y; FÉRNANDEZ-LÓPEZ, J; PÉREZ-ÁLVAREZ, JA. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **Int. J. Food Sci. Technol**; v.43, p.526–531, 2008.

VOIRIN B., BRUN N., BAYET C. Effects of day length on the monoterpene composition of leaves of *M. x piperita*. **Phytochemistry**. v.29, p.749-755, 1990.

WANG, H; LIU, Y; WEI, S, YAN, Z.. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v.36, p. 229–237, 2012.

WATANABE, C.H; NOSSE, T.M; GARCIA, C.A; PINHEIRO, P.N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.76-86, 2006.

WENQIANG, G; SHUFEN, L; RUIXIANG, Y; SHAOKUN, T; CAN, Q .Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v.101, p. 1558–1564, 2007.

www.flavornet.org/f_kovats.html, acesso em 15.dez.2012.

Y. YAMINI, F. SEFIDKON, S.M. POURMORTAZAVI .Comparison of essential oil of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, p. 345–348, 2002.

YAMAGUCHI, K. Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic Krill. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.5, p.904-907, 1986.

ZHENG, G.Q.; KENNY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryphyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v.55, n.7, p.999-1003, 1992.

ANEXOS

ANEXO A

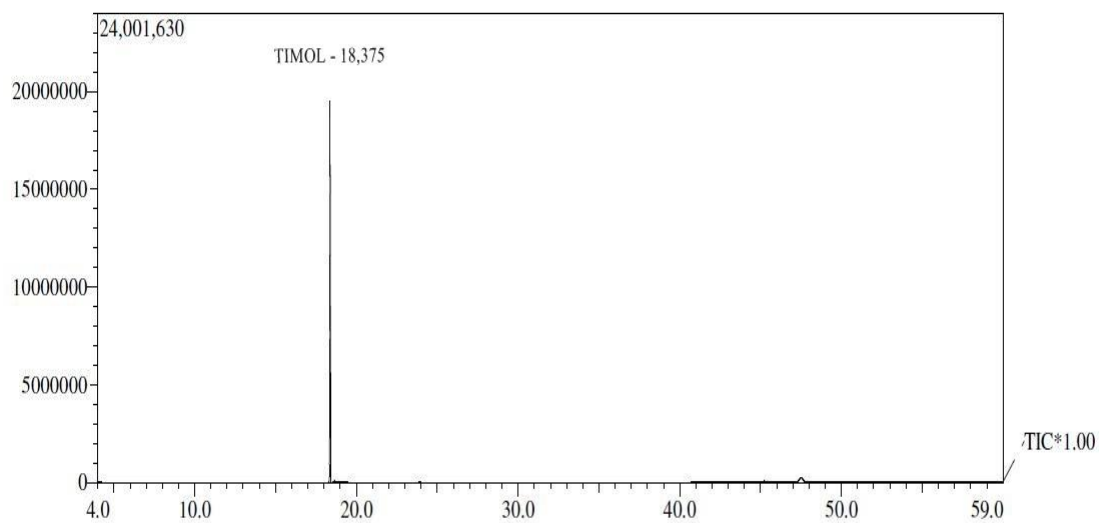


Figura A1: Cromatograma do timol com seu respectivo tempo de retenção

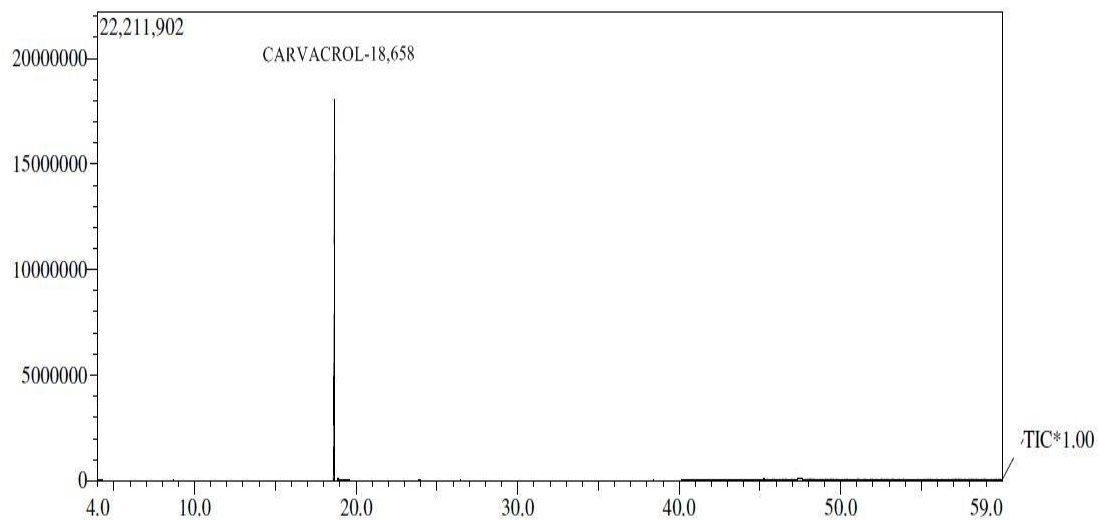
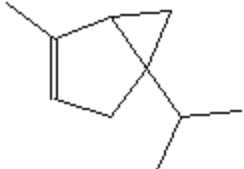
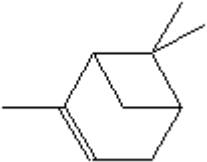
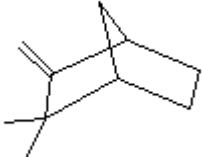
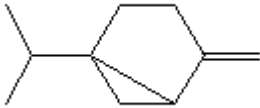
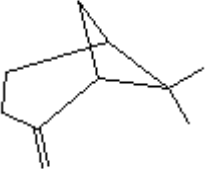
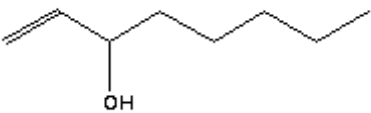
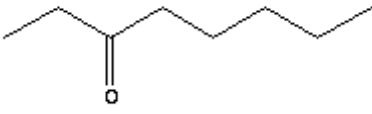
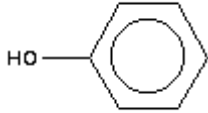
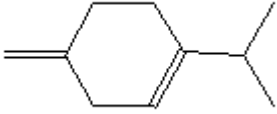
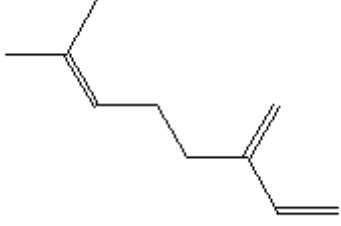
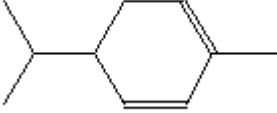
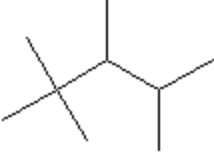
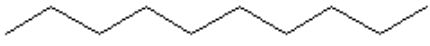
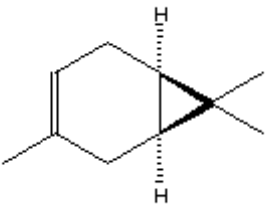
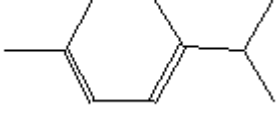
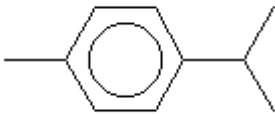
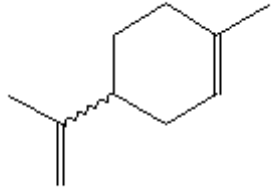
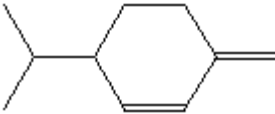
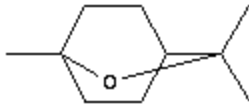
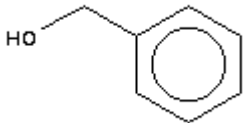
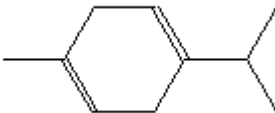
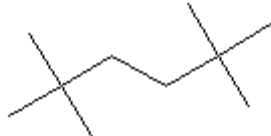
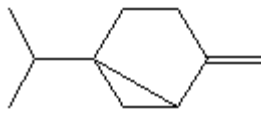
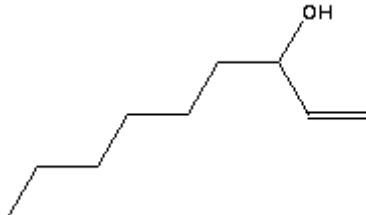


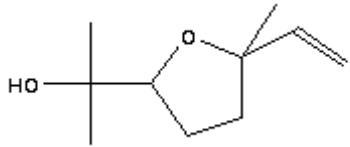

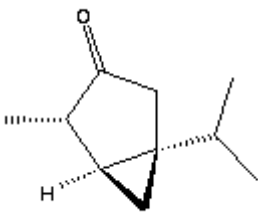
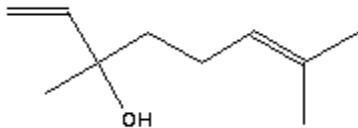
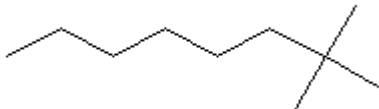
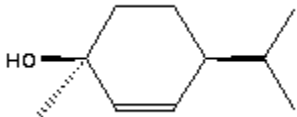
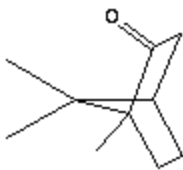
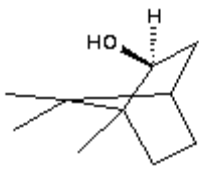
Figura A2: Cromatograma do carvacrol com seu respectivo tempo de retenção

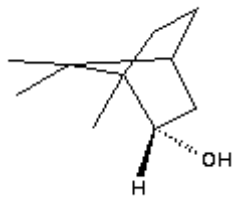
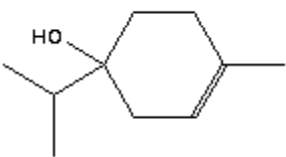
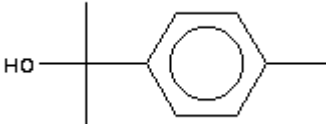
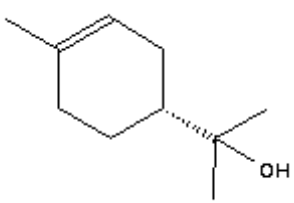
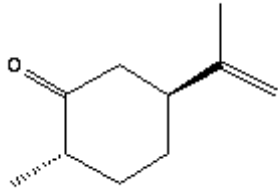

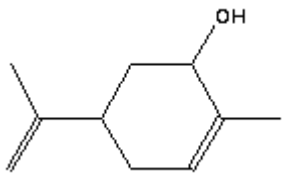
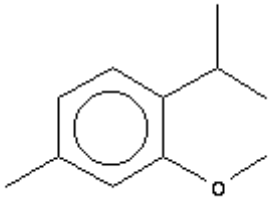
ANEXO B – COMPOSTOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.)

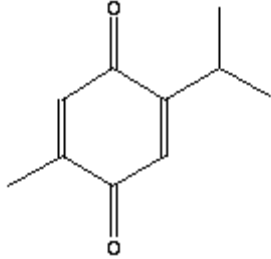
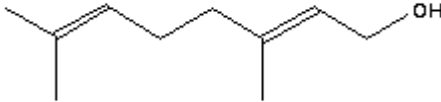
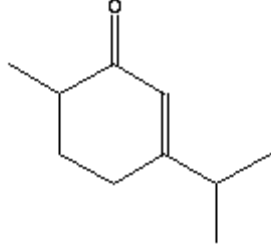

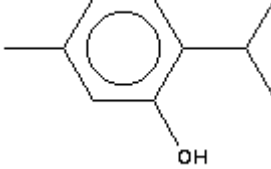

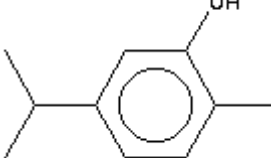
Compostos	Estrutura Química	Fórmula	Peso Molecular	Número CAS
α - thujene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	2867-05-2
α - pinene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	80-56-8
Camphene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	79-92-5
Sabinene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	3387-41-5
β -Pinene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	127-91-3
1-octen-3-ol		$C_8H_{16}O$	128.2120	3391-86-4

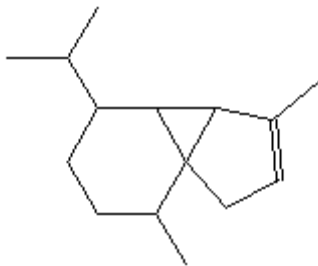
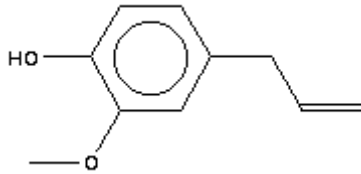
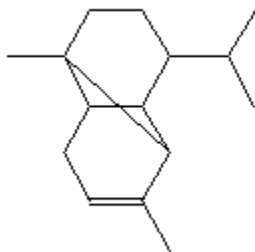
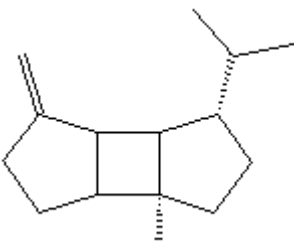
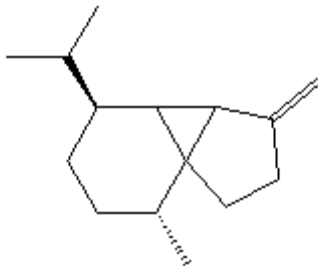
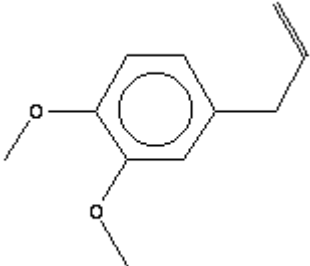
3-octanone		$C_8H_{16}O$	128.2120	106-68-3
Phenol		C_6H_6O	94.1112	108-95-2
β - terpinene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	99-84-3
β - Myrcene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	123-35-3
α - Phellandrene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	99-83-2
Pentane 2,2,3,4- tetramethyl		C_9H_{20}	128.2551	1186-53-4
Decane		$C_{10}H_{22}$	142.2817	124-18-5
3-Carene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	13466-78-9
α -Terpinene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	99-86-5

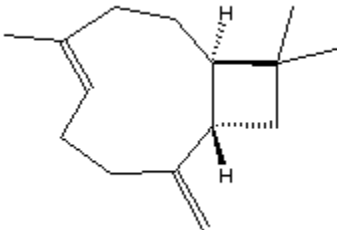
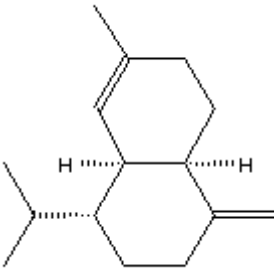
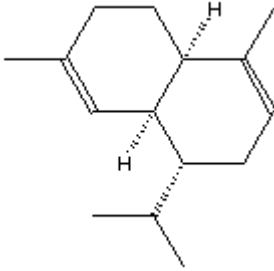
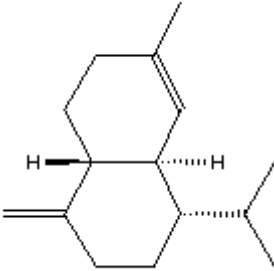
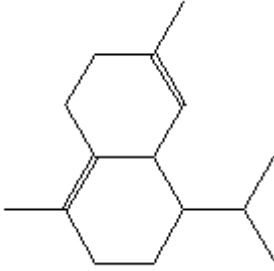
P- Cymene		$C_{10}H_{14}$	134.2182	99-87-6
Limonene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	138-86-3
β -Phellandrene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	555-10-2
Eucalyptol		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	470-82-6
Alpha Toluenol		C_7H_8O	108.1378	100-51-6
γ - Terpinene		$C_{10}H_{16}$	136.2340	99-85-4
Hexane, 2,2,5,5- tetramethyl		$C_{10}H_{22}$	142.2817	1071-81-4
sabinene hydrate		$C_{10}H_{16}$	136.2340	3387-41-5
1-nonen-3-ol		$C_9H_{18}O$	142.2386	21964-44-3

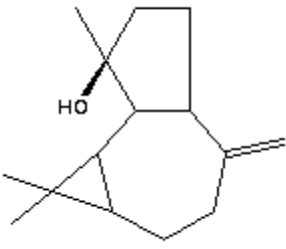
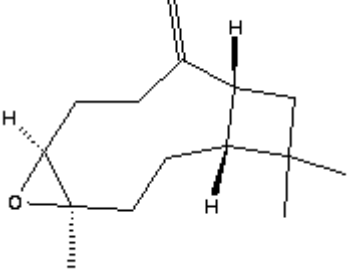


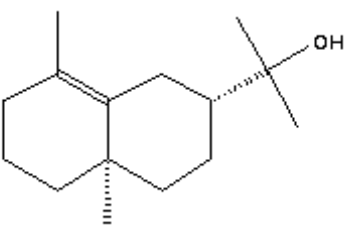
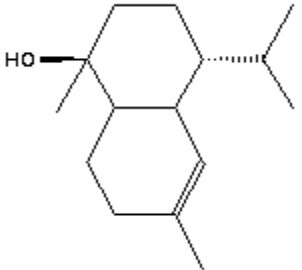
Trans linaloloxide		$C_{10}H_{18}O_2$	170.2487	34995-77-2
Undecane		$C_{11}H_{24}$	156.3083	1120-21-4
Thujone		$C_{10}H_{16}O$	152.2334	152.2334
β - Linalool		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	78-70-6
Octane, 2,2-dimethyl		$C_{10}H_{22}$	142.2817	15869-87-1
2-p-Menthen-1-ol;		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	29803-82-5
Camphor		$C_{10}H_{16}O$	152.2334	76-22-2
Isoborneol		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	124-76-5

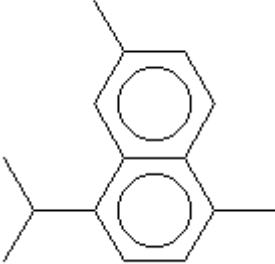
Borneol		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	507-70-0
Terpinen-4-ol		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	562-74-3
p-cymel-8-ol		$C_{10}H_{14}O$	150.2176	1197-01-9
α -terpineol		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	98-55-5
p-Menth-8-en-2-one, trans		$C_{10}H_{16}O$	152.2334	5948-04-9
Dodecane		$C_{12}H_{26}$	170.3348	112-40-3
Carveol		$C_{10}H_{16}O$	152.2334	99-48-9
Thymol methyl ether		$C_{11}H_{16}O$	164.2441	1076-56-8

Thymoquinone		$C_{10}H_{12}O_2$	164.2011	490-91-5
trans-Geraniol		$C_{10}H_{18}O$	154.2493	106-24-1
Carvenone		$C_{10}H_{16}O$	152.2334	499-74-1
Tridecane		$C_{13}H_{28}$	184.3614	629-50-5
Thymol		$C_{10}H_{14}O$	150.2176	89-83-8
Nonane, 3,7-dimethyl		$C_{11}H_{24}$	156.3083	17302-32-8
Carvacrol		$C_{10}H_{14}O$	150.2176	499-75-2

α - Cubebene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	17699-14-8
Eugenol		$C_{10}H_{12}O_2$	164.2011	97-53-0
Copaene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	3856-25-5
β -Bourbonene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	5208-59-3
β -Cubebene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	13744-15-5
Eugenol methyl ether		$C_{11}H_{14}O_2$	178.2277	93-15-2

Caryophyllene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	87-44-5
γ - Muurolene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	30021-74-0
α -Muurolene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	31983-22-9
γ - Cadinene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	39029-41-9
Delta Cadinene		$C_{15}H_{24}$	204.3511	483-76-1

Sphulenol		$C_{15}H_{24}O$	220.3505	6750-60-3
Caryophyllene oxide		$C_{15}H_{24}O$	220.3505	1139-30-6
Heptadecane		$C_{17}H_{36}$	240.4677	629-78-7
Hexadecane		$C_{16}H_{34}$	226.4412	544-76-3
γ - Eudesmol		$C_{15}H_{26}O$	222.3663	1209-71-8
α -Cadinol		$C_{15}H_{26}O$	222.3663	481-34-5

Cadalene	 The image shows the chemical structure of Cadalene, a bicyclic sesquiterpene. It consists of two fused six-membered rings. The top ring has a methyl group at the 1-position. The bottom ring has an isopropyl group at the 4-position and a methyl group at the 5-position.	$C_{15}H_{18}$	198.3034	483-78-3
----------	--	----------------	----------	----------