

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PRESENTES EM  
MANJERONA E ORÉGANO**

**MARIA REGINA ALVES RODRIGUES**

**PORTO ALEGRE**

**Agosto 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS PRESENTES EM  
MANJERONA E ORÉGANO**

**MARIA REGINA ALVES RODRIGUES**

Mestre em Química

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.*

**PORTO ALEGRE**

**Agosto 2002**

## DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Este trabalho foi orientado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Elina Bastos Caramão e desenvolvido no Laboratório de Pesquisa E-202 e na Central Analítica, do Instituto de Química da UFRGS. Parte dos experimentos que tiveram início em setembro de 1998 foram realizados neste Instituto, sob a supervisão da professora orientadora.

No período de maio de 2000 a abril de 2001, a parte experimental, referente aos estudos sobre Eletroforese Capilar, foi desenvolvida na Espanha, no Departamento de Química Analítica e Ecologia, da Universidade de Córdoba, sob a supervisão do Prof Dr. Miguel Valcárcel.

Entre novembro de 2001 e março de 2002, outra parte experimental, referente aos estudos sobre Extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões, foi desenvolvida em Erechim, no Laboratório de Termodinâmica Aplicada, do Centro Tecnológico, da Universidade Regional Integrada (URI), Campus de Erechim/RS, sob a supervisão dos Profs. Drs. José Vladimir de Oliveira e Cláudio Dariva.

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final, pela Orientadora e pela Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Profa. Dra. Elina Bastos Caramão

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime (IQ-UFSM/Santa Maria)

---

Prof. Dr. Cláudio Dariva (URI/Erechim)

---

Prof. Dr Rui C. Zambiasi (FCD-UFPEL/Pelotas)

---

Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale (IQ-UFRGS/Porto Alegre)

---

Profa. Dra. Clarisse Maria Sartori Piatnicki (IQ-UFRGS/Porto Alegre)

---

Prof. Dr. Jairton Dupont  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

## DEDICATÓRIA

***Aos meus filhos  
Ariane, Rogério e Cícero***

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dr. Elina Bastos Caramão pela orientação, dedicação e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minhas irmãs Arlete e Ivete, cunhado, sobrinhos e demais familiares e amigos pelo estímulo, dedicação e esforço pessoal proporcionado.

Aos meus vizinhos e a Eliane e Carine, que no convívio da minha casa em Pelotas, durante esses 4 anos, tornaram possível a minha permanência em Porto Alegre.

Aos colegas. e amigos do Curso, em especial ao Irajá e ao Pedro, pela amizade de tantos anos, companheirismo e pelas sugestões e observações valiosas.

Aos bolsistas de iniciação científica Maurício, Priscila, Ana Paula e de apoio técnico Débora, que realizaram um trabalho sério e responsável, pela amizade e companheirismo.

Aos demais alunos do Laboratório E-202 pela colaboração e amizade.

Aos demais professores e funcionários do Instituto de Química, UFRGS, pela presteza e apoio técnico.

Aos Professores Dr. Miguel Valcárcel e Dr. Angel Ríos, supervisores do trabalho desenvolvido na Universidade de Córdoba, Espanha, pelas contribuições.

À Dra. Lourdes Arce, colaboradora direta nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Química Analítica, da Universidade de Córdoba.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Química Analítica e Ecologia, da Universidade de Córdoba, Espanha, pela amizade.

Aos Professores Dr. José Vladimir de Oliveira e Dr. Cláudio Dariva, supervisores do trabalho desenvolvido na Universidade Regional Integrada, Campus de Erechim, Brasil, pelo incentivo, dedicação e valiosas contribuições.

Aos demais professores e funcionários do Centro Tecnológico da Universidade Regional Integrada, Campus de Erechim, Brasil, pela amizade, dedicação e apoio técnico.

Aos amigos e colegas, em especial ao Romeu, do Departamento de Química Orgânica, UFPel, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química, UFPel pela cooperação durante o período de afastamento das minhas atividades neste Instituto.

À Universidade Federal de Pelotas pelo suporte dado para realização do meu doutoramento.

À Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuário (FEPAGRO) pelo plantio das sementes, cuidados com o cultivo e colheita das plantas utilizadas neste estudo. Aos funcionários Rosa Lúcia e Luis de Castro, pelo apoio técnico e amizade.

Ao biólogo Prof. Dr. Sérgio Bordignon pela identificação das espécies plantadas pela FEPAGRO.

À CAPES, CNPq, FAPERGS (Brasil) e DG/MCT (Espanha) pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra colaboram para a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

Índice de Tabelas	pag
	ix
Índice de Figuras	xi
Siglas e Abreviaturas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
<b>Capítulo 1: Introdução</b>	1
1. Óleos Essenciais	2
2. Manjerona	4
3. Orégano	4
4. Justificativa	5
4.1. Objetivo Geral	5
4.2. Objetivos Específicos	5
<b>Capítulo 2: Revisão Bibliográfica</b>	6
1. Introdução	7
2. Manjerona	9
3. Orégano	15
4. Técnicas de Extração	21
4.1. Extração por Arraste de Vapor	21
4.2. Extração com Soxhlet	22
4.3. Extração com Maceração	22
4.4. Extração com Ultra-Som	23
4.5. Extração com Fluido Supercrítico	24
4.5.1. Técnica	26
4.5.2. Equipamento	28
5. Análise Instrumental	29
5.1. Cromatografia gasosa	29
5.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	30
5.3. Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar	31
5.3.1. Equipamento	32
5.3.2. Técnica	33
6. Proposta Analítica para o Trabalho do Extração e Análise dos Óleos de Manjerona e Orégano	38
6.1. Análise Qualitativa Preliminar do óleo Essencial de Manjerona e de Orégano	38
6.2. Influência da Época da Colheita sobre a Quantidade e Qualidade dos Óleos Essenciais de Manjerona e Orégano	38
6.3. Desenvolvimento de uma Metodologia de Análise usando CCEM para o Estudo do Óleo Essencial de Manjerona	39
6.4. Comparação de Metodologias de Extração de Compostos Orgânicos de Manjerona e de Orégano com Solventes Orgânicos	39
6.5. Desenvolvimento de uma Metodologia de Extração usando CO <sub>2</sub> a Altas Pressões	39

	pag
<b>Capítulo 3: Caracterização inicial dos óleos essenciais de manjerona e orégano</b>	40
<b>Experimental</b>	41
1. Amostragem	41
2. Extração com Clevenger	41
3. Análise do óleo essencial por CG/EM	41
<b>Resultados e Discussão</b>	43
1. Rendimento em Óleo Essencial	43
2. Análise do Óleo Essencial por CG/EM	43
2.1. Manjerona	43
2.2. Orégano	47
<b>Capítulo 4: Influência da Época da Colheita sobre a Qualidade e a Quantidade de Óleo Essencial de Manjerona e Orégano</b>	50
<b>Experimental</b>	51
1. Amostras	51
2. Extração com Clevenger	52
3. Análise do óleo essencial por CG/EM	52
<b>Resultados e Discussão</b>	53
1. Rendimento do Óleo Essencial de Manjerona e Orégano	53
2. Análise do Óleo Essencial Via CG/EM	53
2.1. Óleo Essencial de Manjerona	53
2.2. Óleo Essencial de Orégano	58
<b>Capítulo 5: Aplicação da Eletroforese Capilar na Análise do Óleo Essencial de Manjerona</b>	63
<b>Experimental</b>	64
1. Amostras, Reagentes e Solventes	64
2. Extração do Óleo Essencial	64
3. Procedimento da Determinação CCEM	66
<b>Resultados e Discussão</b>	68
1. Desenvolvimento do Método	68
1.1. Variáveis Instrumentais	68
1.1.1. Temperatura	68
1.1.2. Absorbância	68
1.1.3. Voltagem	68
1.1.4. Modo de Injeção	69
1.2. Variáveis Químicas	69
1.2.1. Ciclodextrinas	69
1.2.2. Concentração da Solução Tampão	70
1.2.3. Modificador Orgânico	71
2. Desempenho do Método (Figuras de Mérito)	72
2.1. Hidrocarbonetos Monoterpênicos	72
2.2. Hidrocarbonetos e Álcoois Monoterpênicos	73
3. Aplicação do Método	76
3.1. Amostras Sintéticas	76
3.2. Amostras Reais	76

	pag
<b>Capítulo 6: Comparação de Metodologias de Extração de Compostos Orgânicos de Manjerona e de Orégano com Solventes Orgânicos</b>	83
<b>Experimental</b>	84
1. Amostras	84
2. Reagentes e Solventes	84
3. Métodos Utilizados	85
3.1. Maceração	85
3.2. Soxhlet	85
3.3. Ultra-Som	86
4. Cromatografia Líquida Preparativa em Sílica Gel	87
5. Análise das Frações por CG/EM	88
<b>Resultados e Discussão</b>	89
1. Rendimento dos Extratos de Manjerona e de Orégano	89
2. Análise dos Extratos de Manjerona e de Orégano Via CG/EM	90
2.1 Maceração	91
2.1.1. Extratos de Manjerona	91
2.1.2. Extratos de Orégano	95
2.2. Soxhlet	99
2.2.1. Extratos de Manjerona	99
2.2.2. Extratos de Orégano	102
2.2.2.1. Extratos de Orégano Cultivado	102
2.2.2.2. Extratos de Orégano Comercial	105
2.3. Ultra-Som	106
2.3.1. Extratos de Orégano Comercial	106
<b>Capítulo 7: Aplicação do CO<sub>2</sub> a Altas Pressões na Extração de Compostos Orgânicos de Manjerona e Orégano</b>	109
<b>Experimental</b>	110
1. Amostras	110
2. Reagentes e Solventes	110
3. Equipamento	110
4. Extração com CO <sub>2</sub> Supercrítico	111
5. Condições Cromatográficas	112
<b>Resultados e Discussão</b>	113
1. Extração de Óleos	113
1.1. Extração do Orégano	113
1.1.1. Análise Cromatográfica dos Extratos de Orégano	115
1.2. Extração da Manjerona	122
1.2.1. Análise Cromatográfica dos Extratos de Manjerona	123
<b>Capítulo 8: Conclusões</b>	130
<b>Referências Bibliográficas</b>	135
<b>Anexos:</b>	144
<b>Anexo 1:</b> Produção Científica Gerada	145
<b>Anexo2:</b> Fotografias da unidade experimental de extração CO <sub>2</sub> a altas pressões	162

## ÍNDICE DE TABELAS

	pag
<b>Tabela I</b>	Condições críticas para as substâncias supercríticas mais utilizadas na EFS 25
<b>Tabela II</b>	Propriedades físico-químicas dos líquidos, fluidos supercríticos e gases 26
<b>Tabela III</b>	Propriedades físico-químicas das CDs 35
<b>Tabela IV</b>	Condições analíticas utilizadas na análise dos óleos essenciais 42
<b>Tabela V</b>	Rendimento do óleo essencial obtido da extração com Clevenger para as amostras de manjerona e orégano 43
<b>Tabela VI</b>	Compostos tentativamente identificados por CG/EM no óleo essencial das três amostras de manjerona 46
<b>Tabela VII</b>	Compostos tentativamente identificados por CG/EM no óleo essencial das três amostras de orégano 49
<b>Tabela VIII</b>	Classificação das amostras de manjerona e orégano, país de origem e importadora 51
<b>Tabela IX</b>	Condições analíticas utilizadas na análise dos óleos essenciais 52
<b>Tabela X</b>	Rendimento da extração com Clevenger, obtido para as amostras de manjerona e orégano, expresso em mL de óleo por 100 g de amostra 53
<b>Tabela XI</b>	Compostos identificados nos óleos extraídos das 3 amostras de manjerona (T1, T2 e T3) 57
<b>Tabela XII</b>	Compostos identificados nos óleos extraídos das 3 amostras de orégano (T4, T5 e T6) 62
<b>Tabela XIII</b>	Figuras de mérito para o método de CCEM, usando hidrocarbonetos monoterpênicos 73
<b>Tabela XIV</b>	Figuras de mérito para o método de CCEM, usando álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos 75
<b>Tabela XV</b>	Valores de recuperação para a análise das amostras sintéticas baseada no método proposto 77
<b>Tabela XVI</b>	Quantificação dos analitos nas amostras de manjerona, usando o método proposto, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ 78
<b>Tabela XVII</b>	Condições analíticas utilizadas na análise dos extratos de manjerona e orégano 88
<b>Tabela XVIII</b>	Rendimento das extrações por maceração, Soxhlet e ultra-som, obtidas para as amostras de manjerona e orégano, expresso em mg (extrato) por 100 g de amostra 89
<b>Tabela XIX</b>	Tempo de retenção e principais fragmentos iônicos dos hidrocarbonetos e álcoois monoterpênicos usados neste estudo 91
<b>Tabela XX</b>	Principais compostos identificados tentativamente nos extratos da maceração com hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de manjerona comercial 94

	pag
<b>Tabela XXI</b> Principais compostos identificados tentativamente nos extratos da maceração com hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de orégano comercial	98
<b>Tabela XXII</b> Principais compostos identificados tentativamente nos extratos com Soxhlet, de hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de manjerona cultivada T2	101
<b>Tabela XXIII</b> Principais compostos identificados tentativamente nos extratos com Soxhlet, de hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de orégano cultivado T4 e comercial	104
<b>Tabela XXIV</b> Principais compostos identificados tentativamente nos extratos do ultra-som, com hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de orégano comercial	108
<b>Tabela XXV</b> Condições cromatográficas utilizadas na análise dos óleos extraídos com CO <sub>2</sub> a altas pressões por CG/EM	112
<b>Tabela XXVI</b> Condições experimentais e rendimentos obtidos nas extrações de orégano comercial com CO <sub>2</sub> a altas pressões	113
<b>Tabela XXVII</b> Compostos tentativamente identificados via CG/EM nos extratos de orégano comercial obtidos com CO <sub>2</sub> a altas pressões	116
<b>Tabela XXVIII</b> Concentração de timol e carvacrol (mg L <sup>-1</sup> ) nos extratos de orégano comercial, obtidos via extração com CO <sub>2</sub> a altas pressões	117
<b>Tabela XXIX</b> Condições experimentais e rendimentos obtidos nas extrações de manjerona comercial com CO <sub>2</sub> a altas pressões	122
<b>Tabela XXX</b> Compostos tentativamente identificados via CG/EM nos extratos de manjerona obtidos com CO <sub>2</sub> a altas pressões	125
<b>Tabela XXXI</b> Concentração de terpineol-4 e $\alpha$ -terpineol (mg L <sup>-1</sup> ) nos extratos de manjerona comercial, obtidos via extração com CO <sub>2</sub> a altas pressões	126

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pag.
<b>Figura 1</b>	Estruturas de alguns compostos presentes no óleo essencial de manjerona e de orégano 8
<b>Figura 2</b>	Diagrama da Pressão x Temperatura para uma substância pura 24
<b>Figura 3</b>	Esquema de um sistema de extração com fluido supercrítico 29
<b>Figura 4</b>	Esquema básico de um sistema de eletroforese capilar 33
<b>Figura 5</b>	Esquema da CCEM, usando como exemplo um surfactante aniônico, o dodecil sulfato de sódio (DSS). 34
<b>Figura 6</b>	Desenho esquemático da estrutura básica das CDs 36
<b>Figura 7</b>	Esquema do princípio da separação da CD-CCEM, mostrando a interação do analito com CDs e com um surfactante aniônico. 37
<b>Figura 8</b>	Aparelho de Clevenger utilizado na extração por arraste de vapor. 42
<b>Figura 9</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido: <b>A)</b> das folhas secas do <i>Origanum majorana</i> ; <b>B)</b> das folhas frescas do <i>Origanum majorana</i> ; <b>C)</b> da manjerona comercial. 44
<b>Figura 10</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido: <b>A)</b> das folhas frescas de <i>Origanum vulgare</i> ; <b>B)</b> do orégano comercial adquirido há um ano; <b>C)</b> do orégano comercial adquirido recentemente. 48
<b>Figura 11</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona colhidas no outono: <b>A)</b> T1; <b>B)</b> T2 e <b>C)</b> T3. 54
<b>Figura 12</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona colhidas no inverno: <b>A)</b> T1; <b>B)</b> T2 e <b>C)</b> T3. 55
<b>Figura 13</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona colhidas na primavera: <b>A)</b> T1; <b>B)</b> T2 e <b>C)</b> T3. 56
<b>Figura 14</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de orégano colhidas no outono: <b>A)</b> T4; <b>B)</b> T5 e <b>C)</b> T6. 59
<b>Figura 15</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de orégano colhidas no inverno: <b>A)</b> T4; <b>B)</b> T5 e <b>C)</b> T6. 60
<b>Figura 16</b>	Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de orégano colhidas na primavera: <b>A)</b> T4; <b>B)</b> T5 e <b>C)</b> T6. 61
<b>Figura 17</b>	Estrutura dos principais hidrocarbonetos e álcoois monoterpênicos usados neste estudo 65
<b>Figura 18</b>	Equipamento de eletroforese capilar Beckman P/ACE 5500 66
<b>Figura 19</b>	Eletroferogramas indicando o efeito do tipo de CD na separação de quatro monoterpênicos: (1) (+)-canfeno, (2) (+)-β-pineno, (3) (+)-α-pineno e (4) γ-terpineno. <b>(A)</b> 10 mM α-CD e <b>(B)</b> 10 mM γ-CD 70
<b>Figura 20</b>	Eletroferogramas indicando o efeito da adição de acetonitrila na separação dos monoterpênicos: (1) (+)-canfeno, (2) terpinoleno (3) (+)-β-pineno, (4) p-cimeno (5) (+)-α-pineno, (6) α-terpineno e (7) γ-terpineno (10 µg mL <sup>-1</sup> de cada). <b>(A)</b> 5% de acetonitrila e <b>(B)</b> 10% de acetonitrila 71

	pag.
<b>Figura 21</b> Eletroferograma dos oito álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos: (1) terpineol-4, (2) $\alpha$ -terpineol, (3) linalol, (4) terpinoleno, (5) p-cimeno, (6) (+)- $\alpha$ -pineno, (7) $\alpha$ -terpineno e (8) $\gamma$ -terpineno.	74
<b>Figura 22</b> Eletroferogramas dos álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos: (1) terpineol-4, (2) $\alpha$ -terpineol, (3) linalol, (4) terpinoleno, (5) p-cimeno, (6) (+)- $\alpha$ -pineno, (7) $\alpha$ -terpineno e (8) $\gamma$ -terpineno. (A) óleo essencial da manjerona ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (B) fortificado com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada monoterpeno; (C) fortificado com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada monoterpeno; (D) fortificado com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada monoterpeno.	82
<b>Figura 23</b> Desenho esquemático do equipamento usado para maceração	85
<b>Figura 24</b> Desenho do equipamento usado para extração com Soxhlet.	86
<b>Figura 25</b> Equipamento utilizado para extração com ultra-som	87
<b>Figura 26</b> Cromatograma pelo monitoramento de íons (modo SIM) dos padrões	90
<b>Figura 27</b> Cromatogramas do íon total das frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de manjerona comercial	92
<b>Figura 28</b> Cromatogramas do íon total das frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de manjerona comercial	93
<b>Figura 29</b> Cromatogramas do íon total das frações de metanol (fração 3 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de manjerona comercial	93
<b>Figura 30</b> Cromatogramas do íon total das frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de orégano comercial	96
<b>Figura 31</b> Cromatogramas do íon total das frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de orégano comercial	96
<b>Figura 32</b> Cromatogramas do íon total das frações de metanol (fração 3 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de orégano comercial	97
<b>Figura 33</b> Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de manjerona cultivada T2	100
<b>Figura 34</b> Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de manjerona cultivada T2	100
<b>Figura 35</b> Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano cultivado T4	103
<b>Figura 36</b> Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano cultivado T4	103
<b>Figura 37</b> Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial	105

	pag.
<b>Figura 38</b> Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial	106
<b>Figura 39</b> Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com ultra-som, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial	107
<b>Figura 40</b> Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com ultra-som, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial	107
<b>Figura 41</b> Esquema representativo de um sistema de extração a altas pressões	111
<b>Figura 42</b> Curvas de extração obtidas para orégano comercial usando CO <sub>2</sub> a altas pressões	114
<b>Figura 43</b> Cromatograma do íon total do extrato de orégano comercial obtido via extração com CO <sub>2</sub> a 150 atm e 40 °C	115
<b>Figura 44</b> Cromatogramas do íon total para os extratos de orégano comercial, obtidos a 150 atm e 30 °C. (A) 50 min; (B) 100 min; (C) 150 min; (D) 200 min; (E) 250 min; (F) 300 min.	119
<b>Figura 45</b> Cromatogramas do íon total para os extratos de <i>Origanum vulgare</i> obtidos a 150 atm e 30 °C (A) 50 min; (B) 100 min; (C) 150 min; (D) 200 min; (E) 250 min; (F) 300 min	120
<b>Figura 46</b> Gráfico da variação das áreas relativas com o tempo de extração, para os compostos cis-sabineno hidratado, timol e carvacrol, presentes nos extratos de orégano comercial, obtidos na extração com CO <sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C	121
<b>Figura 47</b> Gráfico da variação das áreas relativas com o tempo de extração, para os compostos cis-sabineno hidratado, acetato de linalila, timol e carvacrol, presentes nos extratos de <i>Origanum vulgare</i> , obtidos na extração com CO <sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C	121
<b>Figura 48</b> Curvas de extração obtidas da amostra de manjerona comercial com CO <sub>2</sub> a altas pressões	123
<b>Figura 49</b> Cromatograma do íon total do extrato de manjerona comercial obtido via extração com CO <sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C	124
<b>Figura 50</b> Cromatogramas do íon total dos extratos de manjerona comercial, obtidos a 150 atm e 30 °C. (A) 50 min; (B) 100 min; (C) 150 min; (D) 200 min; (E) 250 min; (F) 300 min	127
<b>Figura 51</b> Gráfico da variação das áreas relativas com o tempo de extração, para os compostos cis-sabineno hidratado, terpineol-4, α-terpineol e acetato de cis-sabineno hidratado, presentes no extrato de manjerona comercial, obtidos na extração com CO <sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C	128
<b>Figura 52</b> Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos das amostras de (A) <i>Majorana hortensis</i> Moench e de (B) manjerona comercial, submetidas à extração com CO <sub>2</sub> a 40 °C e 150 atm	129

## SIGLAS E ABREVIATURAS

**CG** – Cromatografia Gasosa

**EM** – Espectrometria de Massas

**GC/MS** – Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry

**CG/EM** – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

**MEKC** – Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

**CCEM** – Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar

**SFE** – Supercritical Fluid Extraction

**EFS** – Extração com Fluido Supercrítico

**CGAR** – Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

**US** – Ultra-som

**DES** – Destilação a Vapor com Extração com Solvente

**CD** – Ciclodextrina

**ppm** – partes por milhão

**ssp.** – subespécie

**var.** – variedade

**sin.** – sinônimo

**FEPAGRO** – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

**IK** – Índice de Kovats

**CLP** – Cromatografia Líquida Preparativa

**MT** – Monoterpenos

**NMT** – Não monoterpenos

**DSS** – Dodecilsulfato de sódio

## RESUMO

Este trabalho visou o estudo dos óleos essenciais de flores e folhas de *Majorona hortensis* Moench e *Origanum vulgare* Linneus, obtidos por diferentes técnicas de extração como destilação por arraste de vapor, maceração, Soxhlet, ultra-som e com CO<sub>2</sub> a altas pressões. A identificação de seus principais componentes foi realizada utilizando CG/EM e CCEM.

Todos os métodos de extração utilizados mostraram-se adequados à obtenção dos óleos, ressaltando-se suas características peculiares. O óleo essencial pode ser analisado diretamente e os extratos com solventes orgânicos (maceração, Soxhlet e ultra-som) necessitaram de tratamento de limpeza (*clean up*), usando também solventes orgânicos. Após a limpeza, as frações obtidas com acetato de etila apresentaram perfis cromatográficos semelhantes à extração por vapor de água.

A análise cromatográfica dos extratos obtidos com CO<sub>2</sub> a altas pressões permitiu identificar qualitativa e quantitativamente os principais compostos (oxigenados terpênicos) responsáveis pelo aroma e sabor da manjerona e do orégano. Além destes compostos, os extratos continham baixas concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, que são compostos insaturados, instáveis à luz e ao calor e passíveis de oxidação, decompondo-se e formando compostos indesejáveis.

A CCEM foi utilizada pela primeira vez para analisar óleos essenciais. O método mostrou-se eficiente para identificar e quantificar alguns compostos (hidrocarbonetos e álcoois terpênicos) presentes no óleo essencial de manjerona obtido por arraste de vapor.

## ABSTRACT

The aim of this work was to study of the essential oils of flowers and leaves of *Majorona hortensis* Moench and *Origanum vulgare* Linneus, by using steam distillation, maceration, Soxhlet, sonication and supercritical fluid extraction techniques. The identification of the main compounds in each extract was made by GC/MS and MEKC.

All the extraction methods showed good performance, according to their peculiarities. The essential oil (from steam distillation and from supercritical CO<sub>2</sub>) could be analyzed without any treatment, but the extracts obtained with organic solvents (maceration, sonication and Soxhlet) must be submitted to a clean-up by preparative liquid chromatography. After this step, the ethyl acetate fraction showed the same chromatographic profile of the essential oils.

GC/MS allowed the separation and identification of the oxygenated terpenes, which are responsible for the flavor of the supercritical CO<sub>2</sub> extracts. Other compounds like unsaturated hydrocarbons, that were undesirable due to their high oxidation sensibility, were found only in trace amounts. This is an important applicability of the SFE.

MEKC was utilized for the first time in the analysis of essential oils and demonstrated high efficiency in the separation and characterization of the compounds from the essential oil of *Majorona hortensis* Moench.

# CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

---

## 1. ÓLEOS ESSENCIAIS

O Brasil é um grande produtor de condimentos e ervas aromáticas, os quais são empregados tanto pela indústria alimentícia quanto pelas indústrias farmacêutica e de cosméticos. Os principais produtos de exportação são a pimenta-do-reino, o cravo-da-índia e o gengibre. O óleo essencial e/ou óleo-resina de vetiver, camomila, erva-cidreira, canela, menta, eucalipto são ou podem ser exportados, podendo vir a ser uma importante fonte de divisas para o Brasil<sup>1,2</sup>.

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos, de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais freqüente a destilação por arraste de vapor de água<sup>2</sup>.

Segundo Ugaz<sup>3</sup>, são chamados de óleos essenciais os constituintes odoríferos ou essências de uma planta. O termo óleo, provavelmente se origina do fato que o aroma de uma planta ocorre nas glândulas ou entre as células em forma líquida, o qual, como os óleos graxos, são imiscíveis em água. A palavra essencial é derivada do latim “quinta essência” que significava o quinto elemento, notação dada a esses óleos, já que a terra, o fogo, o vento e a água, foram considerados os quatro primeiros elementos.

Os óleos essenciais são, de uma maneira geral, uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos, álcoois e aromáticos, encontrados em todo tecido vivo de plantas, em geral concentrados na casca, nas flores, nas folhas, nos rizomas e nas sementes<sup>4</sup>. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização, como por exemplo, o óleo das cascas da canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto que o das folhas e das raízes desse mesmo vegetal são ricos em eugenol e cânfora, respectivamente. Também a composição química de um óleo volátil, extraído de um mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo<sup>5</sup>. Também são muito conhecidos desde a Antigüidade por possuir atividade biológica, por suas propriedades antibacteriana, antifúngica e antioxidante<sup>6</sup>.

A utilização de extratos de plantas aromáticas como condimentos vem despertando um grande interesse pelas indústrias, pois quando comparados aos vendidos em forma de pó, garantem maior vida de prateleira, manutenção do aroma e dificilmente sofrem contaminação microbiológica, garantindo assim a qualidade de produtos processados<sup>4</sup>.

Atualmente, as aplicações dos óleos essenciais são muito variadas: são largamente empregados em perfumaria, como flavorizantes de alimentos e na medicina. Cada um de seus componentes pode também ter uma aplicação específica, como por exemplo 1,8-cineol - medicinal e cosmético; p-cimeno - aditivo na indústria de perfumaria, solvente e material de partida para síntese orgânica; farnesol - bactericida; linalol - perfumaria e flavorizante; acetato de geranila – perfumaria; entre outros<sup>3</sup>.

A extração dos óleos essenciais das plantas, sua separação e a concentração de suas frações ou compostos é de importância industrial. Assim, a escolha do método de extração é fundamental e varia conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de utilização do mesmo.

O método clássico, usado industrialmente, é a destilação por arraste de vapor de água. Embora esta técnica seja largamente empregada, sabe-se que tem desvantagens, entre elas, a formação de substâncias indesejáveis, principalmente devido à alta temperatura da operação<sup>3-5</sup>.

Outro método é a extração com solventes orgânicos, apolares ou polares, dependendo da classe de compostos que se quer extrair, os quais extraem outros compostos resinosos não-voláteis, junto com o óleo essencial<sup>4,5</sup>.

Uma técnica alternativa às técnicas convencionais, é a extração com fluido supercrítico. Esta técnica funciona de maneira semelhante à extração com solventes. O CO<sub>2</sub> supercrítico é usado como solvente, em substituição aos solventes orgânicos, geralmente utilizados, não causando danos aos produtos extraídos. Ele dissolve e remove alguns componentes da amostra, comportando-se como híbrido de gás-líquido, pois possui propriedades intermediárias entre as de um gás e de um líquido. O CO<sub>2</sub> supercrítico pode extrair uma grande variedade de substâncias e, em função da pressão aplicada, fracionar a amostra, realizando a extração em duas ou mais densidades diferentes<sup>4,5</sup>.

Após serem extraídos, os óleos essenciais devem ser analisados para identificar e quantificar seus componentes. Para tal, são empregadas técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Na CG, a amostra injetada no cromatógrafo volatiliza, permitindo a separação e a identificação dos compostos individuais através do tempo de retenção relativo da amostra quando comparados com padrões. Na CG/EM, além da separação dos componentes, obtém-se espectros de massas de cada pico, que também podem ser comparados com espectros de massas de padrões ou com espectros constantes na literatura ou na biblioteca do equipamento<sup>4,5</sup>.

## **2. MANJERONA**

A manjerona doce (*Majorana hortensis* Moench) possui um odor forte, aromático, penetrante, quente, às vezes picante, mas muito agradável. A planta verde tem um perfume semelhante ao de uma flor. Os produtos derivados da manjerona são utilizados pela indústria para aromatizar bebidas, condimentos, carnes, sopas em pó, sorvetes, balas, assados, entre outros<sup>7</sup>.

O produto mais importante é sua essência, que varia entre 0,30 e 0,40% da planta fresca e entre 0,7 e 3,5% das folhas secas, apresenta uma cor amarelo-verdosa e é muito aromática. Esta planta é considerada um excelente tônico estomacal, carminativa, antiespasmódica, emenagoga e sudorífica e, em pequenas doses, sedante<sup>8</sup>.

## **3. ORÉGANO**

O orégano (*Origanum vulgare* Linneus) possui um perfume agradável, herbáceo, intenso, de sabor quente e queimado. O orégano deve ser consumido logo após sua colheita e cuidadosamente seco à sombra, para que essas características permaneçam intensas. Para fins aromáticos utilizam-se, de preferência, somente as flores ou as folhas picadas em pedaços bem pequenos.

Também, para a destilação do óleo essencial e para fins medicinais empregam-se, às vezes, as sumidades floridas junto com as folhas<sup>9</sup>.

O componente principal do orégano é o seu óleo essencial, de cor amarelo-limão, que existe em quantidades variáveis, variando em geral entre 0,15 e 0,40% da planta fresca. É empregado na culinária para dar sabor e aroma a todo tipo de carnes, sendo também usado na medicina popular em função de ser uma planta tônica e digestiva<sup>10</sup>.

## **4. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista o acima exposto, justifica-se o presente trabalho que visa o estudo do óleo essencial obtido das flores e folhas de manjerona (*M. hortensis* Moench) e de orégano (*O. vulgare* Linneus). As técnicas de extração utilizadas foram destilação por arraste de vapor, maceração, Soxhlet, ultra-som e CO<sub>2</sub> a altas pressões. A identificação de seus principais componentes foi realizada utilizando CG/EM e CCEM. Para tal são propostos os seguintes objetivos:

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e adaptar uma metodologia para isolamento, análise e caracterização dos óleos essenciais presentes nas folhas e flores de manjerona e orégano.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver e/ou adaptar metodologias extrativas de óleos essenciais das folhas e flores de manjerona e orégano, usando técnicas de extração como destilação por arraste de vapor, maceração, Soxhlet, ultra-som e com CO<sub>2</sub> a altas pressões;

Caracterizar e identificar os constituintes das amostras de óleo extraído, usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e cromatografia capilar eletrocínica micelar (CCEM).

## **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 1. INTRODUÇÃO

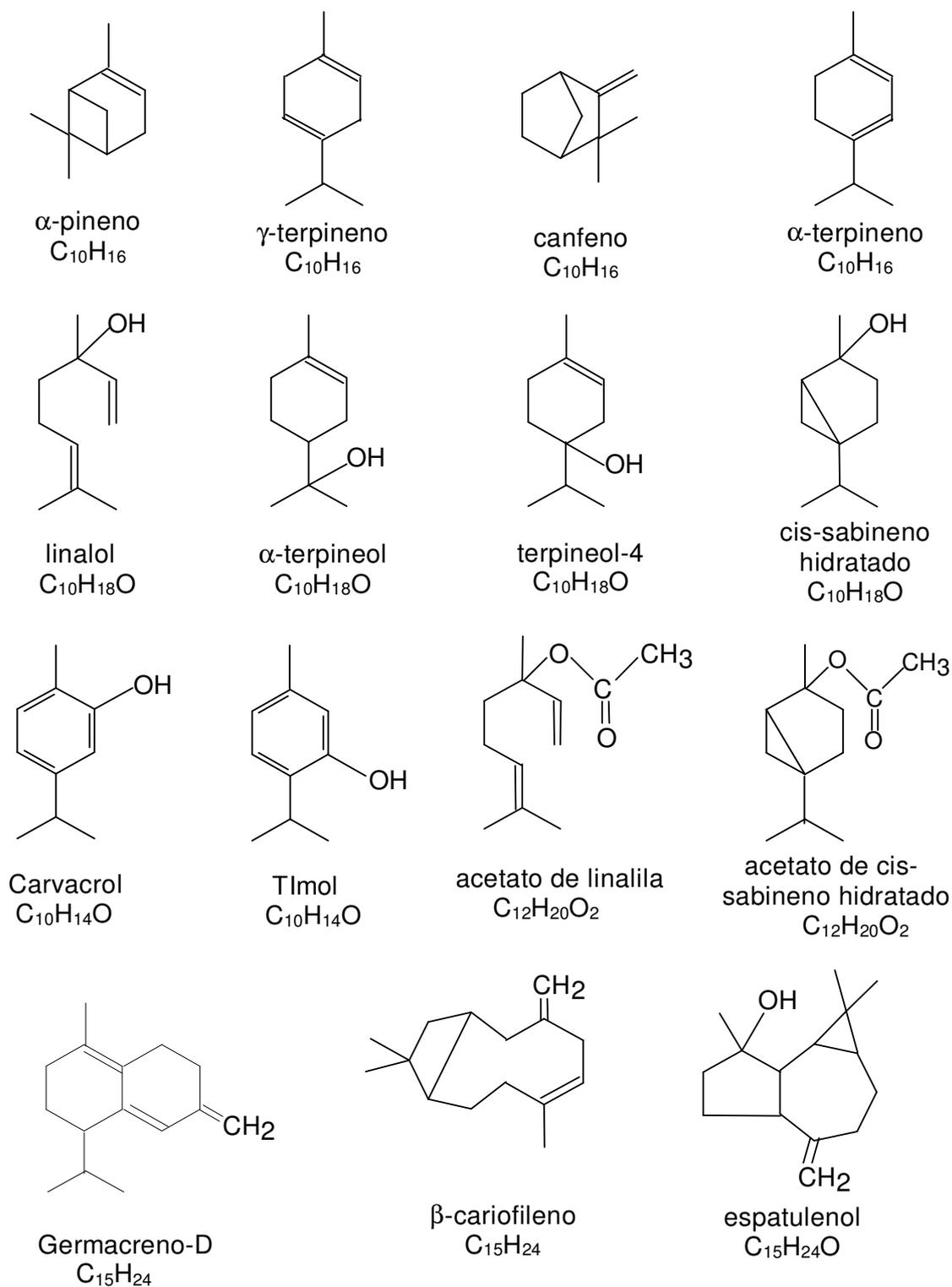
Orégano e manjerona são temperos muito utilizados na culinária e, além do seu emprego na medicina popular, vem despertando interesse devido a seus óleos essenciais. Na indústria de alimentos o óleo destilado tem larga aplicação, em razão de sua grande estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e a grande variedade de compostos.

Quimicamente a grande maioria dos óleos voláteis é formada por monoterpenos e, em menor frequência, por sesquiterpenos. Podem ser ainda subdivididos conforme a função ou a isomeria, da seguinte maneira<sup>3-5</sup>.

- a. Acíclicos: mirceno (hidrocarboneto monoterpênico), geraniol (álcool monoterpênico), farneseno (hidrocarboneto sesquiterpênico) e nerolidol (álcool sesquiterpênico);
- b. Cíclicos: terpinoleno (hidrocarboneto monoterpênico),  $\alpha$ -terpineol (álcool monoterpênico), germacreno D (hidrocarboneto sesquiterpênico) e  $\alpha$ -cadinol (álcool sesquiterpênico);
- c. Aromáticos: carvacrol e timol (fenóis isômeros);
- d. Outros: mentona (cetona), acetato de linalila (éster) e 1,8-cineol (éter).

A **Figura 1** apresenta a estrutura de alguns exemplos das substâncias presentes nos óleos essenciais de manjerona e de orégano<sup>3,5</sup>.

O termo óleo essencial é definido pelo método de extração, isto é, a separação das substâncias voláteis por destilação a vapor, à pressão atmosférica. Atualmente outras técnicas de extração são utilizadas como o ultra-som e o fluido supercrítico. A identificação dos componentes dos extratos é feita por várias técnicas, tais como Cromatografia Gasosa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.



**Figura 1** – Estruturas de alguns compostos presentes no óleo essencial de manjerona e de orégano.

## 2. MANJERONA

A manjerona (*Majorana hortensis* Moench) é uma planta perene, cuja porção subterrânea está formada por um sistema de raízes fibrosas. O caule é muito ramificado, de cor meio avermelhada, que alcança entre 30 e 60 cm. Os ramos são lenhosos, frágeis e quadrangulares, formando uma touceira<sup>11</sup>.

Suas folhas são opostas, ovais, inteiras, pecioladas, de cor verde acinzentada. As flores são pequenas, em espigas oblongas, de cor branca a rosada, com 4 fileiras de brácteas finas, arredondadas e de cor verde claro<sup>8,11</sup>.

O termo vernacular manjerona compreende várias plantas aromáticas da família das Labiadas de diferentes espécies<sup>12,13</sup>. Existe alguma confusão quanto ao óleo essencial obtido da manjerona, quanto à classificação botânica das espécies dessa planta<sup>13</sup>.

Os Estados Unidos importaram por muitos anos, da Espanha, o óleo essencial de manjerona, destilado de *Thymus mastichina* Linneus, manjerona espanhola que cresce ao sul da Espanha, também conhecida como tomilho branco ou manjerona silvestre. A composição química desse óleo difere muito daquele extraído da *Majorana hortensis* Moench (sweet marjoram), tendo odor desagradável e semelhante ao do eucalipto (cineol)<sup>13</sup>.

Sarer e colaboradores<sup>14</sup> relatam que a manjerona mais conhecida é sem dúvida *Origanum majorana* Linneus (sin. *Majorana hortensis* Moench., *M. vulgaris* Miller), sendo nativa da Ilha de Chipre e do sul da Turquia. Também é cultivada na Europa, África, América e Ásia<sup>14</sup>. É a espécie mais usada para se extrair o óleo.

Segundo Kokkini<sup>12</sup>, o óleo essencial da manjerona espanhola é rico em 1,8-cineol e é empregado como agente flavorizante de alimentos, mas em menor escala que o da manjerona doce (sweet marjoram). As folhas secas dessa manjerona doce são largamente usadas como agente flavorizante em sopas, queijos, pratos prontos de legumes e ovos, temperos para saladas, cozidos, salsicha polonesa, entre outros. Seus compostos majoritários são  $\gamma$ -terpineno e terpineol-4.

O óleo essencial da manjerona tem sido estudado desde o século XIX. Biltz (1899) publicou um artigo no qual descreve que esse óleo continha cerca de 40% de hidrocarbonetos monoterpênicos, principalmente terpineno. Mais tarde, em 1906,

Wallach demonstrou que a manjerona doce continha terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol. Somente nos anos sessenta é que prosseguiram as investigações em torno desse óleo, onde diversos autores estudaram plantas provenientes de várias regiões<sup>15</sup>.

O óleo essencial é obtido por destilação a vapor, sendo assim utilizado pela indústria como flavorizante. Para ser usado na produção de bebidas alcoólicas (licor com sabor de ervas), os componentes voláteis são separados por percolação e posterior destilação com uma mistura de água-álcool<sup>15</sup>.

Segundo Nykänen<sup>16</sup>, a manjerona é freqüentemente usada também como agente flavorizante em vermouths e bitter, tornando-se necessário investigar a composição do aroma.

Vários trabalhos<sup>14-18</sup> mostram que a composição do aroma varia com a origem da planta. Foram encontrados óleos essenciais de manjerona com alto conteúdo de álcoois monoterpênicos e outros, de fenóis. Em alguns óleos o terpineol-4 foi o componente majoritário, sozinho ou junto com outros álcoois monoterpênicos como cis e trans-sabineno hidratado e  $\alpha$ -terpineol<sup>17</sup>.

Em seu trabalho, publicado em 1986, Nykänen<sup>16</sup> estudou o óleo essencial de *Origanum majorana* Linneus, cultivado em duas localidades diferentes da Finlândia, em local coberto e ao ar livre. O óleo foi obtido por destilação a vapor e extração em n-pentano, sendo que a quantidade de voláteis foi cerca de 50% maior, quando cultivada em local coberto. O cis-sabineno hidratado (8 – 43%) e terpineol-4 (21-52%), foram os compostos majoritários, seguidos pelos trans-sabineno hidratado,  $\alpha$ -terpineol e linalol<sup>16</sup>.

Sarer<sup>14</sup>, que analisou por cromatografia gasosa o óleo essencial obtido por destilação a vapor de flores e folhas de *Origanum majorana*, cultivada ao sul da Turquia, encontrou alto teor de carvacrol (65%), caracterizando esta manjerona como do tipo fenólico. Jolivet e colaboradores<sup>16</sup> encontraram também no óleo essencial de amostras de manjerona italiana alto teor de fenóis (47%), sendo o timol em maior quantidade do que o carvacrol.

O óleo essencial proveniente de dez variedades de manjerona da Alemanha, Hungria, Romênia, Portugal, Egito, Tunísia e França foi analisado por Oberdieck<sup>17</sup>. O autor constatou que as amostras tinham como componentes majoritários cis e trans-sabineno hidratado, terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol, mas as duas amostras francesas

continham 11 e 14% de timol e 19 e 25% de carvacrol, respectivamente. Ao analisar essas amostras por microscopia, verificou-se que continham cerca de 25 e 15%, respectivamente, de *Origanum Maru* Linneus (sin *Majorana maru* Linneus), cujo óleo é rico em timol (30,9%) e carvacrol (43,7%).

Baser e colaboradores<sup>18</sup> estudaram o óleo essencial de *Origanum majorana* Linneus coletado em duas localidades diferentes da Turquia. As amostras analisadas continham um alto teor de óleo (6,5 – 7,7%) e um alto teor de carvacrol (78,27 – 79,46%). Estes valores estão de acordo com publicações anteriores e comprovam que a manjerona plantada na Turquia é do tipo fenólica, enquanto que as plantas cultivadas na Europa e em Marrocos, contêm muito menos óleo, pouco ou nenhum composto fenólico e são ricas em cis-sabineno hidratado e terpineol-4.

Além do fator geográfico, pode-se estudar o aroma das plantas aromáticas em função do método de extração.

Segundo Fischer e colaboradores<sup>19</sup>, investigações comparativas de extratos da manjerona, separados usando técnicas de isolamento diferentes, mostraram uma grande influência do método de extração na composição do extrato. Foram utilizadas folhas frescas e folhas frescas congeladas e secas, trituradas sob nitrogênio líquido, de manjerona (*Majorana hortensis* Moench), cultivadas na Alemanha, sob controle agrônomico. As amostras foram submetidas a uma destilação a vapor e extração com solvente simultânea (DES) com pentano, descrita anteriormente por Schultz e colaboradores<sup>20</sup>. Os resultados obtidos mostram que a composição do óleo essencial, ao menos da manjerona e, provavelmente de outras Labiadas também, é determinada principalmente pelas condições de seu isolamento. O cromatograma do extrato de pentano apresentou somente dois picos majoritários, correspondentes ao cis-sabineno hidratado e seu acetato. No entanto, o cromatograma do extrato da destilação-extração apresentou muitos picos intensos, sendo inclusive o terpineol-4 o mais intenso. No aspecto qualitativo os cromatogramas são similares, com exceção de dois estereoisômeros, mentenol e piperitol, ambos ausentes no óleo obtido na primeira extração.

Segundo Fischer e colaboradores<sup>19,21</sup>, parece ser questionável classificar manjerona de diferentes espécies conforme o composto majoritário usando a composição do óleo essencial. Efeitos secundários tais como conteúdo mineral

(cinzas), paredes mais finas das células excretoras e idade da planta entre outros fatores, podem levar a reações de rearranjos, como por exemplo a terpineol-4 ou outro monoterpene. O teor de cis-sabineno hidratado deveria ser aumentado, pois é ele o responsável pelo aroma agradável da manjerona, conseqüentemente, diminuir o do terpineol-4, que é citado como sendo responsável por estragar o aroma.

Em outra publicação<sup>21</sup>, relataram experimentos com extratos obtidos com solventes, usando folhas de manjerona do mesmo cultivo de publicações anteriores<sup>19</sup>, que foram pré-extraídas exaustivamente com n-pentano, seguido de extração com etanol e acetona. Esses extratos têm muito pouco ou nenhum cheiro, isto é, não contém os compostos responsáveis pelo aroma. Entretanto, quando esses dois extratos sofrem hidrólise, aparece um cheiro característico de manjerona confirmado pela presença de cis-sabineno hidratado (37%) e terpineol-4 (28%). A composição dos monoterpenos dos extratos metanólico e acetólico comparados com a do óleo essencial, relatado por Nykänen<sup>16</sup>, são qualitativamente similares. Quando as folhas secas e congeladas dessas amostras foram moídas sob nitrogênio líquido, o cromatograma do extrato de pentano desses pós, apresentou 3 picos bem intensos e característicos do aroma da manjerona, o cis-sabineno hidratado (35%) e seu acetato (32%) e cerca de 1% de terpineol-4.

Além da extração com arraste a vapor ou com solventes orgânicos, outra técnica de extração dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor é a extração com fluido supercrítico. Vários trabalhos<sup>22-25</sup> fazem referência ao estudo do processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de folhas e flores de manjerona, verificando a influência dos parâmetros temperatura e pressão. A extração supercrítica com fracionamento, que usa dois ou mais separadores, permite obter o óleo essencial livre dos resíduos do tecido vegetal, tais como ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, flavonas e esteróis, entre outros.

A qualidade do aroma do óleo essencial, obtido em função da técnica de secagem de amostras de folhas de *Origanum majorana*, foi avaliada por Reverchon e colaboradores<sup>22</sup>. O teor dos compostos responsáveis pelo aroma, cis-sabineno hidratado e seu acetato, diminui em função do aumento da temperatura de secagem. O experimento foi realizado com folhas congeladas, dessecadas sob vácuo e moídas sob nitrogênio líquido, secas à temperatura ambiente e ao ar quente.

Jiménez-Carmona e colaboradores<sup>26</sup> usaram a extração contínua com água subcrítica para obter o óleo essencial de manjerona cultivada na Espanha. O método foi otimizado, estudando-se variáveis como temperatura do extrator, pressão aplicada e fluxo, visando obter o melhor rendimento para o óleo essencial. Os autores compararam este óleo, com o óleo essencial obtido na destilação por arraste a vapor, continha maior concentração dos compostos oxigenados (responsáveis pelo aroma natural da manjerona) em relação aos indesejáveis hidrocarbonetos monoterpênicos.

A atividade antioxidante de algumas plantas aromáticas da família das Labiadas é muito estudada, especialmente porque os extratos dessas plantas exibem alta atividade em baixas concentrações<sup>6,27-35</sup>.

Sarer e colaboradores<sup>27</sup> estudaram as partes floridas de *Origanum majorana* Linneus colhidas em três locais geográficos da Turquia. O óleo extraído foi analisado por CG e CG/EM e sua atividade antimicrobiana foi testada frente a bactérias, leveduras e fungos. O óleo de manjerona exerce um notável efeito contra um tipo de fungo (*Trichophyton mentagrophytes* e *T. concentricum*), o qual causa infecções na pele de humanos.

Daouk e colaboradores<sup>28</sup> citam que Deans e Svoboda, avaliaram a atividade antifúngica do óleo de manjerona, com várias espécies de fungos *Aspergillus* e demonstraram diferentes graus de inibição dos vários tipos de mofo (*A. niger*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*). O óleo apresentou um efeito inibidor maior frente ao *A. niger*, impedindo seu crescimento.

Economou e colaboradores<sup>29</sup> verificaram que o extrato metanólico de manjerona (*O. majorana*) apresentou uma atividade antioxidante moderada quando adicionado ao toucinho e armazenado a 75°C, avaliado pelo índice de peróxido, sendo superado pelos extratos metanólicos de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgare* e *Origanum dictamnus*.

A atividade antioxidante desses mesmos extratos metanólicos foi estudada por Baniyas e colaboradores<sup>30</sup>, em combinação com antioxidantes primários como o BHA (butil hidroxi anisol), BHT (butil hidroxi tolueno), PG (galato de propila) e AP (palmitato de ascorbil). O extrato metanólico da manjerona, quando combinado com BHA, BHT ou AP, apresentou efeito antioxidante adicional e, quando combinado ao

ácido cítrico, o qual age como agente quelante, apresentou maior eficiência sinérgica em relação aos outros extratos.

O óleo essencial e o extrato aquoso de *Origanum majorana*, cultivada no Marrocos, foi testado por Charai e colaboradores<sup>31</sup> quanto à sua atividade antimicrobiana em mofos, leveduras e bactérias. O óleo essencial inibiu totalmente as leveduras e bactérias do ácido láctico. O extrato aquoso apresentou-se menos inibidor que o óleo. A planta inteira também apresentou-se como inibidor, em relação a alguns tipos de mofos, leveduras e bactérias.

Dapkevicius e colaboradores<sup>32</sup> realizaram um estudo da atividade antioxidante de extratos de *Majorana hortensis* Moench, plantada na Lituânia e colhida na época da floração. As amostras foram submetidas à extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, com acetona ou metanol/água e hidrodestilação. Algumas amostras, após a obtenção do óleo essencial, foram desodorizadas, re-extraído com acetona, usando vários métodos de extração. Os extratos obtidos via extração com acetona e com a mistura de metanol/água foram os que exibiram melhor atividade antioxidante.

As propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes de alguns óleos essenciais comerciais de oito plantas, entre elas de *Majorana hortensis* Moench foram avaliadas por Baratta e colaboradores<sup>6</sup>. Nos ensaios para verificar a atividade antioxidante, os autores observaram que esse óleo tem a mais alta atividade. Em ensaios com gema de ovo, a atividade antioxidante da manjerona foi muito mais alta do que a do  $\alpha$ -tocoferol e comparável com a do BHT em todas as concentrações testadas. Os autores também testaram cerca de 25 bactérias, tanto do tipo Gram-positiva como Gram-negativa, sendo que o óleo da manjerona foi um dos três mais ativos inibidores do crescimento dessas culturas. Também mostrou ser capaz de inibir o crescimento do fungo *Aspergillus niger*<sup>6</sup>. A atividade antifúngica do óleo essencial de manjerona também foi testada usando outro tipo de fungo, o *Penicillium digitatum*, que ataca as frutas cítricas. Os resultados demonstraram completa inibição, inclusive a baixas concentrações do óleo essencial ( $\sim 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ )<sup>33</sup>.

O estudo da influência da técnica de secagem das plantas também desperta o interesse, visando se obter óleos essenciais de qualidade<sup>19,21,22</sup>. Nos últimos anos, o forno de microondas tem sido empregado para avaliar o processo de secagem em relação ao aroma do óleo essencial obtido<sup>36,37</sup>.

### 3. ORÉGANO

O orégano (*Origanum vulgare* Linneus) é uma planta perene que se adapta bem em solos secos e calcários. Pode ser distinguido da manjerona por suas brácteas de cor púrpura e por suas folhas ovais e pontiagudas<sup>38</sup>.

Seu caule é ereto, geralmente com uma coloração vermelho pardo, quadrangular, peludo, ramificando-se nas extremidades superiores, formando touceiras. Suas folhas são pecioladas, inteiras, verde-escuro ou ligeiramente acinzentadas, apresentam pelos finos e curtos na face inferior de cada folha. As flores, dependendo da espécie, apresentam diversas cores como vermelhas, púrpuras, rosadas<sup>9</sup>.

Orégano é um dos condimentos mais populares do mundo. É utilizado diariamente na culinária, mas apresenta um sério problema para o estabelecimento da identidade de sua fonte botânica, pois o gênero tem trinta e nove espécies<sup>39</sup>. A grande maioria das espécies *Origanum* é nativa das regiões do Mediterrâneo (Grécia, Irã, Turquia), mas também são cultivadas por toda Europa, ao leste e centro da Ásia, até Taiwan<sup>40-42</sup>. Também é encontrada na América do Norte, onde foi introduzida pelo homem como planta para culinária<sup>43</sup>.

Orégano tem um aroma característico, próprio, produzido por espécies de plantas que produzem óleo essencial com um conteúdo relativamente alto de carvacrol (fenol não cristalizável). Essas espécies são largamente empregadas e têm diferentes nomes vernaculares, denominados de orégano grego (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*), orégano turco (*Origanum onites* L.), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK)<sup>40,43-49</sup>.

O orégano mexicano é da família das Verbenáceas, mas é considerado como condimento “orégano”. Essas espécies diferem entre si na morfologia, principalmente na cor das flores, tipo de cálice, corola e tamanho dos ramos e do arbusto. Folhas secas e inflorescência das diferentes plantas chamadas de orégano são conhecidas como tempero de pizzas, sendo também largamente empregadas como agente flavorizante de alimentos como em saladas, batatas fritas, molhos, salsichas, legumes cozidos e enlatados, entre outros. O *Origanum. dictamnus*, uma

espécie endêmica da Ilha de Creta, Grécia, é empregado como flavorizante em bebidas alcoólicas como o Martini<sup>44</sup>.

O *Origanum vulgare* é uma planta conhecida pelo seu valor medicinal, sendo aceita oficialmente em inúmeros países. Suas flores e folhas são usadas extensivamente em homeopatia. Seu óleo essencial é usado na tradicional medicina indiana como um aroma estimulador e fortificante. Entretanto, tem uso limitado em perfumaria e cosméticos<sup>46</sup>.

Segundo Harvala e colaboradores<sup>49</sup>, o *Origanum dictamnus* que é cultivado na Ilha de Creta, Grécia, tem seu uso como chá citado ao longo dos anos, inclusive na mitologia. A essa planta são atribuídas algumas propriedades, tais como a cicatrização de feridas e úlceras gástricas, indução de partos e abortos e também para estancar hemorragias, além de estimular o sistema nervoso e possuir ação tônica.

A importância do estudo dessas plantas não está só relacionada ao seu uso como condimento, mas também na medicina, principalmente devido as suas propriedades microbiológicas (antibacteriana, antifúngica e antioxidante)<sup>50-67</sup>.

O orégano tem sido muito estudado também em função de possuir propriedade antioxidante, tanto sob a forma de óleo ou de extratos (hexânico, acetônico ou metanólico), como o emprego direto de suas folhas. Economou e colaboradores<sup>51</sup> estudaram o extrato de algumas plantas das Labiadas, entre as quais o *Origanum vulgare* e o *Origanum dictamnus*, sendo que o extrato metanólico do primeiro foi mais efetivo do que os outros na estabilização de banha de porco.

A atividade antioxidante do extrato metanólico dessas plantas, combinando com antioxidantes primários, como o BHA, BHT e AP também foi investigada<sup>53</sup>. Esses extratos mostraram efeito antioxidante aditivo.

Outros estudos<sup>53,54</sup> sobre a atividade antioxidante das folhas de *Origanum vulgare*, foram realizados através de sucessivas extrações com vários solventes, constatando que a fração em éter etílico foi a que apresentou o maior efeito antioxidante, devido, segundo os autores, aos flavanóides presentes neste extrato.

Dentre essas propriedades tão destacadas do orégano, pode-se citar ainda sua atividade antimutagênica, estudada por Kanazawa e colaboradores<sup>55</sup>, entre outros. Os autores destacam em seus estudos a atividade de compostos presentes

(flavanóides – quercetina e galangina) em extratos obtidos em ultra-som, que agem como anti-mutagênico, neutralizando a Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole), um dos 10 pirolisatos identificados como carcinogênicos.

A atividade antifúngica foi investigada quando os autores<sup>53</sup> extraíram o óleo essencial de folhas e flores de *Origanum syriacum* e testaram sua atividade antifúngica com três tipos de fungos, sendo que esse óleo apresentou forte ação inibitória frente aos três.

Muitos artigos mostram que a composição do óleo essencial dessas plantas varia com a origem da planta e outros fatores, principalmente o geográfico e a época de colheita. Putievsky e colaboradores<sup>68</sup> estudaram o rendimento (kg/m<sup>2</sup>) da folhas frescas e do óleo essencial (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>) obtidos de amostras de *Origanum vulgare*, plantado em Israel, considerando o fator época da colheita. Publicaram vários estudos<sup>47,69</sup> levando em conta a colheita efetuada durante a primavera e início do verão, verão e outono. O rendimento das folhas frescas foi maior aos 70 dias após a última colheita e o rendimento do óleo essencial variou muito, tanto em relação a época da colheita, como em relação aos três grupos examinados.

Os condimentos da família das Labiadas, que contém os compostos fenólicos, carvacrol e/ou timol, como por exemplo orégano grego (*Origanum vulgare* Linneus ssp. *Viride*), orégano turco (*Origanum onites*), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) tem grande importância comercial, especialmente na Europa e na América<sup>47</sup>. Os autores estudaram uma série dessas ervas, entre elas *Coridothymus capitatus* Linneus e *Origanum vulgare*, e encontraram, em uma mesma espécie, variedades com alto teor de carvacrol e outras, de timol. Também constataram que o conteúdo de fenóis é sempre mais alto durante o estágio de florescência do que no período de crescimento.

Scheffer e colaboradores<sup>70</sup> investigaram as partes floridas de três espécies de *Origanum* (*O. onites* Linneus, *O. syriacum* Linneus var. *bevanii* e *O. vulgare* ssp. *hirtum*), que crescem ao sul da Turquia. O óleo essencial extraído das três espécies continha alto teor de carvacrol (61 a 72%).

No estudo<sup>69</sup> sobre a influência do florescimento no conteúdo do óleo essencial de *Origanum vulgare* Linneus foi observado que a proporção de timol e  $\gamma$ -terpineno no óleo essencial varia durante os meses de não florescimento das plantas, bem

como durante a época de florescimento, sendo que o aumento no conteúdo de um dos compostos, foi acompanhado de diminuição do outro e vice-versa, embora esses fatores não influenciassem nos outros dois principais compostos: carvacrol e p-cimeno.

Kokkini e colaboradores<sup>71</sup> estudaram a variação geográfica dos caracteres morfológicos e químicos (óleos essenciais) do *Origanum vulgare* Linneus a espécie mais comum do gênero na Grécia. Este estudo levou a sugerir a presença de três ssp.: *vulgare*, *hirtum* e *viridulum* que estão relacionadas com os caracteres morfológicos diferenciados, como por exemplo, glândulas visíveis ou não nas folhas, tamanho das brácteas e cálice, cor das brácteas e corolas, etc. Por outro lado a composição química (qualitativa e quantitativa) do óleo essencial varia muito de uma espécie para outra.

Vinte e três espécies de *Origanum* (*O. onites*, *O. majorana*, *O. minutiflorum*, *O. vulgare* e *O. syriacum*), cultivados na Turquia, todas de grande importância comercial foram investigadas<sup>72</sup>. Todas apresentaram sempre o carvacrol como composto majoritário e seu isômero timol, o segundo. Somente duas amostras do *O. onites* tiveram o linalol como seu composto majoritário (90,0 – 91,9%).

Baser e colaboradores<sup>73</sup> relataram estudos de vinte e quatro amostras, de vinte e três localidades da Turquia, do *Origanum vulgare*, ssp. *hirtum*, entre os meses de maio e outubro, cujo rendimento em óleo variou de 1,3 a 6,5%, sendo o carvacrol o composto de maior percentual em quase todas as amostras, variando de 23,43 a 78,73%, o timol em segundo, com um máximo de 39,81%, seguidos do p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno.

A composição do óleo essencial de quatro ssp. (*hirtum*, *gracile*, *vulgare* e *viride*) de *Origanum vulgare* Linneus originários da Turquia foram investigadas por Sesik e colaboradores<sup>74</sup>, que constataram haver variação dos componentes majoritários entre as quatro ssp.: *hirtum* (rica em carvacrol - 70,47%), *gracile* (rica em  $\beta$ -cariofileno - 17,54% e germacreno D - 12,75%), *vulgare* (rica em terpineol-4 +  $\beta$ -cariofileno - 20,94% e germacreno D - 17,80%) e *viride* (rica em terpineol-4 - 16,82% e germacreno D - 5,87%). Com esse trabalho foi comprovado que, além dos fatores climáticos e geográficos, as ssp. também influenciam no rendimento do óleo essencial, tanto na quantidade como na qualidade do produto e dos compostos

majoritários. Somente o *Origanum vulgare*, ssp. *hirtum* é largamente empregado como condimento na Turquia, enquanto as outras ssp. são usadas pela medicina popular com fins terapêuticos.

Outra espécie de *Origanum syriacum* Linneus, ssp. *bevanii*, da Turquia também mereceu destaque nos estudos. Tümen e colaboradores<sup>75</sup> encontraram nas flores e nas partes aéreas dessa planta o carvacrol (64,1% e 42,46%) como seu composto majoritário, comparando com amostras de Israel e do Egito, que continham, timol (59,87%) ou carvacrol (80,17%) e carvacrol (76,7%), respectivamente.

Estudos<sup>40</sup> relatam que na Grécia foram identificadas três ssp. do *Origanum vulgare* (*hirtum*, *vulgare* e *viridulum*), sendo que além de diferenças morfológicas, também apresentam rendimento em óleo essencial diferenciado. O *hirtum* cresce na zona climática do Mediterrâneo é rico em óleo essencial, enquanto que o *viridulum* e o *vulgare* crescem na zona tipicamente continental e são pobres em óleo essencial. A altitude parece ser um dos fatores ambientais que mais influenciam na quantidade de óleo essencial.

Um outro estudo<sup>46</sup> sobre a diferença de aroma entre sementes de *Origanum heracleoticum* Linndus uma espécie quimicamente não uniforme, originárias da Grécia e plantadas em Israel, resultou em três variedades que, apesar de terem aparência similar, diferenciaram no aroma. Uma tinha o aroma semelhante a manjerona (sweet marjoram), porém mais acre, enquanto as outras duas tinham um caráter pronunciado de orégano. Dessas duas variedades uma era rica em carvacrol e a outra em timol. Segundo os autores os fenóis são componentes necessários para identificar um condimento como orégano.

Vokou e colaboradores<sup>43</sup> estudaram a ssp. *hirtum*, cultivada na Grécia e verificaram que altos valores de óleo essencial (rico em carvacrol) são encontrados em plantas que crescem em baixas altitudes e regiões mais ensolaradas na costa do Mediterrâneo, apesar de ser encontrado na região montanhosa.

O óleo essencial, obtido por hidrodestilação das folhas de *Origanum dubium*, foi analisado pela primeira vez por CG e CG/EM por Chr. Souleles<sup>76</sup>. Os compostos majoritários identificados foram o linalol (35,5%) e 1,8-cineol (32,2%). Os autores destacaram que o óleo essencial de *Origanum dubium* difere da maioria das

espécies *Origanum*, que crescem na região do Mediterrâneo, tanto em relação ao quimiotipo, quanto na qualidade e quantidade obtidas, pois a maioria dos oréganos cultivados na Grécia contém o carvacrol e ou timol como compostos majoritários.

*Origanum hirtum* Linneus cultivada na Grécia foi analisada via CG/EM por Kokkini e colaboradores<sup>77</sup>, sendo encontrado uma grande variação quantitativa. As plantas cultivadas ao norte da Grécia tinham alto conteúdo de timol (30,3 – 42,8%) enquanto as do sul continham carvacrol (57,4 – 69,6%) e algumas com alto conteúdo de p-cimeno (38 – 51%). As amostras foram coletadas no outono em seis localidades diferentes.

Russo e colaboradores<sup>78</sup> avaliaram a composição química do óleo essencial de vinte e quatro amostras de *Origanum vulgare*, variedade *hirtum*, que cresce ao sul da Itália por CG/EM. Num total de 56 compostos identificados, os compostos majoritários foram carvacrol (0,12 – 56,63%) e timol (7,91 – 53,62%).

Esta mesma planta, mas cultivada no norte da Itália, *Origanum vulgare*, variedade *hirtum*, foi analisada por Bochini e colaboradores<sup>79</sup>. Os autores concluíram que, do ponto de vista taxonômico, é difícil estabelecer uma correspondência entre as subespécies de *Origanum vulgare* e a composição do seu óleo essencial. Neste estudo encontraram um grupo de orégano com alto conteúdo de timol-carvacrol, outro com linalol e grande variedade entre os sesquiterpenos e, um terceiro grupo com grande quantidade de sesquiterpenos<sup>79</sup>.

García e Sanz<sup>80</sup> analisaram os componentes voláteis de *Origanum vulgare*, subespécie *virens*, cultivado na Espanha, por dessorção térmica direta via CG/EM. O método é rápido e requer pouca quantidade de amostra. Essas amostras tinham um alto conteúdo de linalol, mirceno, cariofileno e germacreno-D. Não foram encontrados carvacrol e timol.

Outra técnica de extração, além da com arraste a vapor e com solventes orgânicos, que tem despertado o interesse dos pesquisadores, é a extração com fluido supercrítico. Vários trabalhos<sup>81-87</sup> utilizando folhas ou o óleo essencial de orégano, destacam o estudo do processo de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, verificando a influência dos parâmetros temperatura e pressão. A extração por fracionamento, que usa dois ou mais separadores permite obter o óleo essencial

livre dos resíduos do tecido vegetal, tais como ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, flavonas e esteróis, entre outros<sup>84,85</sup>.

Ondarza e Sanchez avaliaram a qualidade do óleo essencial e a fração de óleo-resina das folhas de *O. vulgare* mexicano, obtidos por EFS e destilação a vapor. O extrato da EFS, continha maior quantidade dos compostos responsáveis pelo aroma do óleo (hidrocarbonetos oxigenados) comparado com o de destilação a vapor<sup>81</sup>.

Alguns autores<sup>82-85</sup> têm se dedicado a estudar os parâmetros que afetam os coeficientes de distribuição dos principais componentes presentes no óleo essencial de *Origanum vulgare*. A fração dos hidrocarbonetos monoterpênicos mostrou-se dependente do tempo de equilíbrio, temperatura e densidade do solvente.

Simándi e colaboradores<sup>86</sup> estudaram a separação do óleo volátil de outros compostos lipofílicos de folhas de *Origanum vulgare*, cultivadas na Hungria e Turquia. Usaram EFS através do fracionamento ou de várias etapas de precipitação, e compararam com os resultados de extrações clássicas (arraste a vapor e Soxhlet).

O pré-tratamento da amostra (tamanho das partículas da amostra, conteúdo de água, densidade aparente, exposição à atmosfera e sob N<sub>2</sub>, entre outras) foi avaliado por Gaspar e colaboradores<sup>87</sup>. A amostra pré-tratada criogenicamente foi a que apresentou maior conteúdo de óleo essencial nas amostras de orégano.

## **4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO**

### **4.1. EXTRAÇÃO POR ARRASTE DE VAPOR**

Este é um processo dos mais usados no Brasil em nível industrial. A destilação por arraste de vapor de água se caracteriza pela sua extrema simplicidade: o material a ser extraído, geralmente moído ou triturado, é colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão. Como os óleos essenciais têm tensão de vapor mais elevada que a água, acabam sendo arrastados pelo vapor de água e a mistura de vapores é conduzida a um condensador, onde os vapores voltam ao estado líquido e são recolhidos em um separador.

O óleo essencial, que é uma mistura de substâncias orgânicas imiscíveis em água, separa-se, formando um sistema de duas fases. A operação seguinte consiste na retirada do óleo pelo processo de decantação, depois deve ser seco com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e concentrado sob nitrogênio, após o que ele está pronto para uso<sup>2</sup>.

Em escala laboratorial, emprega-se o aparelho Clevenger, que oferece algumas vantagens em relação à destilação convencional, como ser mais compacto e permitir determinações mais acuradas do teor de óleo, uma vez que se utilizam quantidades muito pequenas da planta<sup>88-90</sup>.

A extração de óleos essenciais de plantas aromáticas, como a manjerona e o orégano, utilizando a destilação com arraste de vapor do tipo Clevenger ainda é a técnica mais utilizada. Na revisão bibliográfica, inúmeras publicações fazem referência ao uso dessa técnica, apesar de muitos reportarem que o calor, a vaporização e o pH provocam reações de rearranjo, ciclização e oxidação em alguns compostos presentes no óleo.

#### **4.2. EXTRAÇÃO COM SOXHLET<sup>91</sup>**

A extração com solventes orgânicos apolares (hexano, éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano) ou polares (acetato de etila, metanol ou etanol) é outra técnica de extração utilizada para se obter o extrato bruto de plantas. É um método de extração contínua de sólidos com solventes de baixo ponto de ebulição, que utiliza o extrator de Soxhlet em escala laboratorial. Tem a desvantagem de consumir grandes volumes de solventes e levar um tempo de extração longo, de até 72 horas. Assim, os componentes extraídos podem ser afetados pela decomposição térmica ou pela reação com os solventes<sup>4,5</sup>.

#### **4.3. EXTRAÇÃO COM MACERAÇÃO<sup>92</sup>**

A maceração é uma técnica na qual a extração da planta é realizada em um recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um longo período (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do solvente extrator. Esta técnica também utiliza os solventes orgânicos em função da polaridade. Pela sua natureza,

não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Apresenta menor risco de reações químicas na formação de artefatos, decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas utilizadas pelo sistema Soxhlet<sup>4,5</sup>.

#### **4.4. EXTRAÇÃO COM ULTRA-SOM<sup>55</sup>**

A extração ultra-sônica é uma técnica alternativa ao Soxhlet e que tem sido aplicada para extração de compostos orgânicos de material particulado<sup>93</sup>.

A eficiência de recuperação encontrada, usando esta técnica, tem sido igual ou melhor do que a obtida na extração por Soxhlet<sup>94,95</sup>. A extração por ultra-som apresenta uma série de vantagens<sup>96,97</sup>, tais como a alta reprodutibilidade da técnica, sua utilização para uma ampla faixa de tamanho de amostra, rapidez no processamento da amostra, uso de pouca quantidade de solvente, baixo custo e pequeno número de interferentes.

O ultra-som é um processo criado pelas ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à capacidade do ouvido humano. Essas ondas sonoras criam uma vibração única que causa uma variação na pressão do líquido, que é a cavitação<sup>98</sup>.

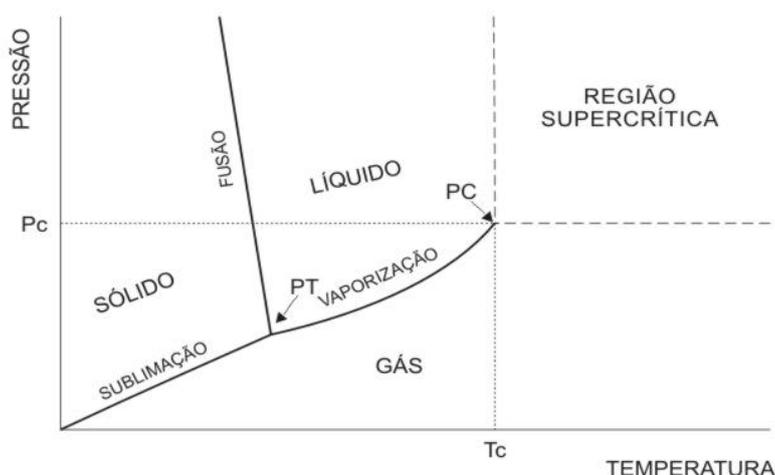
A cavitação consiste na criação e implosão de micro-bolhas de gás no centro do líquido. A variação de pressão cria, em um ponto do líquido, momentos de compressão e decompressão (rarefação) alternados<sup>99</sup>. A cavitação pode ser afetada por diversos parâmetros, tais como: frequência, intensidade de irradiação, tipo de solventes empregados e temperaturas aplicadas<sup>100</sup>.

Nesta técnica a amostra moída é misturada ao solvente e colocada em um recipiente, que é imerso em um banho de ultra-som. A amostra é submetida, geralmente, a vários solventes em ordem crescente de polaridade, dependendo da classe de compostos a serem extraídos, a um tempo determinado (muito menor do que na extração com Soxhlet) e a uma frequência própria do banho. Após, o extrato é submetido à filtração e concentração<sup>4,5</sup>.

## 4.5. EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

A extração com fluido supercrítico (EFS) é uma técnica de extração cujo solvente extrator encontra-se em um estado denominado supercrítico. Neste estado, as substâncias são mantidas acima da sua temperatura e pressão críticas (**Figura 2**). A temperatura crítica é a temperatura mais alta, na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. Por sua vez, a pressão crítica é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura<sup>101,102</sup>.

Na região supercrítica, a substância possui propriedades físicas e de transporte intermediárias entre os estados líquido e gasoso, tornando vantajoso o emprego de fluidos supercríticos em processos de extração, purificação e fracionamento, dentre outros<sup>103</sup>.



**Figura 2** – Diagrama Pressão x Temperatura para uma substância pura.

*PT = Ponto Triplo e PC = Ponto Crítico*

A **Tabela I** apresenta um quadro resumo dos solventes mais utilizados em extração com fluidos supercríticos, junto com seus parâmetros críticos  $P_c$ ,  $T_c$  e  $\rho_c$  (densidade crítica)<sup>103,104</sup>.

**Tabela I** – Condições críticas para as substâncias supercríticas mais utilizadas na EFS

Solvente	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (atm)	Densidade crítica (g cm <sup>-3</sup> )
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

A **Tabela II** apresenta os valores característicos de algumas propriedades de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Nesta **Tabela** observa-se que a densidade é comparável a de um líquido, a difusibilidade é intermediária e sua viscosidade fica próxima a dos gases. Como resultado, a combinação dessas propriedades proporciona um maior poder de penetração em matrizes porosas vegetais e a conseqüente solubilização de solutos com maior facilidade<sup>102,103,105,106</sup>.

A alta difusibilidade e a baixa viscosidade, características dos fluidos supercríticos, facilitam uma rápida transferência de massa durante a extração. Os solutos em fluídos supercríticos, quando comparados aos solventes líquidos apresentam alta difusão e baixa viscosidade, o que na prática significa propriedade de transferência de massa semelhante à dos gases, e densidade altas, ou seja, um poder de solvatação semelhante ao dos líquidos<sup>102,103</sup>.

**Tabela II** – Propriedades físico-químicas dos líquidos, fluidos supercríticos e gases.

Estado Físico	Densidade (g cm <sup>-3</sup> )	Viscosidade (g cm <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Difusibilidade (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Líquido	0,6 – 1,6	(0,2 – 3,0) x 10 <sup>-2</sup>	(0,2 – 2,0) x 10 <sup>-5</sup>
Supercrítico	0,2 – 0,5	(1,0 – 3,0) x 10 <sup>-4</sup>	0,7 x 10 <sup>-3</sup>
Gás	(0,6 – 2,0) x 10 <sup>-3</sup>	(1,0 – 3,0) x 10 <sup>-4</sup>	0,1 – 0,4

A associação destas características no fluido supercrítico fez com que esta metodologia se tornasse muito atrativa como técnica de extração, principalmente quando acoplada a técnicas eficientes de separação de misturas complexas como a cromatografia gasosa<sup>107,108</sup>.

A EFS baseia-se na observação de que pequenas variações na temperatura e/ou na pressão nas proximidades do ponto crítico causam grandes variações na densidade e, portanto, no poder solvente do fluido. Esta é uma característica que torna o processo de EFS extremamente seletivo, permitindo sua utilização inclusive em processos de difícil separação<sup>108-111</sup>.

#### 4.5.1. Técnica

A EFS é uma técnica de interesse analítico, sendo utilizada pela indústria de alimentos, na manufatura de produtos descafeinados (chá, café), desengordurados e desodorizados (óleos vegetais, batatas fritas e salgadinhos, etc.), na refinação de óleos vegetais, etc.. No entanto, poucos trabalhos sobre EFS de produtos naturais envolvem estudos em escala preparativa ou semi-preparativa, sendo que a maioria dos trabalhos publicados envolvem sistemas complexos e de alto custo<sup>112</sup>.

Reverchon e Senatore<sup>113</sup> demonstraram que o uso dos fluidos supercríticos na extração de compostos orgânicos de matrizes complexas traz vantagens sobre métodos tradicionais, evitando a degradação térmica que ocorre na destilação a vapor e a poluição causada pelo uso de solventes orgânicos utilizados na extração com solventes. as quais, apesar de serem largamente empregadas, apresentam

várias desvantagens que podem influenciar de forma negativa a eficiência da extração e a composição final do extrato, levando a perda ou degradação do analito.

A extração com CO<sub>2</sub> supercrítico é uma técnica que utiliza o poder solvente do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em temperatura e pressão próximas e acima do ponto crítico. O CO<sub>2</sub> é o solvente mais largamente empregado em processos de EFS devido ao seu baixo custo, a sua temperatura crítica amena, ligeiramente superior à temperatura ambiente (31,1°C), a sua pressão crítica (72,85 atm), facilmente alcançável, não é inflamável, é inodoro, quimicamente inerte e não causa risco ambiental<sup>102,103,106</sup>.

Esta técnica, também tem sido aplicada na análise de alimentos, conforme cita Blanch e colaboradores<sup>114</sup>, principalmente para determinar a composição química de diferentes produtos, como a análise de aditivos e contaminantes dos alimentos. A EFS tem sido usada mais recentemente como técnica de extração em escala analítica, trazendo um incremento para a Química Analítica, como um método de preparação de amostra para cromatografia, tanto para preparação da amostra (off-line), como para substituir o processo normal de injeção de amostra no cromatógrafo (on-line ou acoplado).

Em várias publicações<sup>105-120</sup> consta que, quando comparada com os métodos convencionais de extração, a EFS apresenta características relevantes como:

- redução de tempos de extração;
- elevado potencial de solubilidade de compostos orgânicos, de médio e alto peso molecular, quando comparados com os fluidos na fase vapor;
- facilidade de eliminação do solvente após a extração;
- possibilidade de controle rigoroso das variáveis do processo;
- uso de solvente não tóxico e de baixo custo como o CO<sub>2</sub>;
- possibilidade de extração de compostos termolábeis devido às baixas temperaturas críticas de alguns solventes;
- maior seletividade e eficiência do processo devido à influência das interações intermoleculares;
- maior eficiência energética do processo, pois opera, em muitos casos, a baixas temperaturas;

- possibilidade de análise direta de matrizes complexas, reduzindo o risco de perda e de contaminação;
- possibilidade de extração seletiva por classe de compostos, ajustando valores da pressão e da temperatura;
- possibilidade de acoplamento com outros equipamentos analíticos, permitindo a determinação *on-line*.

Assim muitas substâncias, que são termicamente instáveis, contidas nos óleos essenciais, podem ser extraídas pelo CO<sub>2</sub> supercrítico. Contudo, substâncias indesejáveis de alto peso molecular, como compostos não-voláteis (ácidos graxos, ceras, pigmentos, resinóides, etc.) são co-extraídos. Para minimizar a ocorrência de tal fato, deve-se estabelecer as melhores condições de operação, realizando as análises a diferentes pressões e/ou temperaturas, extraindo desta forma diferentes frações.

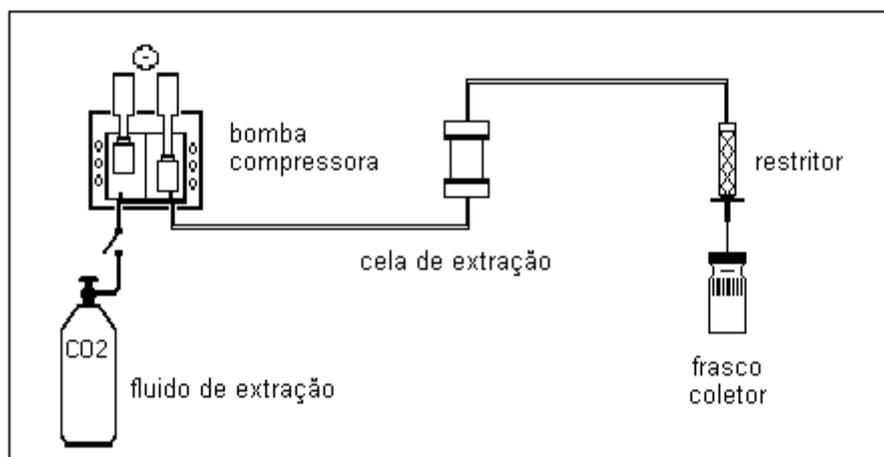
#### 4.5.2. Equipamento

A **Figura 3** mostra um sistema de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, formado basicamente de cinco componentes: (A) fonte de CO<sub>2</sub>, (B) bomba de alta pressão, (C) cela de extração, (D) restritor de pressão e (E) coletor, além dos sistemas controladores de temperatura e pressão.

Neste sistema de extração, o CO<sub>2</sub> do cilindro é transportado à bomba, onde é comprimido à pressão desejada. Na cela extratora o fluido é aquecido à temperatura pré-estabelecida e um sistema de válvulas permite a extração no modo estático e/ou dinâmico.

No modo estático, uma quantidade fixa do fluido é usada para interagir com o soluto/matriz, mantendo a amostra sob pressão constante, a uma temperatura e tempo determinados. No modo dinâmico, o fluido supercrítico passa continuamente através da matriz, que é mantida à temperatura e pressão constantes, a uma velocidade (fluxo) previamente selecionada.

Dessa maneira, a passagem do fluido pela amostra, dissolve e arrasta alguns de seus componentes, que são então direcionados para o restritor onde ocorre a expansão<sup>102-104</sup>.



**Figura 3** – Esquema de um sistema de extração com fluido supercrítico.

## 5. ANÁLISE INSTRUMENTAL

### 5.1. CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase fixa, denominada fase estacionária e outra, que percola através da fase estacionária, denominada fase móvel. É uma técnica usada para separação e quantificação de espécies químicas<sup>121</sup>.

Nesta técnica, as amostras devem ser gases ou substâncias que possam ser volatilizadas. Assim, a amostra é introduzida em uma coluna que contém a fase estacionária, através de um injetor. A determinadas temperaturas as substâncias vaporizam e, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas em determinados tempos, chegando à saída da coluna em tempos diferentes. Um detector adequado, colocado na saída da coluna, permite a detecção e quantificação dessas substâncias<sup>122</sup>.

A cromatografia gasosa é o método de escolha para separar e quantificar os componentes dos óleos essenciais. A identificação desses compostos é feita geralmente comparando o tempo de retenção relativo da amostra com o de padrões<sup>5,123</sup>.

Outra maneira, seria através do Índice de Kovats (IK), que relaciona o tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos com o tempo de retenção dos compostos da amostra. Várias publicações apresentam listas de IK dos compostos voláteis, característicos dos óleos essenciais, o que permite comparar com a amostra. Deve-se usar pelo menos duas colunas de diferentes polaridades, pois algumas substâncias apresentam o mesmo, ou próximo, IK, para uma mesma coluna<sup>5,123,124</sup>.

A fração volátil de condimentos é formada por um grande número de compostos, com estruturas químicas diversas e uma faixa ampla de concentração. Os componentes não voláteis devem ser isolados da matriz para que os componentes voláteis possam ser analisados por CGAR.

Vários métodos tentam extrair todos os voláteis da amostra com um máximo de recuperação e um mínimo de decomposição. *Headspace* e *purge and trap* são os métodos mais populares. Recentemente um método de injeção direta, a dessorção térmica automática tem sido introduzida para amostras farmacêuticas, ambientais, polímeros, tintas e outras<sup>125</sup>.

Esteban e colaboradores<sup>125</sup> aplicaram a dessorção térmica automática para analisar componentes voláteis em alimentos por CG e CG/EM. A grande vantagem desse método é a boa reprodutibilidade, baixa formação de artefatos, ausência de solventes e a necessidade de pequenas quantidades de amostra.

## **5.2. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)**

CG/EM é outra técnica muito utilizada pelos pesquisadores para análise dos óleos essenciais, pois, além de permitir a separação dos componentes, fornece um espectro de massas para cada pico. Esse espectro indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. Pela massa molecular obtém-se dados sobre a classe de

substâncias (por exemplo,  $m/z = 136$  corresponde a monoterpenos de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ ). Enquanto que o padrão de fragmentação serve para comparar com os dados constantes na biblioteca de espectros de massas do computador. Uma vez feita a comparação, o computador mostra as probabilidades quanto à identidade da substância analisada.<sup>5,126</sup>

Na realidade, CG/EM é um sistema de introdução da amostra, na qual o EM é o detector. De fato, em CG/EM o vapor que vem do CG passa através de uma interface até a câmara de ionização do EM. Dessa maneira é possível obter um espectro de massas de cada componente da mistura que foi injetada no CG<sup>127</sup>.

Os recentes avanços das técnicas analíticas instrumentais, aliados à simplicidade, rapidez e precisão da CG, tornaram-na uma das técnicas mais difundidas para análises químicas, quer seja na indústria ou nos laboratórios de pesquisa científica.

### **5.3. CROMATOGRAFIA CAPILAR ELETROCINÉTICA MICELAR (CCEM)**

Eletroforese capilar é uma técnica analítica de separação baseada na migração de espécies carregadas eletricamente, que se separam em função da diferença da mobilidade de cada soluto, quando submetidos a um campo elétrico de alta voltagem (0 – 50 kV). O movimento dessas espécies, dentro de um capilar semelhante ao que se usa como coluna em cromatografia gasosa, é dependente da carga e do tamanho dessas espécies. O sistema de detecção usado, na maioria dos equipamentos comerciais é o detector ultravioleta/visível com arranjo de diodo ou de fluorescência. Atualmente tem-se utilizado também o detector de massas (EC/EM), que permite uma melhor identificação dos compostos separados<sup>128-131</sup>.

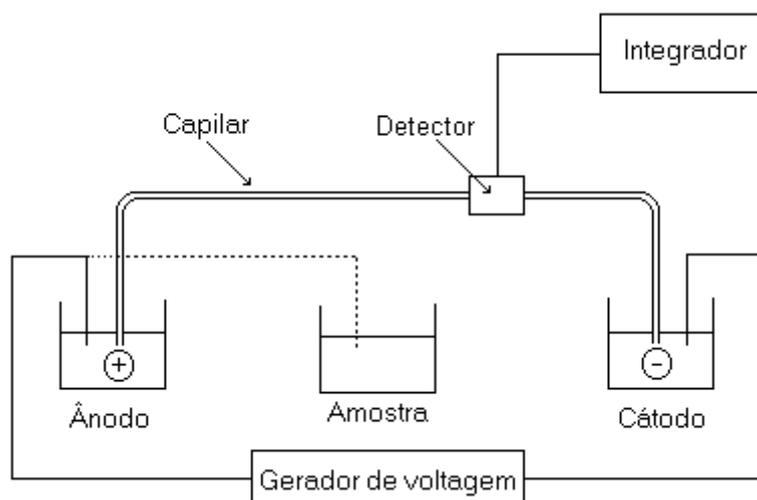
A cromatografia capilar eletroforética surgiu nos finais dos anos 60 como Eletroforese Capilar de Zona (ECZ), inicialmente conhecida como Eletroforese Capilar de Soluções Livres (ECSL), quando em 1967 Hjertén<sup>132</sup> utilizou capilares com diâmetro interno de 3 mm empregando campos elétricos altos. Em 1974 Virtanen<sup>133</sup> descreveu as vantagens de se usar capilares de diâmetros menores. Mikkers<sup>134</sup>, em 1979, introduziu o uso de capilares de teflon com diâmetros internos de 200  $\mu\text{m}$ . Embora o uso desses capilares de diâmetros cada vez mais reduzidos

trouxesse algumas vantagens, como por exemplo à redução dos fenômenos devidos a convecção, foi somente em 1981, com os trabalhos de Jorgenson e Luckacs<sup>135-137</sup>, nos quais foram empregados capilares de vidros de 75  $\mu\text{m}$ , que se pode considerar como o começo da eletroforese capilar. Com essas publicações ficou demonstrado a alta resolução da técnica ECZ, a separação rápida de misturas complexas e um melhor entendimento dos aspectos teóricos. Como os capilares de vidro impediam a detecção UV/visível em comprimentos de onda menores que 280 nm, foi necessário o uso de capilares de sílica fundida por serem transparentes em comprimento de ondas na região do UV.

Nas últimas décadas esta técnica tem se desenvolvido muito rapidamente devido às vantagens que oferece, descritas anteriormente, principalmente pelas publicações de mais de 90 revisões entre os anos 90 e 92 e pelo aumento das publicações nos últimos 10 anos, como também a introdução de novos modos de cromatografia capilar que utilizam o mesmo equipamento<sup>138</sup>.

### 5.3.1 Equipamento

A **Figura 4** apresenta um esquema básico de um sistema de eletroforese capilar. Um capilar, cheio da solução tampão é conectado a dois recipientes cheios com a mesma solução. Este capilar, geralmente de sílica fundida é similar ao que se usa em cromatografia gasosa, possui comprimento variando entre 50 a 100 cm e diâmetro interno entre 25 a 100  $\mu\text{m}$ . Nos dois recipientes que contém o eletrólito existem eletrodos de platina conectados a um gerador de alta voltagem. Após encher o capilar com o eletrólito, a amostra é introduzida no extremo positivo (ânodo) do capilar (~1 a 20 nL de solução). Ao se aplicar um campo elétrico, os íons migram através do capilar a diferentes velocidades e direções, até chegar no eletrodo negativo (cátodo), passando pelo detector de ultravioleta<sup>131,138-140</sup>.



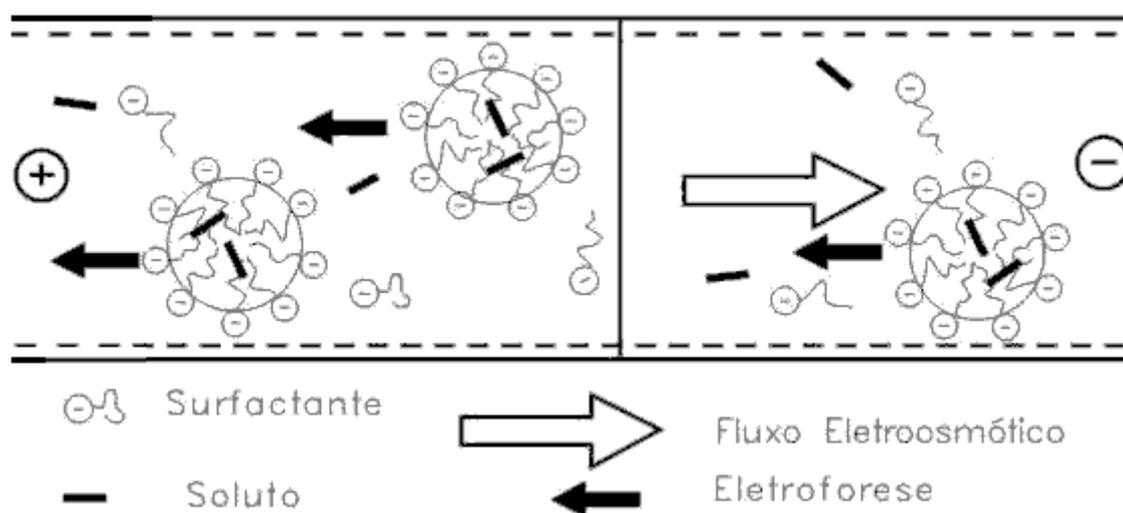
**Figura 4** - Esquema básico de um sistema de eletroforese capilar.

### 5.3.2. Técnica

A eletroforese foi empregada por muito tempo como técnica de separação de substâncias iônicas ou que podem ser ionizadas nas condições de análises. Atualmente, devido ao surgimento dos mais distintos modos de separação em eletroforese capilar, esta técnica pode ser aplicada tanto a substâncias carregadas eletricamente, como neutras. Em 1984, Terabe et al<sup>141</sup>, desenvolveu um novo tipo de método de separação, a Cromatografia Eletrocínética (CEC), que combina eletroforese e cromatografia. A CEC usa a técnica de CEZ, mas seu princípio de separação é o mesmo da cromatografia. Entre os vários modos de CEC, a Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar (CCEM), que usa uma solução micelar de um surfactante iônico no lugar do tampão como em CCEZ, tornou-se a mais utilizada.

Assim, para separação de pequenas moléculas neutras, a CCEM é atualmente a técnica mais empregada, existindo inúmeros trabalhos publicados com suas características fundamentais e aplicações<sup>142-146</sup>.

Em CCEM utilizam-se soluções surfactantes iônicas, que, quando adicionadas a um eletrólito, numa concentração maior que sua concentração micelar crítica, formam micelas. A **Figura 5** apresenta um esquema da CCEM, usando como exemplo um surfactante aniônico, o dodecil sulfato de sódio (DSS). As micelas formadas possuem uma superfície muito polar (parte hidrofílica) que está carregada negativamente e, outra hidrofóbica<sup>131,138,147</sup>.



**Figura 5** - Esquema da CCEM, usando como exemplo um surfactante aniônico, o dodecil sulfato de sódio (DSS).

Quando um analito neutro é injetado numa solução micelar, uma fração dele fica dentro da micela (parte hidrofóbica) e desloca-se junto com a micela, na mesma velocidade. Parte do analito que não se agrega na micela, migra mais lentamente, a uma velocidade eletrosmótica. A velocidade de migração do analito depende do coeficiente de distribuição entre a fase micelar e a fase aquosa. A diferença relativa dos coeficientes de distribuição entre dois analitos pode ser manipulado, trocando o tipo de surfactante e usando modificadores e/ou aditivos. Por isso, há vários fatores que podem influenciar o deslocamento das moléculas e separação dos analitos, como por exemplo a voltagem aplicada, a concentração do eletrólito, temperatura, pH, corrente, capilar (tipo, diâmetro, limpeza, acondicionamento), tipo (estrutura) do surfactante, concentração do modificador da micela. A adição de solventes

orgânicos e/ou a adição de ciclodextrinas (CDs) à solução micelar são os fatores que têm despertado maior interesse e estudo<sup>131,138,146,147</sup>.

As CDs são oligosacarídeos cíclicos formados por seis, sete e oito unidades de glicose, chamadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD, respectivamente. **A Tabela III** apresenta as principais propriedades físico-químicas dessas CDs. Pela tabela pode ser observado dois fatores importantes para a escolha da ciclodextrina a ser usada para se ter uma separação efetiva: o diâmetro da cavidade interna e a solubilidade em água<sup>132,147</sup>.

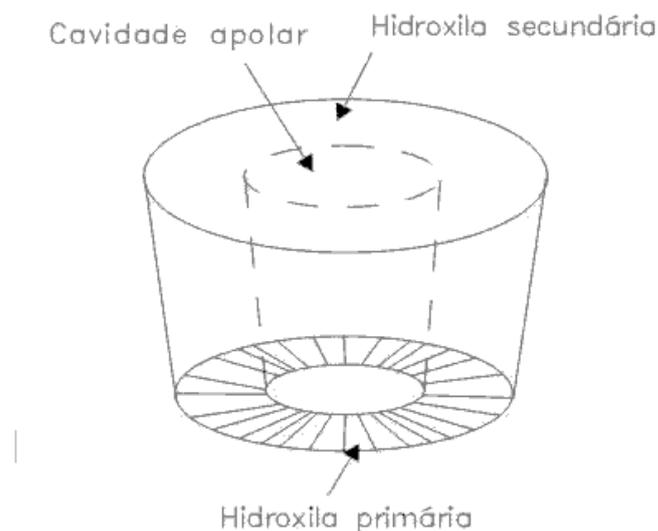
**Tabela III** – Propriedades físico-químicas das CDs.

Ciclodextrina	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nº de unidades de glicose	6	7	8
Peso molecular	972,9 g	1135,0 g	1297,2 g
Diâmetro interno da cavidade	0,47-0,52 nm	0,62-0,64 nm	0,75-0,83 nm
Diâmetro total	1,46 nm	1,54 nm	1,75 nm
Altura da cavidade	0,79-0,80 nm	0,79-0,80 nm	0,79-0,80 nm
Solubilidade em água, 25 °C	14,50 g L <sup>-1</sup>	18,5 g L <sup>-1</sup>	23,20 g L <sup>-1</sup>

A **Figura 6** apresenta o desenho esquemático da estrutura básica das CDs. Essas moléculas têm um formato de cone com uma cavidade apolar. A cavidade tem caráter hidrofóbico, assim ela pode incluir compostos em seu interior e formar complexos. A estabilidade dos complexos de inclusão formados com CDs depende de fatores como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, efeitos do solvente e tamanho e forma das moléculas. A efetividade no uso das CDs para aumentar a seletividade depende do tamanho e da geometria da molécula hospedada, em relação às dimensões da cavidade da CD. As CDs têm sido utilizadas em separações eletroforéticas, nos diversos modos de eletroforese capilar, principalmente em CCEM, dando origem a outro modo de eletroforese capilar, CD-CCEM<sup>138,139,148</sup>.

Em CD-CCEM, as CDs são eletricamente neutras e não têm mobilidade eletroforética. Como sua parte externa é hidrofílica, pode-se assegurar com certeza que elas não se incorporam nas micelas, formando com a solução micelar outra fase, migrando na mesma velocidade da solução, sendo capaz de solubilizar

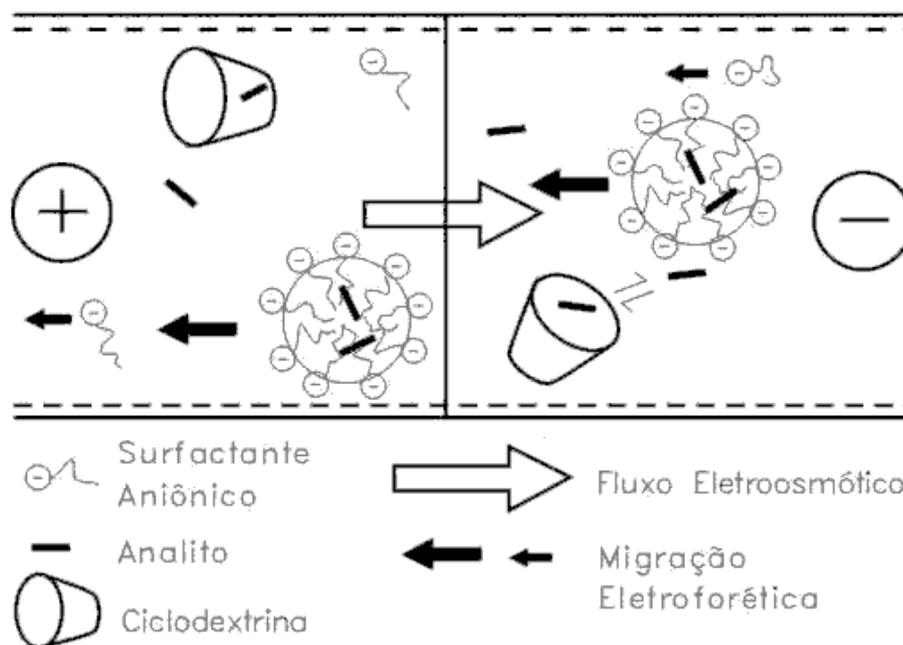
seletivamente certos tipos de analitos, dependendo do seu tamanho, forma e hidrofobicidade<sup>138,148, 150,151</sup>.



**Figura 6** - Desenho esquemático da estrutura básica das CDs.

O princípio da separação da CD-CCEM, quando CDs são adicionadas à solução micelar é apresentado na **Figura 7**.

Neste sistema, o analito é distribuído nas três fases, a micela, a CD e a fase aquosa do eletrólito, apesar da CD não ser uma fase verdadeira, sendo às vezes considerada como pseudo-fase. A molécula do analito, incluída na cavidade da CD, desloca-se na mesma velocidade do fluxo eletroosmótico (FEO). Portanto, a adição de CD reduz o coeficiente de distribuição aparente entre a fase total e a micela, permitindo assim, a separação de compostos altamente hidrofóbicos, que seriam totalmente incorporados na micela, na ausência da CD. Quanto maior a concentração da CD, menor é o coeficiente de distribuição. Portanto, em CD-CCEM, o fator de capacidade pode ser selecionado, variando tanto a concentração da CD, quanto do surfactante<sup>138,144,147-149</sup>.



**Figura 7** - Esquema do princípio da separação da CD-CCEM, mostrando a interação do analito com CDs e com um surfactante aniônico.

A seletividade pode ser ajustada e a resolução melhorada em CD-CCEM pelo uso de outros aditivos, como por exemplo, modificadores orgânicos (solventes orgânicos) como: metanol, acetonitrila, THF, DMSO, propanol-2, glicol, glicerol, entre outros. A adição do solvente orgânico à solução tampão altera sua polaridade e viscosidade, modificando tanto o FEO, quanto a mobilidade eletroforética dos analitos. À medida que se aumenta a concentração do solvente orgânico na solução tampão, o FEO diminui e o tempo de migração aumenta. Os solventes orgânicos não podem ser usados em concentrações muito elevadas, superiores a 20%, pois podem provocar a quebra da estrutura da micela<sup>138,147</sup>.

## **6. PROPOSTA ANALÍTICA PARA O TRABALHO DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS DE MANJERONA E DE ORÉGANO**

Tendo em vista as várias técnicas empregadas tanto para extração, quanto para a análise qualitativa e quantitativa dos óleos, bem como as amostras de diferentes origens, o desenvolvimento deste trabalho será apresentado em capítulos, envolvendo experimental e resultados e discussão, de acordo com a divisão a seguir:

### **6.1. ANÁLISE QUALITATIVA PRELIMINAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA E ORÉGANO.**

Amostras de manjerona e de orégano, comercial e cultivadas na FEPAGRO, mas sem controle agrônômico quanto à identificação da espécie, foram submetidas à extração por arraste de vapor. Os óleos obtidos foram analisados em CG/EM, para sua caracterização inicial, visando estabelecer as melhores condições analíticas e identificar os compostos presentes nessas amostras.

### **6.2. INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DA COLHEITA SOBRE A QUANTIDADE E QUALIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE MANJERONA E ORÉGANO.**

Nesta etapa foi aplicado o estudo feito anteriormente, para extração com arraste a vapor dos óleos essenciais obtidos de amostras de manjerona e orégano, cultivados sob controle agrônômico no Horto de Plantas Medicinais, aromáticas, ornamentais e condimentares, da Estação Experimental de Viamão (Rio Grande do Sul) da FEPAGRO, cujas sementes foram importadas de vários países europeus. O objetivo desta etapa foi verificar a influência da época da colheita (outono, inverno e primavera) sobre o rendimento em massa de óleo obtido e sobre a qualidade do mesmo, usando CG/EM para identificar os principais componentes.

### **6.3. DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE ANÁLISE USANDO CCEM PARA O ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA.**

Foi desenvolvido um método, usando a cromatografia capilar eletrocínética micelar, para identificação e quantificação dos principais compostos presentes nos óleos essenciais, obtidos da extração com arraste a vapor, de amostras de manjerona (comercial e cultivada),

### **6.4. COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE MANJERONA E ORÉGANO COM SOLVENTES ORGÂNICOS.**

As metodologias de extração com solventes orgânicos, usando um extrator do tipo Soxhlet, ultra-som e maceração foram aplicadas tanto a amostras de manjerona quanto de orégano, cultivados e comercial. O objetivo foi verificar o efeito do solvente e do método de extração nos componentes do extrato, e identificar os principais componentes em cada extrato por CG/EM.

### **6.5. DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO USANDO CO<sub>2</sub> A ALTAS PRESSÕES.**

O CO<sub>2</sub> a altas pressões foi usado como solvente extrator para se obter extratos de manjerona e orégano (comercial e cultivados). As condições experimentais foram estabelecidas através de experimentos variando-se temperatura e pressão. Depois da otimização do método, os extratos obtidos foram analisados via CG/EM, visando à determinação dos compostos majoritários e a relação entre rendimento e a concentração desses compostos.

# **CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO INICIAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE MANJERONA E ORÉGANO**

---

## EXPERIMENTAL

### 1. AMOSTRAGEM

Algumas amostras de manjerona e de orégano foram fornecidas pela FEPAGRO e outras foram adquiridas da Litte – Indústria e Comércio de Alimentos Ltda – Porto Alegre/RS. Folhas frescas de manjerona cultivada foram secas à T ambiente.

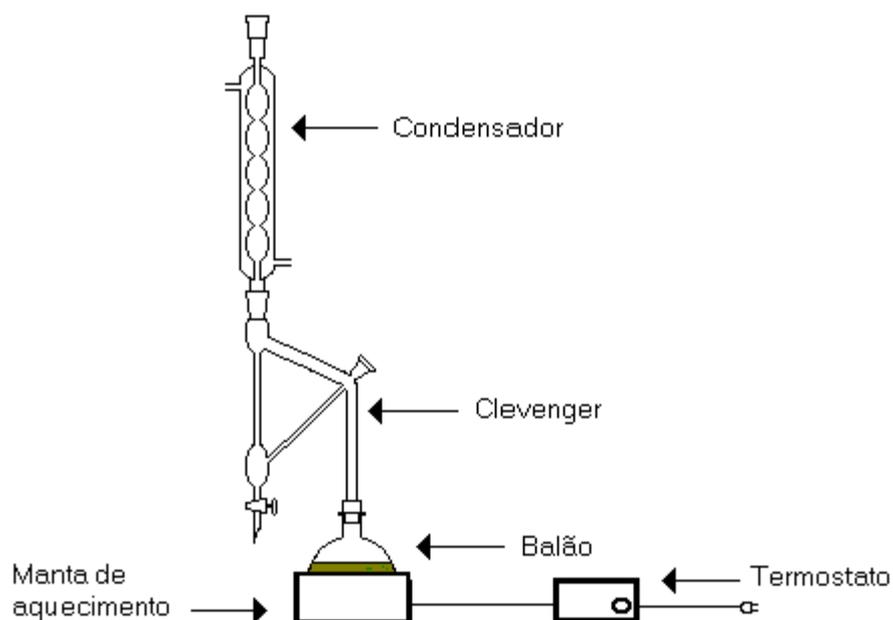
### 2. EXTRAÇÃO COM CLEVINGER

100 g de folhas foram submetidas à extração por arraste de vapor em aparelho de Clevenger<sup>88-90</sup> modificado, cujo desenho esquemático está apresentado na **Figura 8**, para obtenção do óleo. O óleo foi seco em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anidro, grau p.a., Merck) e concentrado sob N<sub>2</sub> (ultra puro, 99,99%, White Martins).

Foram usadas folhas frescas, secas e comercial de manjerona. Para o orégano, foram empregadas folhas frescas e comercial, sendo comparadas duas amostras comerciais, uma com um ano de prateleira e outra recente.

### 3. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG/EM

Os óleos essenciais obtidos via extração em Clevenger, das amostras de manjerona e de orégano, foram analisados por CG/EM, conforme condições analíticas descritas na **Tabela IV**. As amostras foram cromatografadas em triplicata, sempre usando injeção de 1 µL do *headspace* das mesmas.



**Figura 8** - Aparelho de Clevenger utilizado na extração por arraste de vapor.

**Tabela IV** – Condições analíticas utilizadas na análise dos óleos essenciais

equipamento	CG/EM - Shimadzu QP5050A
coluna	LM-5 (20 m x 0,25 mm x 0,4 $\mu$ m)
impacto eletrônico	70 eV
modo de injeção	split 1:50
gás de arraste; vazão	He; 1,5 mL min <sup>-1</sup>
programação de temperatura	40 °C (0min) – 3 °C min <sup>-1</sup> – 250 °C – 5 °C min <sup>-1</sup> – 280 °C (10min)
temperatura do injetor	280 °C
temperatura da coluna	280 °C
volume injetado	1 $\mu$ L do <i>headspace</i>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. RENDIMENTO EM ÓLEO ESSENCIAL

Os resultados obtidos na extração por Clevenger do óleo das folhas de manjerona e orégano estão apresentados na **Tabela V** e estão de acordo com os dados da literatura<sup>8,10</sup>. Pode-se observar que a quantidade de óleo extraído das folhas secas foi cerca de três vezes superior à das folhas frescas, no caso da manjerona. Quanto ao orégano, observa-se que a quantidade de óleo extraído das amostras comerciais foi cerca de quatro vezes superior à das folhas frescas.

**Tabela V** – Rendimento do óleo essencial obtido da extração com Clevenger para as amostras de manjerona e de orégano.

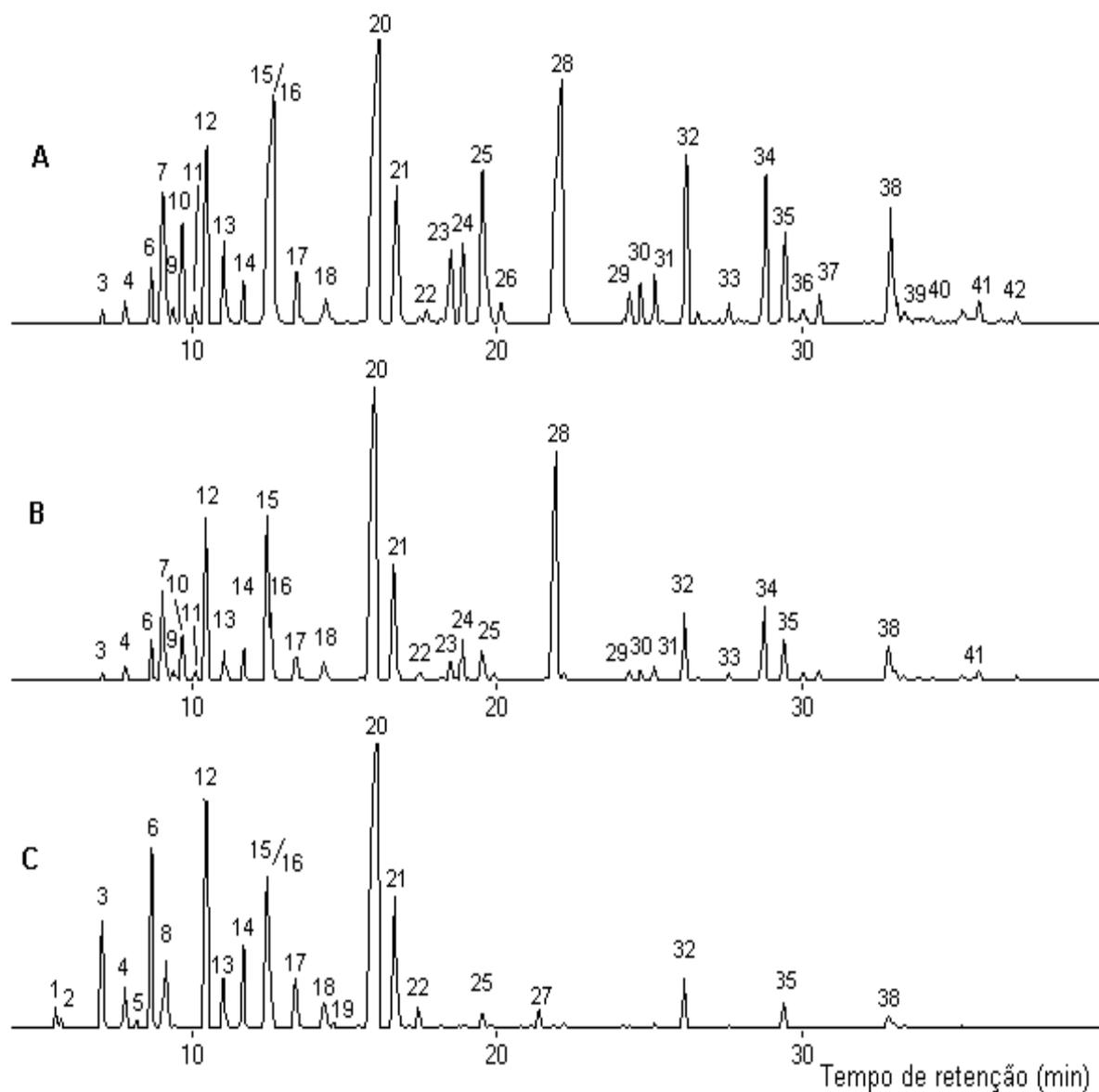
	Rendimento em mL g <sup>-1</sup> (%)			
	folhas frescas	folhas secas	comercial*	comercial**
manjerona	0,5	1,4	- - -	1,1
orégano	0,3	- - -	1,1	1,4

\* amostra adquirida há um ano    \*\* amostra adquirida recentemente

### 2. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG/EM

#### 2.1. MANJERONA

Foi analisado por CG/EM o óleo obtido da extração por Clevenger das folhas secas e das folhas frescas e da amostra comercial de manjerona. **A Figura 9** apresenta os cromatogramas obtidos para essas amostras. Com base na biblioteca Wiley NBS do equipamento cerca de 42 compostos foram tentativamente identificados (**Tabela VI**). Foram monitorados os íons 43, 59, 68, 69, 71, 82, 93, 119, 121, 149 e 161, que são característicos dos compostos encontrados nesses tipos de óleos.



**Figura 9** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido: **A)** das folhas secas do *Origanum majorana*; **B)** das folhas frescas do *Origanum majorana*; **C)** da manjerona comercial. Identificação dos picos apresentada na **Tabela VI**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IV**.

Pode-se observar pelos cromatogramas (**Figura 9**) que o terpineol-4 é o componente majoritário presente em todas as amostras. Quanto aos outros componentes a ordem varia, isto é, no óleo obtido das folhas frescas são o carvacrol e o cis-sabineno hidratado, no obtido das folhas secas são o carvacrol e o linalol, enquanto que na amostra comercial, o  $\gamma$ -terpineno e o  $\alpha$ -terpineol.

A presença de carvacrol nas duas amostras de folhas de manjerona cultivada, frescas e secas, está de acordo com alguns autores<sup>13-16</sup> os quais encontraram alto conteúdo de carvacrol em óleo essencial de *Origanum majorana*.

A amostra comercial não acusou a presença de carvacrol, mas a presença de um dos principais componentes do *flavour* da manjerona, que é o acetato de cis-sabineno hidratado, que não foi detectado nas outras duas amostras.

Reverchon e colaboradores<sup>22</sup> destacaram a influência do método de secagem no *flavour* do óleo essencial. Para os autores, secando as amostras, tanto em temperatura controlada como em ar quente, provoca-se a decomposição dos compostos responsáveis pelo *flavour*, isto é, o cis-sabineno hidratado e o seu acetato se transformariam em terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol.

Outros autores<sup>15-17,19,21</sup> também têm destacado estudos em relação aos rearranjos que ocorrem nos esqueletos das cadeias carbônicas que representam os monoterpenos.

Segundo Sarer e colaboradores<sup>14</sup>, a amostra comercial pode conter uma mistura de várias espécies de manjerona e não somente de *Origanum majorana*, o que explicaria algumas diferenças em relação às outras amostras.

**Tabela VI** - Compostos tentativamente identificados por CG/EM no óleo essencial das três amostras de manjerona

Pico	Composto	Probabilidade	PM	FM
1	$\alpha$ -Tujeno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	$\alpha$ -Pinoeno	98	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	Sabineno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	$\beta$ -Mirceno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	$\alpha$ -Felandreno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	$\alpha$ -Terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	p-Cimeno	96	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
8	Limoneno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
9	1,8-Cineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
10	cis- $\beta$ -Ocimeno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
11	trans- $\beta$ -Ocimeno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
12	$\gamma$ -Terpineno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
13	trans-sabineno hidratado	93	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	Terpinoleno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
15	Cis-sabineno hidratado	94	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	Linalol	98	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
17	Trans-p-Mentenol	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
18	Cis-p-Mentenol	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
19	Mentona	98	152	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
20	Terpineol-4	95	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
21	$\alpha$ -Terpineol	96	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
22	Piperitol	95	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
23	Eter metil timol	95	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
24	Eter metil carvacrol	94	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
25	Acetato de linalila	96	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
26	Geraniol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
27	*Acetato de cis -sabineno hidratado	90	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
28	Carvacrol / Timol	93	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
29	Acetato de nerila	90	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
30	$\beta$ -Bourboneno	96	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
31	Acetato de geranila	97	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
32	$\beta$ -Cariofileno	98	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
33	$\alpha$ -Humuleno	96	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
34	Germacreno-D	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
35	Biciclogermacreno	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
36	Farneseno	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
37	$\delta$ -Cadineno	96	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
38	Espatuleno	96	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
39	Veriflorol	92	222	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
40	Óxido de Cariofileno	95	220	C <sub>15</sub> H <sub>2</sub> O
41	$\alpha$ -Cadinol	90	222	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
42	Patchulano	93	206	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub>

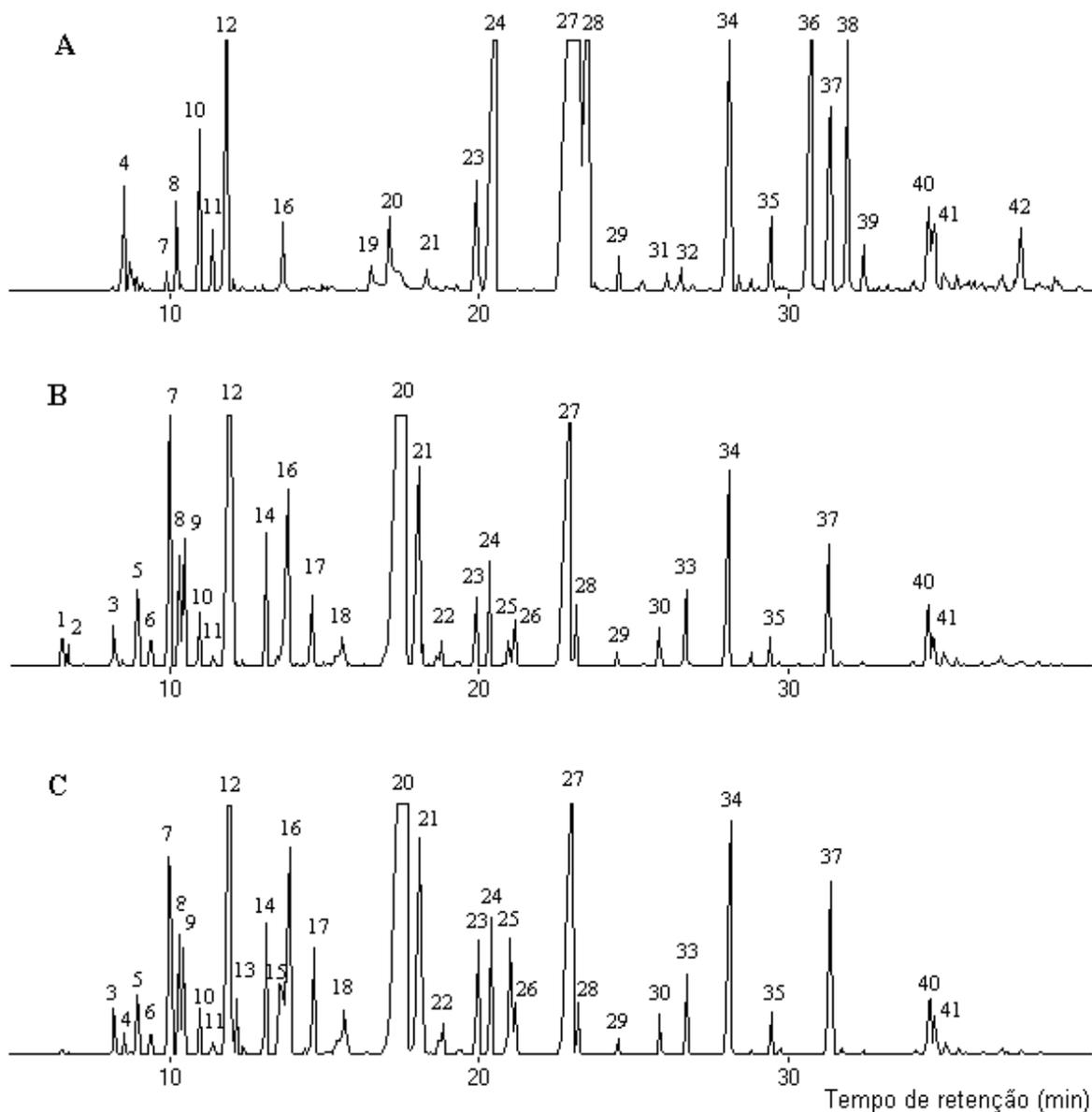
## 2.2. ORÉGANO

Foi analisado por CG/EM o óleo essencial obtido da extração por Clevenger das três amostras de orégano. **A Figura 10** apresenta os cromatogramas obtidos para essas amostras. Com base na biblioteca Wiley NBS do equipamento cerca de 42 compostos foram tentativamente identificados (**Tabela VII**), sendo 13 hidrocarbonetos monoterpênicos, 10 álcoois monoterpênicos, 8 hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 2 álcoois sesquiterpênicos, 2 fenóis e 7 compostos oxigenados.

Comparando-se os cromatogramas (**Figura 10**), pode-se observar que o óleo essencial obtido das folhas frescas apresenta um alto teor de timol, seguido de carvacrol, éter metil carvacrol,  $\gamma$ -terpineno e germacreno-D, enquanto que as amostras comerciais apresentaram perfis cromatográficos semelhantes. O terpinenol-4 é o componente majoritário nestas amostras comerciais, sendo  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineno, timol e  $\alpha$ -terpineol, os outros compostos presentes em maiores quantidades. Este fato está de acordo com o estudo apresentado na revisão bibliográfica (capítulo 2, item 3).

Sivropoulou e colaboradores<sup>153</sup> compararam o orégano cultivado na Ilha de Creta, Grécia, com óleo essencial de orégano adquirido no comércio. Encontraram nas amostras cultivadas, alto conteúdo de carvacrol (~80%), enquanto que na amostra comercial o teor de carvacrol foi baixíssimo (0,43%), sendo detectado aproximadamente 32% de timol. Nesta amostra comercial, o composto majoritário foi um terpeno, o p-cimeno. Biondi e colaboradores<sup>154</sup> também estudaram e compararam orégano cultivado com orégano comercial. A amostra cultivada apresentava alto conteúdo de carvacrol (cerca de 62%), e a comercial tinha como componente majoritário o terpineol-4 (25%), seguido de  $\gamma$ -terpineno (16%), timol (12%) e  $\alpha$ -terpineno (9%). Segundo os autores, a amostra comercial seria uma mistura de *Origanum vulgare* Linneus e *Origanum majorana* Moench o que justificaria a composição química encontrada.

Contudo vários autores<sup>41,42,46,70,71,73</sup> têm reportado baixos conteúdos de timol e/ou carvacrol em várias espécies de orégano, as quais apresentavam as características botânicas do gênero *Origanum*.



**Figura 10** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido: **A)** das folhas frescas de *Origanum vulgare*; **B)** do orégano comercial adquirido há um ano; **C)** do orégano comercial adquirido recentemente. Identificação dos picos apresentada na **Tabela VII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IV**.

**Tabela VII** – Compostos tentativamente identificados por CG/EM no óleo essencial das três amostras de orégano.

Pico	Composto	Probabilidade	PM	FM
1	$\alpha$ -Tujeno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	$\alpha$ -Pineno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	Sabineno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	1-octen-5-ol	95	128	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O
5	$\beta$ -Mirceno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	$\alpha$ -Felandreno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	$\alpha$ -Terpineno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	p-Cimeno	93	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
9	$\beta$ -Felandreno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	cis- $\beta$ -Ocimeno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
11	trans- $\beta$ -Ocimeno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
12	$\gamma$ -Terpineno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
13	Trans-sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	Terpinoleno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
15	Cis- sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	Trans-p-Mentenol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
17	Cis-p-Mentenol	91	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
18	Cis/Trans-pineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
19	1-borneol	94	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
20	Terpineol-4	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
21	$\alpha$ -Terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
22	Cis/trans-piperitol	93	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
23	Éter metil timol	94	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
24	Éter metil carvacrol	92	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
25	Acetato de linalila	96	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
26	Geraniol	95	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
27	Timol	91	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
28	Carvacrol	93	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
29	Biciclogermacreno	92	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
30	Acetato de nerila	95	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
31	Acetato de timila	90	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
32	$\alpha/\beta$ -Bourboneno	91	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
33	Acetato de geranila	97	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
34	$\beta$ -Cariofileno	96	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
35	$\alpha$ -Humuleno	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
36	Germacreno-D	90	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
37	Biciclogermacreno	96	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
38	Farneseno	92	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
39	$\gamma$ ou $\delta$ -Cadineno	90	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
40	Espatulenol	92	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
41	Óxido de cariofileno	91	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
42	$\alpha$ -Cadinol	90	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O

**CAPÍTULO 4:  
INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DA COLHEITA  
SOBRE A QUALIDADE E A  
QUANTIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL  
DE MANJERONA E ORÉGANO**

---

---

## EXPERIMENTAL

### 1. AMOSTRAS

As sementes de manjerona (T1, T2 e T3) e de orégano (T4, T5 e T6) foram adquiridas de importadoras, de diversas procedências (**Tabela VIII**) e cultivadas sob rigoroso controle agrônômico no Horto de Plantas Medicinais, aromáticas, ornamentais e condimentares, da Estação Experimental de Viamão (Rio Grande do Sul) da FEPAGRO - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, sob a orientação do técnico Sr. Luis Osório de Castro. As amostras foram coletadas nos meses de abril, julho e outubro de 2000, observando as estações do ano de outono, inverno e primavera. Em função de variações climáticas, não foi possível fazer colheita no verão.

Folhas e flores de manjerona e orégano foram secas à temperatura ambiente por três semanas. Após este período, foram trituradas manualmente, armazenadas em sacos de papel pardo e guardadas em ambiente protegido da luz e calor excessivo. As plantas foram identificadas e classificadas pelo Dr. Sérgio Bordignon (**Tabela VIII**). Exsicatas estão depositadas e registradas no Herbário BLA (Brazilian Laboratory of Agrostology) da FEPAGRO.

O teor de umidade foi calculado usando cerca de 3 g de cada amostra, que foram levados à estufa, por 105 °C, em média por 6 h e depois pesados até peso constante.

**Tabela VIII** – Classificação das amostras de manjerona e orégano, país de origem e importadora.

Amostra	Nº Herbário	Tipo de amostra	País de origem	Importadora
T1	BLA 17248	<i>Origanum majorona</i> Moench	Holanda	Feltrin
T2	BLA 17249	<i>Origanum majorona</i> Moench	Dinamarca	Feltrin
T3	BLA 17250	<i>Origanum majorona</i> Moench	Alemanha	Isla
T4	BLA 17251	<i>Origanum vulgare</i> Linneus	Dinamarca	Topseed
T5	BLA 17252	<i>Origanum vulgare</i> Linneus	França	Feltrin
T6	BLA 17253	<i>Origanum vulgare</i> Linneus	Alemanha	Isla

## 2. EXTRAÇÃO COM CLEVINGER

40 g das folhas e flores secas de cada espécie descrita na **Tabela VIII**, foram submetidas à extração por arraste de vapor em aparelho de Clevenger<sup>88-90</sup> modificado, conforme desenho esquemático e procedimentos descritos no Capítulo 3.

## 3. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG/EM

Os óleos essenciais, obtidos de cada amostra extraída por arraste de vapor, foram analisados por CG/EM, conforme condições analíticas descritas na **Tabela IX**.

As amostras foram cromatografadas em triplicata, sempre usando injeção de 1 µL do *headspace* das mesmas.

**Tabela IX** – Condições analíticas utilizadas na análise dos óleos essenciais.

equipamento	CG/EM - Shimadzu QP5050A
coluna	SPB -1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
impacto eletrônico	70 eV
modo de injeção	split 1:50
gás de arraste; vazão	He: 1,0 mL min <sup>-1</sup>
programação de temperatura	40 °C (0min) – 2 °C min <sup>-1</sup> – 100 °C – 3 °C min <sup>-1</sup> – 145 °C – 5 °C min <sup>-1</sup> – 280 °C (10min)
temperatura do injetor	280 °C
temperatura da coluna	280 °C
volume injetado	1 µL do <i>headspace</i>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA E ORÉGANO

Os resultados obtidos na extração por Clevenger do óleo das folhas e das flores secas das amostras T1 a T6 (**Tabela X**) estão de acordo com os dados da literatura<sup>8,10</sup>. Pode-se observar que as quantidades relativas apresentaram pequena variação em relação à procedência das amostras de manjerona. Quanto ao orégano, as amostras T5 e T6 apresentaram um rendimento muito baixo. O teor de umidade de cada amostra foi encontrado, para todas as amostras, um valor médio de 10%.

**Tabela X** – Rendimento da extração com Clevenger, obtido para as amostras de manjerona e orégano, expresso em mL de óleo por 100 g de amostra (% em b.s.).

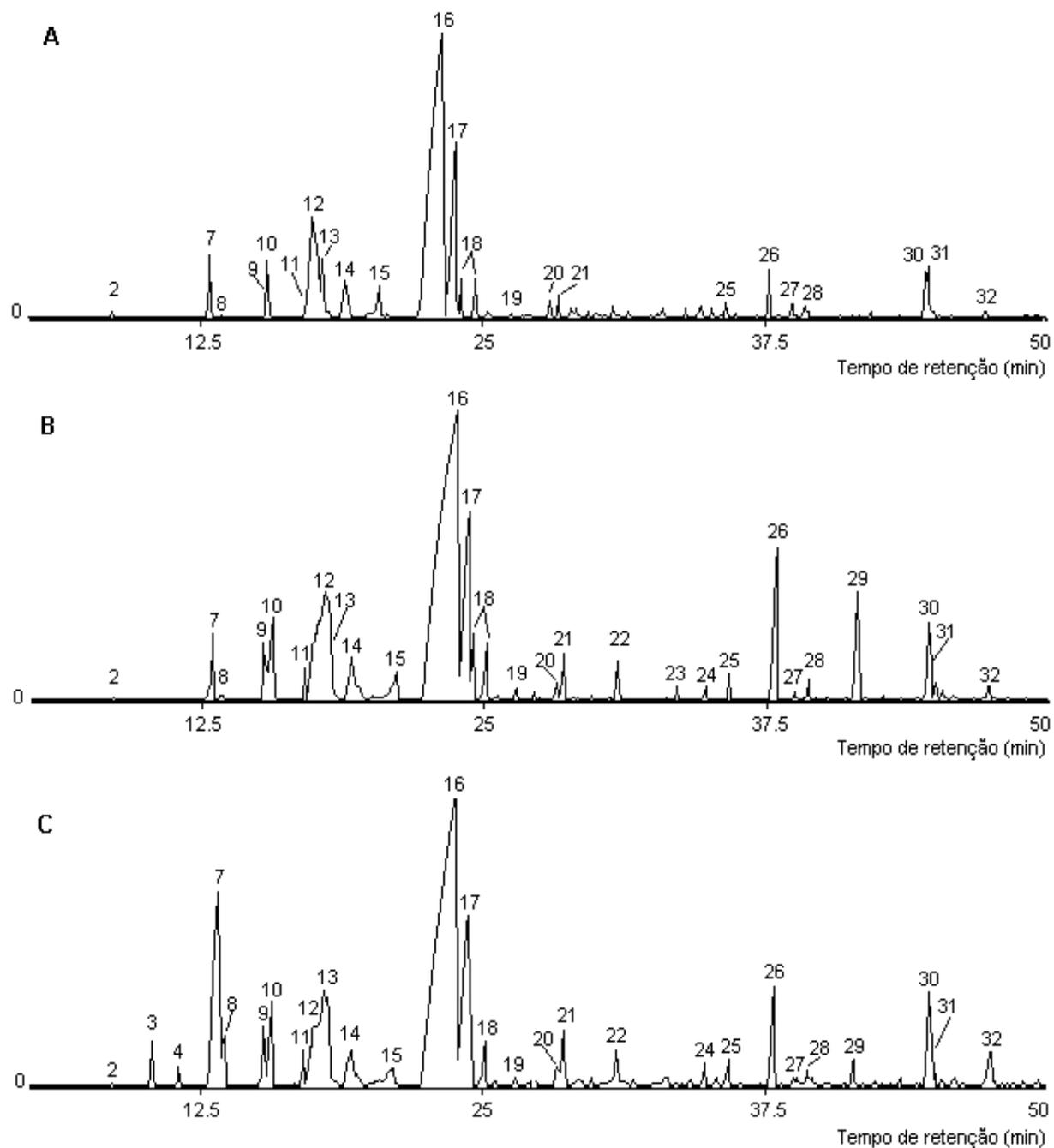
Amostra*	Período de colheita		
	Outono	Inverno	Primavera
T1	1,2	1,0	1,0
T2	1,2	1,0	0,9
T3	1,4	1,1	1,1
T4	1,3	1,1	1,0
T5	0,5	0,4	0,4
T6	0,4	0,3	0,3

\* codificação conforme **Tabela VIII**

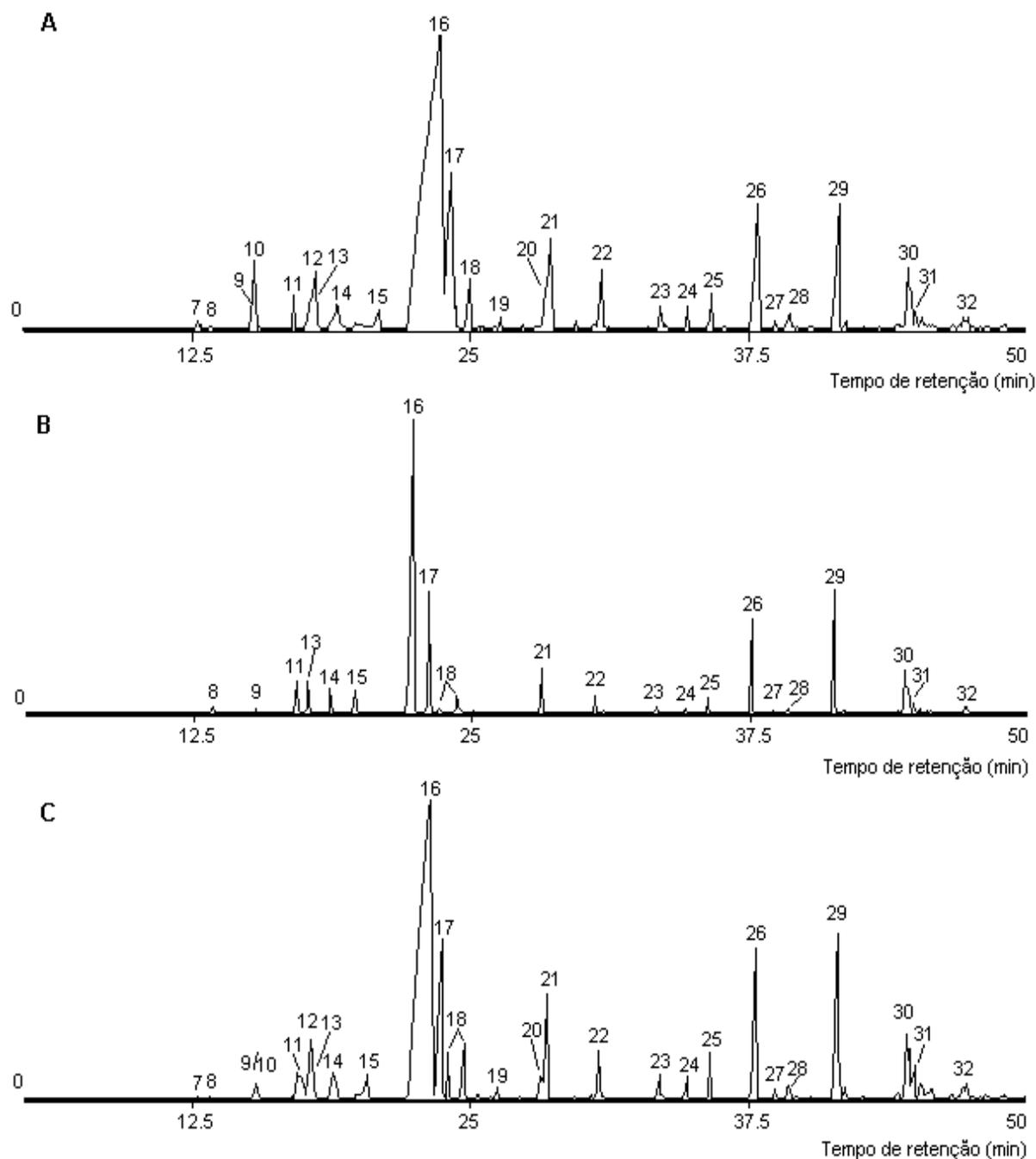
### 2. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL VIA CG/EM

#### 2.1. ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERONA

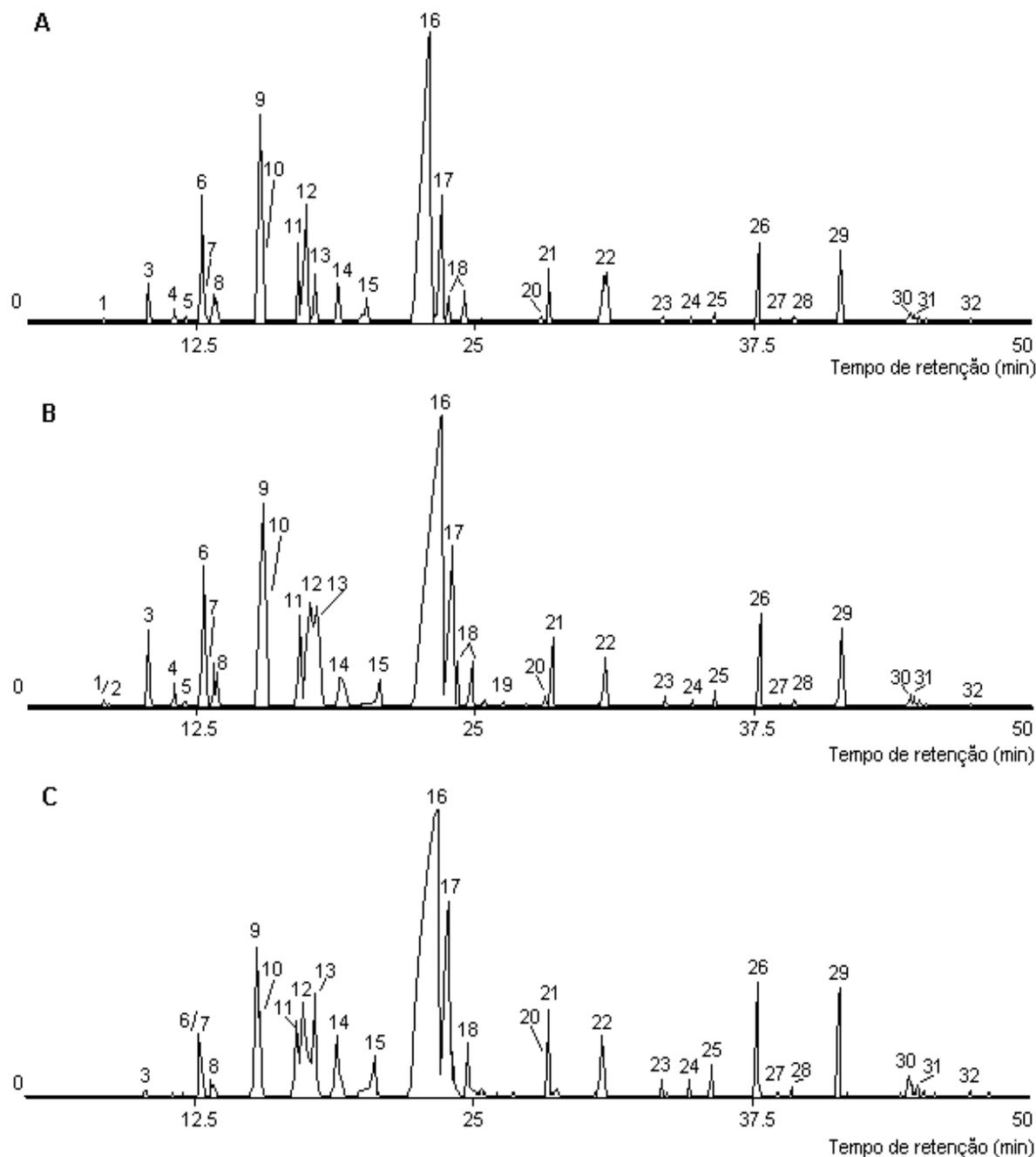
As **Figuras 11, 12 e 13** apresentam os cromatogramas dos óleos essenciais obtidos na extração. A **Tabela XI** apresenta os principais compostos identificados, no óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona.



**Figura 11** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona colhidas no outono: **A)** T1; **B)** T2 e **C)** T3. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XI**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IX**.



**Figura 12** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona colhidas no inverno: **A)** T1; **B)** T2 e **C)** T3. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XI**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IX**.



**Figura 13** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de manjerona colhidas na primavera: **A)** T1; **B)** T2 e **C)** T3. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XI**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IX**.

**Tabela XI** – Compostos Identificados nos óleos extraídos das três amostras de manjerona (T1, T2 e T3)\*.

Pico	Composto	Probabilidade	PM	FM
1	$\alpha$ -tujeno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	$\alpha$ -pineno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	sabineno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	mirreno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	$\alpha$ -felandreno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	$\alpha$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	p-cimeno	94	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
8	limoneno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
9	$\gamma$ -terpineno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	trans sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	terpinoleno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
12	cis sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	linalol	95	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	p-menten-2-ol-1	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	trans-pineno hidratado	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	terpineol-4	98	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
17	$\alpha$ -terpineol	98	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
18	cis/trans-piperitol	94	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
19	nerol	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
20	geraniol	94	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
21	acetato de linalila	97	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
22	acetato de cis sabineno hidratado	87	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
23	$\gamma$ -elemeno	92	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
24	acetato de nerila	96	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
25	acetato de geranila	97	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
26	$\beta$ -cariofileno	94	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
27	aromadendreno	90	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
28	$\alpha$ -humuleno	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
29	biciclogermacreno	94	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
30	(+) espatulenol	93	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
31	óxido de cariofileno	93	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
32	isoespatulenol	90	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O

\* códigos apresentados na **Tabela VIII**

Pode-se destacar em relação às amostras de manjerona, que a composição química do óleo essencial não variou muito entre T1, T2 e T3 e um alto conteúdo de terpineol-4 foi encontrado em todas as amostras. Foram identificados cerca de 32

compostos, destes os quais 15 hidrocarbonetos terpênicos e 17 terpenos oxigenados, principalmente álcoois e ésteres.

Nykänen<sup>16</sup> destacou em sua publicação que o cis-sabineno hidratado e o terpineol-4 são os compostos majoritários, seguidos de trans-sabineno hidratado,  $\alpha$ -terpineol e linalol.

Outros autores<sup>17,18,20,22</sup>, conforme comentado no Item 2.1 do capítulo 3 têm se dedicado aos estudos da relação entre os processos de extração e os rearranjos que ocorrem nos esqueletos das cadeias carbônicas que representam os monoterpenos.

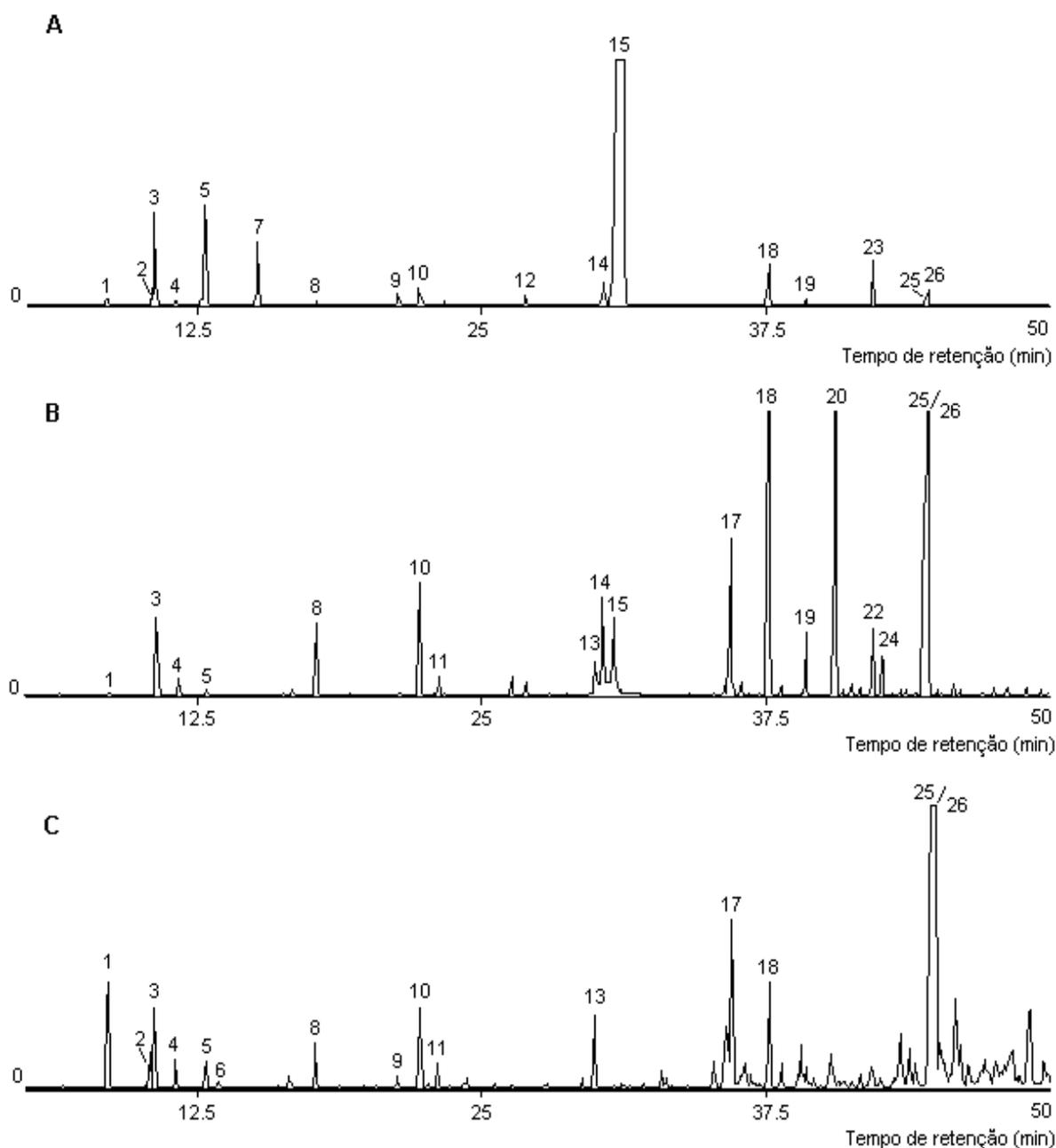
Vera e Chane-Ming<sup>155</sup>, em recente publicação, realizaram estudos do óleo essencial obtido de *O. majorana* L., cultivada na Ilha Reunião (Oceano Pacífico). A extração foi realizada por arraste de vapor, via Clevenger. A análise cromatográfica revelou que este óleo é rico em terpineol-4 (38,4%), cis-sabineno hidratado (15,0%), p-cimeno (7,0%) e  $\gamma$ -terpineno (6,9%).

## 2.2. ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

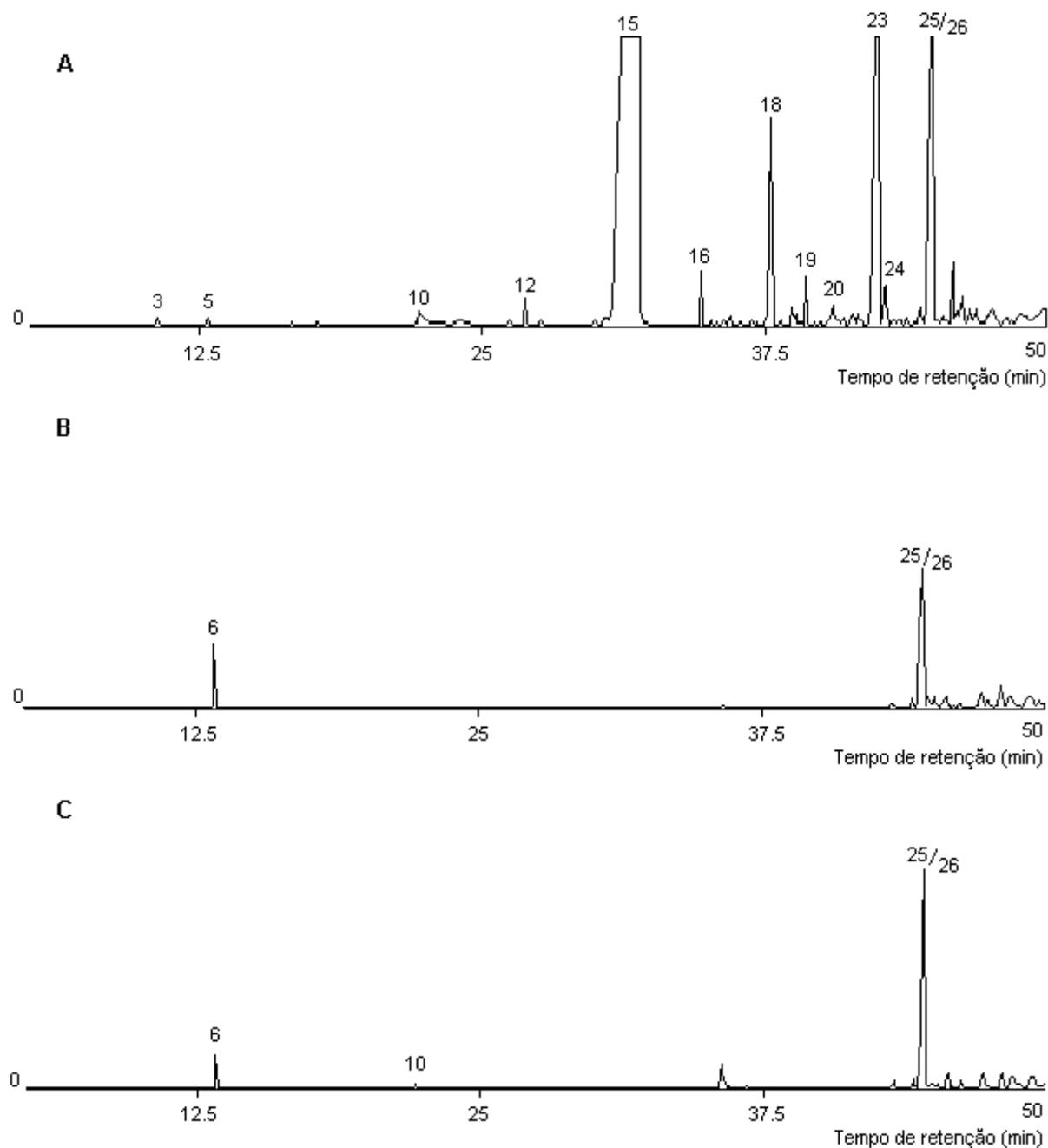
As **Figuras 14, 15 e 16** apresentam os cromatogramas dos óleos essenciais obtidos na extração. A **Tabela XII** apresenta os principais compostos identificados, no óleo essencial obtido via extração com arraste a vapor das amostras de orégano cultivado. Foram identificados cerca de 26 compostos, dentre os quais 13 hidrocarbonetos terpênicos e 13 terpenos oxigenados, principalmente fenóis e álcoois.

Também se verifica, em relação às amostras de orégano, que a composição química do óleo variou em cada estação e entre as amostras T4, T5 e T6. O composto majoritário do orégano T4 é o carvacrol e nos demais, o espatunelol/óxido de cariofileno. Em T5, o carvacrol está ausente no óleo extraído das folhas durante o inverno e em T6 ele está totalmente ausente. Em T5 e T6 o limoneno apresenta uma área de pico no cromatograma bem maior durante o inverno e a primavera do que durante o outono.

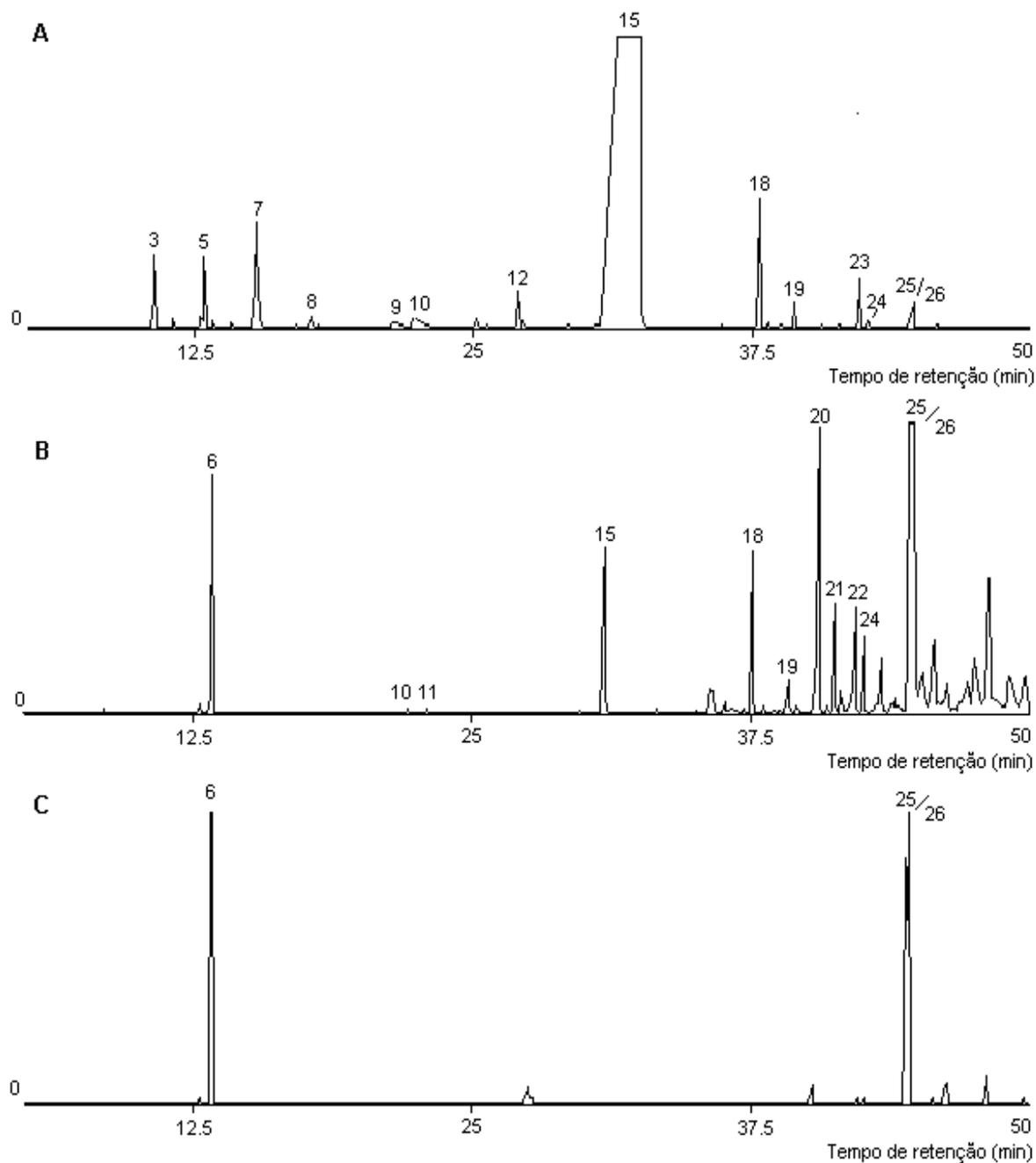
Esse estudo está de acordo com muitos artigos<sup>40,68,69,71,73,74</sup> que demonstraram que a composição do óleo essencial dessas plantas varia com a origem da planta e outros fatores, principalmente o geográfico e a época de colheita.



**Figura 14** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de orégano colhidas no outono: **A)** T4; **B)** T5 e **C)** T6. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IX**.



**Figura 15** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de orégano colhidas no inverno: **A)** T4; **B)** T5 e **C)** T6. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IX**.



**Figura 16** – Cromatogramas do íon total do óleo essencial obtido via extração por arraste de vapor das amostras de orégano colhidas na primavera: **A)** T4; **B)** T5 e **C)** T6. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela IX**.

**Tabela XII** – Compostos Identificados nos óleos extraídos das três amostras de orégano (T4, T5 e T6)\*.

Pico	Composto	Probabilidade	PM	FM
1	$\alpha$ -pineno	96	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	$\beta$ -pineno	92	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	1-octen-3-ol	96	128	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O
4	3-octanol	95	130	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O
5	p-cimeno	94	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
6	limoneno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	$\gamma$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	linalol	95	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	borneol	95	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
10	terpineol-4	94	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	$\alpha$ -terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	éter metil carvacrol	90	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
13	dihidroedulan II	93	194	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O
14	timol	92	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
15	carvacrol	92	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
16	acetato de carvacrila	92	192	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
17	$\beta$ -bourboneno	94	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
18	$\beta$ -cariofileno	94	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
19	$\alpha$ -humuleno	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
20	germacreno-D	92	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
21	biciclogermacreno	93	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
22	$\alpha$ -farneseno	94	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
23	$\beta$ - bisaboleno	95	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
24	$\delta$ - cadineno	94	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
25	espatulenol	90	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
26	óxido de cariofileno	94	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O

\* códigos apresentados na **Tabela VIII**

**CAPÍTULO 5:  
APLICAÇÃO DA ELETROFORESE  
CAPILAR NA ANÁLISE DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE MANJERONA**

---

---

## EXPERIMENTAL

### 1. AMOSTRAS, REAGENTES E SOLVENTES

As amostras cultivadas de *Majorana hortensis* Moench (T1, T2 e T3, aqui designadas por M1, M2 e M3) usadas neste estudo, são as mesmas já descritas no **Capítulo 4**. Também foram usadas amostras comerciais adquiridas no mercado, na Espanha, uma cultivada em Sevilha (M4) e outra, em Sória (M5).

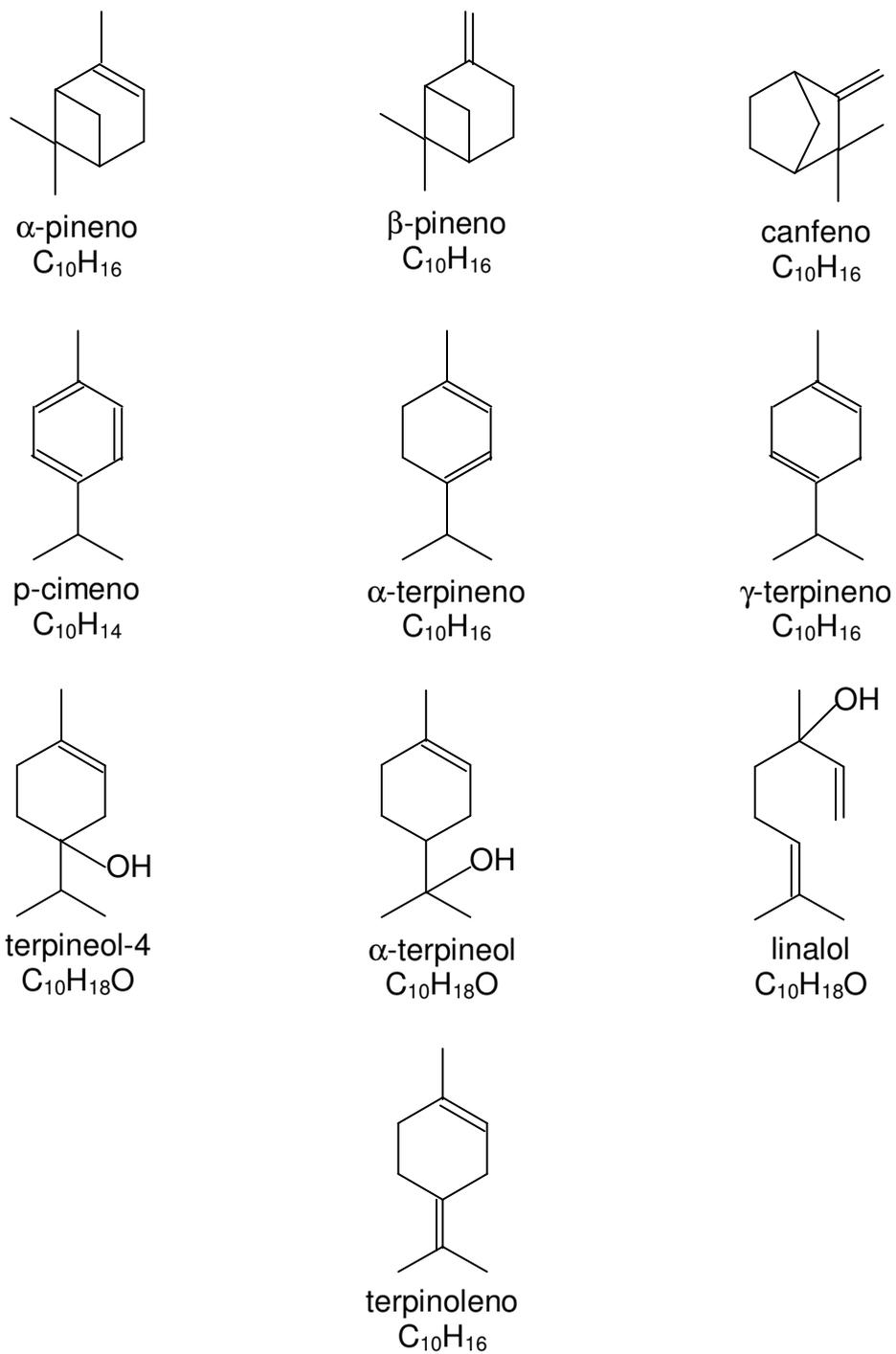
Todos os solventes utilizados foram grau p.a. Merck bi-destilados e, usados no prazo máximo de uma semana. O sulfato de sódio anidro (p.a. Merck) foi previamente mantido em estufa, a 105 °C, por 4h.

Os padrões de álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos (**Figura 17**), usados nesta parte experimental, tais como (+)- $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno, p-cimeno, terpinenol-4,  $\alpha$ -terpineol, linalol e (+)-canfeno, foram adquiridos da Fluka e (+)- $\alpha$ -pineno da Sigma. As ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , foram adquiridos da Fluka e o dodecilsulfato de sódio (DSS), da Sigma. Os fosfato e borato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) foram adquiridos da Aldrich.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas, dissolvendo cada padrão em metanol ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 2. EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Para obtenção do óleo essencial foi utilizada a extração por arraste de vapor, conforme descrito no Capítulo 4. O óleo essencial obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e sob  $\text{N}_2$ . As soluções estoque das amostras ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foram preparadas dissolvendo cada amostra de óleo em metanol, enquanto que as soluções de trabalho foram preparadas antes de cada análise, dissolvendo cada solução do óleo essencial de manjerona em água (Milli-Q).



**Figura 17** – Estrutura dos principais hidrocarbonetos e álcoois monoterpênicos usados neste estudo.

### 3. PROCEDIMENTO DA DETERMINAÇÃO POR CCEM

O equipamento usado foi um aparelho de Eletroforese Capilar (EC) Beckman P/ACE 5500 (**Figura 18**) equipado com um detector de arranjo de diodo. O sistema de controle e processamento de dados foi realizado pelo software Gold do equipamento.



**Figura 18** – Equipamento de eletroforese capilar Beckman P/ACE 5500

As condições de operação foram otimizadas através do desenvolvimento de um método que fosse capaz de separar inicialmente os hidrocarbonetos monoterpênicos (canfeno, terpinoleno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno e  $\gamma$ -terpineno), que são apolares<sup>146</sup>. Em seguida, adaptou-se este método também para a separação de álcoois monoterpênicos (terpinenol-4,  $\alpha$ -terpineol e linalol) e para a identificação tanto destes compostos como dos hidrocarbonetos monoterpênicos, em amostras reais<sup>152</sup>.

A separação dos padrões através da CCEM foi feita aplicando uma voltagem de 20 kV, utilizando um capilar de sílica fundida (75  $\mu$ m d.i. x 57 cm), com comprimento de 50 cm até o detector, aplicando uma corrente em torno de 64  $\mu$ A, a

uma temperatura de 25 °C. As amostras foram injetadas no modo hidrodinâmico por 5 s. Os eletroferogramas foram medidos a 200 nm.

A solução tampão era composta por  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  6 mM, DSS 50 mM,  $\gamma$ -CD 7 mM e de acetonitrila 10%, ajustando-se a um pH 8,0, através da adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,1 M. O capilar era lavado diariamente, injetando água deionizada por 10 min, seguida de passagem de solução NaOH 0,1 M por 10 min, com água deionizada por 5 min e finalmente com solução tampão por 15 min. Entre cada separação, o capilar era lavado, sequencialmente, com NaOH 0,1 M (2 min), água deionizada (3 min) e solução tampão (5 min). Essas etapas eram muito importantes para prevenir a adsorção dos monoterpenos nas paredes do capilar. Isto foi necessário, porque se observou que após várias horas de uso, o capilar começava a reduzir a capacidade de resolução para alguns picos. Quando esse método de limpeza não promovia uma melhora na resolução, um novo capilar era usado. Os novos capilares eram condicionados por 5 min com água deionizada, 10 min com HCl 1 M, 5 min com água deionizada, 10 min com NaOH 0,1 M, 5 min com água deionizada e 20 min com a solução tampão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

#### 1.1. VARIÁVEIS INSTRUMENTAIS

##### 1.1.1. Temperatura

A influência da temperatura na resolução dos terpenos foi testada numa faixa entre 15 e 30 °C. Nas temperaturas entre 15 e 20 °C, o tempo de migração foi maior e os picos foram mais largos do que aqueles obtidos a 25 °C, reduzindo a capacidade de integração. Um aumento de temperatura de 20 para 30 °C produziu uma diminuição do tempo de análise devido ao fato que os analitos migram mais rápido a altas temperaturas. Contudo, temperaturas mais altas resultam em perda de sensibilidade. Com base nos resultados obtidos, observou-se que na temperatura de 25 °C foi obtida a melhor resolução.

##### 1.1.2. Absorbância

Para determinar o máximo de absorbância dos monoterpenos, o detector UV de arranjo de diodo foi testado a 214, 210 e 200 nm. Todos os monoterpenos apresentaram o máximo de absorbância a 200 nm.

##### 1.1.3. Voltagem

Como o fluxo eletroosmótico e a velocidade de migração dos analitos são proporcionais à voltagem aplicada, esta variável foi testada a diferentes voltagens (10, 15 e 20 kV). Aumentando-se a voltagem aplicada, o tempo de análise era diminuído. A voltagem de 20 kV apresentou os melhores resultados, pois apresentou uma boa resolução aliada à alta velocidade de análise. A 15 kV obteve-se uma boa resolução de seis monoterpenos, entretanto, com um aumento no tempo de análise.

#### 1.1.4. Modo de injeção

O modo de injeção hidrodinâmica foi usado para introdução da amostra. Para testar a melhor sensibilidade para a separação dos hidrocarbonetos monoterpênicos, variou-se o tempo de injeção hidrodinâmica de 3 a 10 s. Observou-se que 5 s foram o tempo suficiente para se obter uma boa resolução, numa concentração dos analitos de 1 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

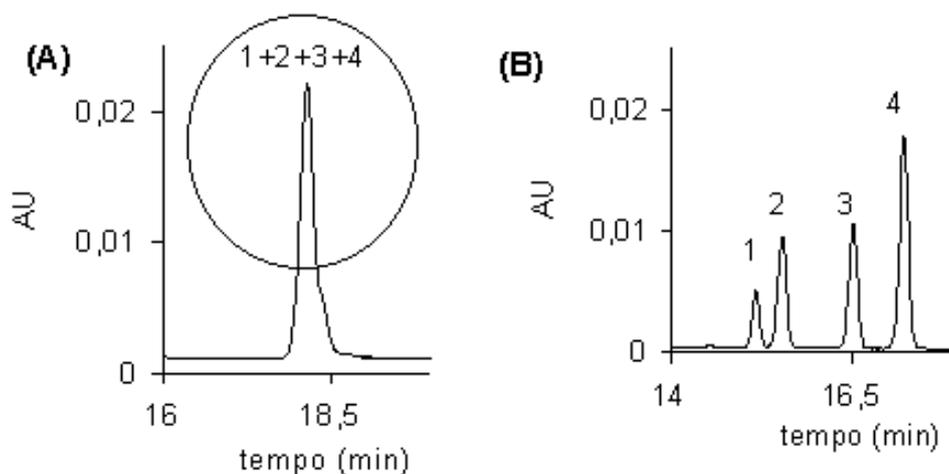
### 1.2. VARIÁVEIS QUÍMICAS

#### 1.2.1. Ciclodextrinas

O tipo de ciclodextrina ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) foi testado na separação dos hidrocarbonetos monoterpênicos:  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno e  $\alpha$ -pineno, usando um eletrólito formado por DSS 50 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  6 mM. O efeito da concentração das ciclodextrinas na resolução da mistura dos monoterpênicos foi investigado usando  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD de 5 a 15 mM. Quando  $\alpha$ -CD foi adicionada à solução tampão, somente um pico foi observado, conforme pode ser observado na **Figura 19A**. Com  $\beta$ -CD, 4 picos foram encontrados, mas com uma resolução menor que 1. Portanto não se obteve uma boa eficiência, usando as  $\alpha$  e  $\beta$ -ciclodextrinas.

Segundo a literatura consultada, usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Nishi e Terabe<sup>156</sup>, relataram que a  $\alpha$ -CD é um bom aditivo da fase móvel para separar alguns monoterpênicos enantiômeros como ( $\pm$ )- $\beta$ -pineno, ( $\pm$ )-canfeno e ( $\pm$ )- $\alpha$ -pineno. Terabe e colaboradores<sup>144</sup> usaram  $\beta$ -CD para separar compostos hidrofóbicos com boa resolução.

Neste trabalho, entretanto, somente com  $\gamma$ -CD os quatro monoterpênicos foram bem resolvidos por CD-CCEM (**Figura 19B**). Os tempos de migração dos analitos foram consideravelmente reduzidos com o aumento da concentração da  $\gamma$ -CD.



**Figura 19** – Eletroferogramas indicando o efeito do tipo de CD na separação de quatro monoterpenos: (1) (+)-canfeno, (2) (+)- $\beta$ -pineno, (3) (+)- $\alpha$ -pineno e (4)  $\gamma$ -terpineno. **(A)** 10 mM  $\alpha$ -CD e **(B)** 10 mM  $\gamma$ -CD.

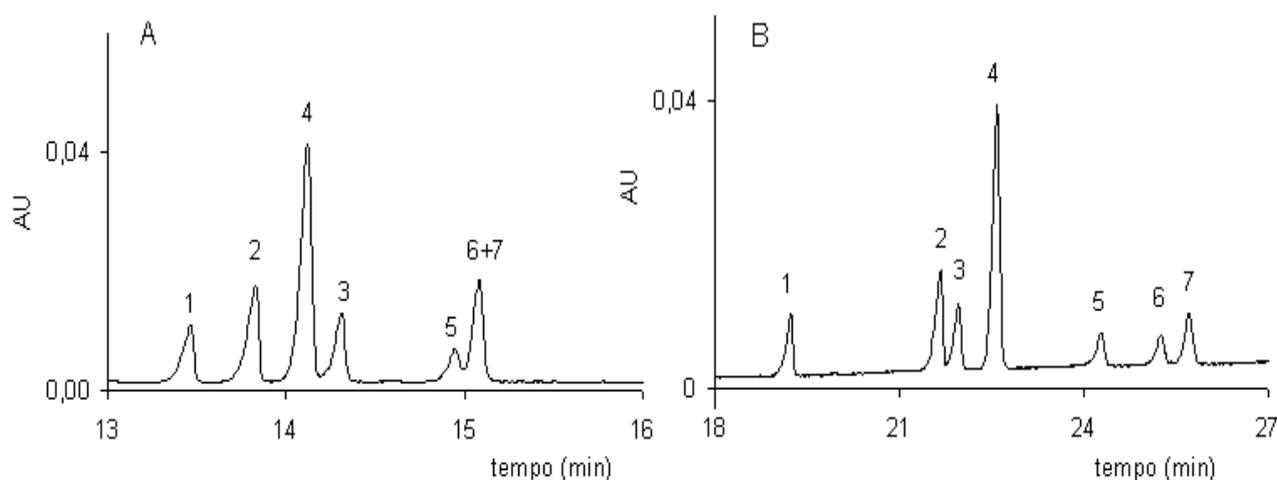
Condições: solução tampão: 10 mM de fosfato, 6 mM de borato, 50 mM de DSS e 5% de acetonitrila; pH 8,0, ajustado pela adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,1 M; capilar de sílica fundida (50 cm X 75  $\mu\text{m}$  d.i.), voltagem aplicada: 20 kV; detecção: 200 nm; temperatura: 25  $^\circ\text{C}$ .

### 1.2.2. Concentração da solução tampão

Para se obter a melhor composição do eletrólito, as concentrações do surfactante (DSS) e dos sais eletrólitos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) também foram estudadas. Estudou-se a influência da concentração do DSS no intervalo de 30 a 70 mM, usando  $\gamma$ -CD 7 mM em todos os casos. Com DSS 70 mM, os tempos de migração foram muito longos e dois picos não foram bem resolvidos. Com concentração bem mais baixa, 30 mM, a resolução diminuiu muito, apesar dos tempos de migração terem sido bem menores. Os resultados demonstraram que o melhor valor para a separação dos analitos de interesse foi com DSS 50 mM. A composição do fosfato e do borato de sódio foram examinadas entre 6 e 20 mM. O melhor resultado foi quando se usou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  6 mM.

### 1.2.3. Modificador orgânico

Quando se adiciona CD à solução tampão, em eletroforese micelar, a separação ou seletividade pode ser melhorada por adição de modificadores orgânicos. A adição de metanol ou acetonitrila ao eletrólito foi usada para avaliar o tempo de migração de 7 hidrocarbonetos monoterpênicos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno,  $\gamma$ -terpineno, canfeno e p-cimeno). Para uma mesma concentração (5%), a acetonitrila apresentou melhor resolução do que o metanol. Além disso, um aumento na concentração de acetonitrila melhorou muito a resolução, apesar de ter aumentado o tempo de migração dos analitos. Na **Figura 20A** pode-se observar que a adição de 5% de acetonitrila à solução do eletrólito resultou na sobreposição de 2 picos ( $\alpha$ -terpineno e  $\gamma$ -terpineno), enquanto que a adição de 10% melhorou muito a separação dos 7 analitos (**Figura 20B**), sendo necessário um maior tempo de análise.



**Figura 20** – Eletroferogramas indicando o efeito da adição de acetonitrila na separação dos monoterpênicos: (1) (+)-canfeno, (2) terpinoleno (3) (+)- $\beta$ -pineno, (4) p-cimeno (5) (+)- $\alpha$ -pineno, (6)  $\alpha$ -terpineno e (7)  $\gamma$ -terpineno ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada). **(A)** 5% de acetonitrila e **(B)** 10% de acetonitrila.

Condições: solução do eletrólito: 10 mM de fosfato, 6 mM de borato, 50 mM de DSS, 7 mM de  $\gamma$ -CD; capilar de sílica fundida (50 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i.); voltagem aplicada: 20 kV; pH 8.0 ajustado pela adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,1 M; detecção: 200 nm; temperatura: 25  $^\circ\text{C}$ .

## 2. DESEMPENHO DO MÉTODO (FIGURAS DE MÉRITO)

### 2.1. HIDROCARBONETOS MONOTERPÊNICOS

Para se obter as curvas analíticas, injetaram-se soluções dos padrões  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno,  $\gamma$ -terpineno, canfeno e p-cimeno, em concentrações que variavam de 1 a 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada ponto destas retas corresponde à média de no mínimo três medidas da área de cada pico.

A **Tabela XIII** apresenta as figuras de mérito (equação da regressão e outros parâmetros calculados para os analitos) para estas determinações. Os valores obtidos de cada área de cada pico foram utilizados para aplicar na equação de regressão linear dentro do método dos mínimos quadrados.

O limite de detecção (LD) foi calculado, usando-se 3 vezes o desvio padrão do ponto de interceptação dividido pela inclinação da reta. O limite de quantificação (LQ) foi calculado usando 10 vezes o desvio padrão do ponto de interceptação dividido pela inclinação da reta.

O desvio padrão (S) e o nível de ajuste da curva ( $R^2$ ) foram obtidos pelo método estatístico de análise de variância (ANOVA) para validação do método de calibração. Obteve-se um valor médio de 0,03 para S enquanto que o  $R^2$  foi sempre maior que 98 %.

O método proposto permitiu que os monoterpenos fossem determinados com baixos níveis de detecção (LD entre 0,08 e 0,16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para avaliar o método, foram injetados 11 vezes, em duplicata, soluções dos padrões (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada monoterpeno). Em todos os casos, o desvio padrão relativo do tempo de migração foi menor do que 2,1 % e menor do que 8,2 % para a área do pico.

**Tabela XIII** – Figuras de mérito para o método de CCEM, usando hidrocarbonetos monoterpênicos.

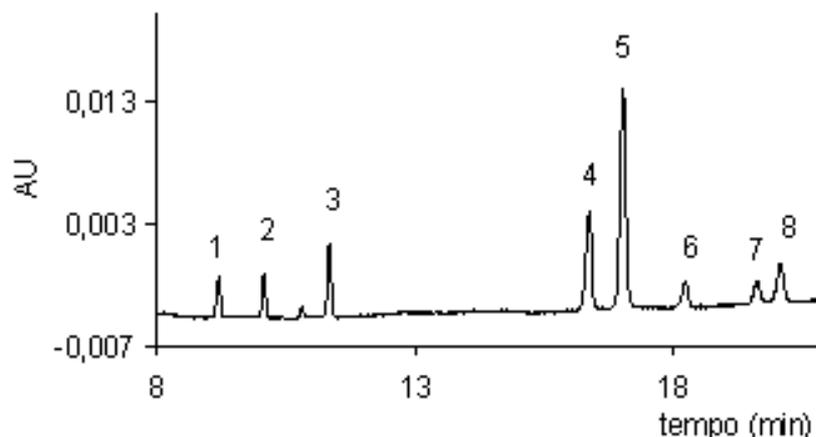
Analito	$y = a + bx$	S	r	$R^2$	RSD Área (%)	RSD tempo (%)	LD	LQ
Canfeno	$a = 0,061 \pm 1,43 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,039 \pm 0,12 \cdot 10^{-3}$	0,023	0,998	99,56	8,2	1,8	0,11	0,36
Terpinoleno	$a = 0,011 \pm 1,88 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,071 \pm 0,10 \cdot 10^{-3}$	0,030	0,999	99,77	7,1	2,1	0,08	0,26
$\beta$ -Pino	$a = 0,066 \pm 1,33 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,036 \pm 0,11 \cdot 10^{-3}$	0,021	0,998	99,67	6,4	1,9	0,11	0,40
p-Cimeno	$a = 0,321 \pm 6,97 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,131 \pm 0,59 \cdot 10^{-3}$	0,112	0,998	99,62	7,8	2,0	0,16	0,53
$\alpha$ -Pino	$a = 0,029 \pm 0,78 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,019 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$	0,013	0,997	99,43	7,6	2,0	0,12	0,41
$\alpha$ -Terpino	$a = 0,037 \pm 0,94 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,026 \pm 0,08 \cdot 10^{-3}$	0,015	0,998	99,50	7,1	2,1	0,11	0,36
$\gamma$ -Terpino	$a = 0,066 \pm 1,51 \cdot 10^{-3}$ $b = -0,038 \pm 0,13 \cdot 10^{-3}$	0,024	0,998	99,58	7,4	2,1	0,12	0,40

$a$  = coeficiente angular;  $b$  = coeficiente linear;  $r$  = coeficiente de correlação;  $S$  = desvio padrão residual;  $R^2$  = nível de ajuste da curva (%) obtido por ANOVA para a validação do método;  $RSD$  = valores do desvio padrão relativo da área e do tempo de migração eletroforético;  $LD$  = limite de detecção;  $LQ$  = limite de quantificação. Concentrações de  $LD$  e  $LQ$  são expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Eletrólito: 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6 mM de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 50 mM de DSS, 7 mM de  $\gamma$ -CD e 10% de acetonitrila; pH 8.0; 20 kV; 25°C; 5 s de injeção hidrodinâmica; detector a 200 nm.

## 2.2. HIDROCARBONETOS E ÁLCOOIS MONOTERPÊNICOS

Soluções dos padrões  $\alpha$ -pino,  $\alpha$ -terpino, terpinoleno,  $\gamma$ -terpino, p-cimeno terpinenol-4,  $\alpha$ -terpineol e linalol, em concentrações de 1 a 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram injetadas, obtendo-se retas de calibração, com base no método estabelecido anteriormente. A única diferença foi o tamanho do capilar que foi diminuído para 47

cm de comprimento, com 40 cm de distância até o detector, o que permitiu análises mais rápidas. A **Figura 21** mostra um eletroferograma dos oito monoterpênicos a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 21** – Eletroferograma dos oito álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos: (1) terpineol-4, (2)  $\alpha$ -terpineol, (3) linalol, (4) terpinoleno, (5) p-cimeno, (6) (+)- $\alpha$ -pineno, (7)  $\alpha$ -terpineno e (8)  $\gamma$ -terpineno.

Condições: solução do eletrólito: 10 mM de fosfato, 6 mM de borato, 50 mM de DSS, 7 mM de  $\gamma$ -CD e 10% de acetonitrila; pH = 8.0 ajustado pela adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,1 M; capilar de sílica fundida (40 cm X 75  $\mu\text{m}$  d.i.); voltagem aplicada: 20 kV; detecção: 200 nm; temperatura: 25°C.

A **Tabela XIV** apresenta as figuras de mérito para a aplicação do método na separação de 3 álcoois monoterpênicos e 5 hidrocarbonetos terpênicos. O tratamento estatístico dos dados foi o mesmo descrito anteriormente. Obteve-se valores entre 0,24 e 0,01 para S enquanto que o  $R^2$  foi sempre maior que 98,54 %. O método proposto permitiu que os terpenos fossem determinados com baixos níveis de detecção (LD entre 0,09 e  $1,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O limite de quantificação obtido ficou entre 0,30 e  $4,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  para todos os terpenos. Para validar o método, foram injetados 11 vezes, em duplicata, soluções dos padrões ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada terpeno). Em todos os casos, o desvio padrão relativo do tempo de migração foi menor do que 2,9 % e menor do que 8,1 % para a área do pico.

**Tabela XIV** – Figuras de mérito para o método de CCEM, usando álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos.

Analito	$y = a + bx$	S	r	$R^2$	RSD área (%)	RSD tempo (%)	LD	LQ
Terpineol-4	$a = 0,52 \cdot 10^{-2} \pm 0,73 \cdot 10^{-2}$ $b = 2,32 \cdot 10^{-2} \pm 0,06 \cdot 10^{-2}$	0,015	0,996	99,23	5,5	2,3	0,94	3,14
$\alpha$ -Terpineol	$a = 0,26 \cdot 10^{-2} \pm 1,06 \cdot 10^{-2}$ $b = 3,01 \cdot 10^{-2} \pm 0,09 \cdot 10^{-2}$	0,022	0,995	99,04	5,4	2,2	1,06	3,54
Linalol	$a = -0,37 \cdot 10^{-2} \pm 0,17 \cdot 10^{-2}$ $b = 5,76 \cdot 10^{-2} \pm 0,15 \cdot 10^{-2}$	0,035	0,997	99,34	8,1	2,9	0,09	0,30
Terpinoleno	$a = -14,96 \cdot 10^{-2} \pm 5,36 \cdot 10^{-2}$ $b = 14,79 \cdot 10^{-2} \pm 0,48 \cdot 10^{-2}$	0,112	0,995	98,97	8,0	2,8	1,09	3,62
p-Cimeno	$a = -16,92 \cdot 10^{-2} \pm 11,68 \cdot 10^{-2}$ $b = 33,27 \cdot 10^{-2} \pm 1,04 \cdot 10^{-2}$	0,243	0,995	99,04	7,6	2,7	1,05	3,51
$\alpha$ -Pirino	$a = -6,90 \cdot 10^{-2} \pm 1,46 \cdot 10^{-2}$ $b = 4,71 \cdot 10^{-2} \pm 0,13 \cdot 10^{-2}$	0,030	0,994	99,25	8,0	2,8	0,93	3,10
$\alpha$ -Terpineno	$a = -4,30 \cdot 10^{-2} \pm 1,40 \cdot 10^{-2}$ $b = 4,38 \cdot 10^{-2} \pm 0,12 \cdot 10^{-2}$	0,029	0,996	99,19	6,3	2,5	0,96	3,20
$\gamma$ -Terpineno	$a = -8,72 \cdot 10^{-2} \pm 3,54 \cdot 10^{-2}$ $b = 8,18 \cdot 10^{-2} \pm 0,31 \cdot 10^{-2}$	0,074	0,993	98,54	7,5	2,7	1,30	4,33

$a$  = coeficiente angular;  $b$  = coeficiente linear;  $r$  = coeficiente de correlação;  $S$  = desvio padrão;  $R^2$  = nível de ajuste de curva (%) obtido por ANOVA para a validação do método;  $RSD$  = valores do desvio padrão relativo da área e do tempo de migração eletroforético;  $LD$  = limite de detecção;  $LQ$  = limite de quantificação. Concentrações de  $LD$  e  $LQ$  são expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Eletrólito: 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6 mM de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 50 mM de DSS, 7 mM de  $\gamma$ -CD e 10% de acetonitrila; pH 8.0; 20 kV; 25°C; 5 s de injeção hidrodinâmica; detector: 200 nm.

### 3. APLICAÇÃO DO MÉTODO

#### 3.1. AMOSTRAS SINTÉTICAS

Com a finalidade de validar o método, o mesmo foi aplicado na determinação de 7 monoterpenos em amostras sintéticas. Prepararam-se 5 amostras sintéticas, com diferentes concentração dos analitos. A concentração de cada analito, nas diferentes amostras sintéticas, foram similares àquelas presentes em amostras reais, de acordo com dados da literatura consultada<sup>6,154</sup>. Os resultados são apresentados na **Tabela XV** e apresentam recuperação entre 93 e 110%. Assim, esse método pode ser aplicado para separação e quantificação de monoterpenos presentes em óleo essencial obtido de folhas e flores de orégano e manjerona, bem como de outras amostras reais.

#### 3.2. AMOSTRAS REAIS

O método determinado e otimizado anteriormente, foi usado para a determinação direta de oito álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos, em óleo essencial, obtido da extração por arraste de vapor das 5 amostras de manjerona (amostras e extração descritas na pag 64). Foram injetadas soluções aquosas (água Milli-Q) dos óleos essenciais das cinco amostras de manjerona (M1, M2, M3, M4 e M5) em vários níveis de concentração (10 a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Selecionou-se a concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as análises das amostras reais porque foi a que apresentou a melhor resolução. Para validar o método analítico proposto, as amostras de manjerona foram fortificadas com uma mistura dos padrões. Em 10 mL de cada solução de manjerona de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi adicionado solução de cada monoterpeno, nas seguintes concentrações: 1, 3, 5, 10 e 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A **Tabela XVI** apresenta os resultados obtidos nessas análises, onde se pode observar que houve recuperação entre 80 e 113 %. De acordo com resultados apresentados na **Tabela XVI**, o terpineol-4,  $\alpha$ -terpineol e linalol estão presentes em todas as amostras. Terpinenol-4 é o maior componente nas amostras M1, M2, M3 e M5 e,  $\alpha$ -terpineol é o majoritário em M4.

**Tabela XV** – Valores de recuperação para a análise das amostras sintéticas baseada no método proposto.

<i>Amostras Sintéticas</i>	<i>Analitos</i>	<i>Concentração adicionada</i>	<i>Concentração encontrada</i>	<i>Recuperação (%)</i>
<i>Amostra 1</i>	Canfeno	10,0	10,2 ± 0,02	102,2 ± 0,03
	Terpinoleno	3,0	2,9 ± 0,02	96,3 ± 0,02
	β-Pineno	5,0	4,9 ± 0,02	99,0 ± 0,03
	p-Cimeno	3,0	3,2 ± 0,01	107,2 ± 0,02
	α-Pineno	10,0	10,4 ± 0,01	104,1 ± 0,03
	α-Terpineno	5,0	5,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01
	γ-Terpineno	5,0	5,4 ± 0,01	108,0 ± 0,02
<i>Amostra 2</i>	Canfeno	5,0	5,2 ± 0,01	103,8 ± 0,03
	Terpinoleno	5,0	4,9 ± 0,01	98,3 ± 0,02
	β-Pineno	5,0	5,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01
	p-Cimeno	10,0	10,9 ± 0,01	109,0 ± 0,02
	α-Pineno	5,0	4,9 ± 0,01	98,3 ± 0,03
	α-Terpineno	3,0	2,8 ± 0,03	94,2 ± 0,03
	γ-Terpineno	3,0	3,3 ± 0,02	111,0 ± 0,03
<i>Amostra 3</i>	Canfeno	3,0	3,2 ± 0,01	106,9 ± 0,01
	Terpinoleno	1,0	0,9 ± 0,03	96,6 ± 0,03
	β-Pineno	3,0	2,9 ± 0,01	96,9 ± 0,02
	p-Cimeno	5,0	5,3 ± 0,01	106,1 ± 0,01
	α-Pineno	3,0	2,9 ± 0,04	98,2 ± 0,03
	α-Terpineno	10,0	10,7 ± 0,03	107,6 ± 0,04
	γ-Terpineno	10,0	10,8 ± 0,02	108,0 ± 0,04
<i>Amostra 4</i>	Canfeno	15,0	15,2 ± 0,04	101,1 ± 0,01
	Terpinoleno	10,0	10,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01
	β-Pineno	10,0	10,2 ± 0,03	101,7 ± 0,03
	p-Cimeno	1,0	1,1 ± 0,04	105,5 ± 0,01
	α-Pineno	15,0	15,1 ± 0,03	100,9 ± 0,01
	α-Terpineno	1,0	0,9 ± 0,03	96,3 ± 0,03
	γ-Terpineno	1,0	0,9 ± 0,03	96,9 ± 0,03
<i>Amostra 5</i>	Canfeno	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01
	Terpinoleno	3,0	2,9 ± 0,01	97,0 ± 0,01
	β-Pineno	1,0	0,9 ± 0,03	93,3 ± 0,03
	p-Cimeno	3,0	3,2 ± 0,02	106,1 ± 0,01
	α-Pineno	1,0	0,9 ± 0,04	94,4 ± 0,04
	α-Terpineno	5,0	5,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01
	γ-Terpineno	15,0	15,1 ± 0,04	101,0 ± 0,02

Concentração em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

**Tabela XVI** - Quantificação dos analitos nas amostras de manjerona, usando o método proposto, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (ND = não detectada)

<i>Analitos</i>	<i>Amostra</i>	<i>Concentração adicionada</i>	<i>Concentração encontrada</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Concentração na amostra</i>
Terpineol-4	<i>Manjerona 1</i>	1,0	0,8 ± 0,01	80,4 ± 0,01	31,4 ± 0,01
		3,0	3,2 ± 0,03	107,2 ± 0,02	
		5,0	5,5 ± 0,02	109,1 ± 0,01	
		10,0	11,0 ± 0,03	110,1 ± 0,03	
		15,0	15,7 ± 0,01	104,7 ± 0,01	
	<i>Manjerona 2</i>	1,0	1,1 ± 0,02	105,4 ± 0,01	24,7 ± 0,03
		3,0	2,6 ± 0,01	87,0 ± 0,02	
		5,0	4,8 ± 0,01	95,7 ± 0,01	
		10,0	10,5 ± 0,02	104,5 ± 0,02	
		15,0	15,5 ± 0,02	103,0 ± 0,03	
	<i>Manjerona 3</i>	1,0	0,9 ± 0,02	97,8 ± 0,01	34,5 ± 0,02
		3,0	3,2 ± 0,03	108,2 ± 0,02	
		5,0	5,1 ± 0,02	101,3 ± 0,01	
		10,0	10,4 ± 0,01	104,1 ± 0,01	
		15,0	15,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	
	<i>Manjerona Sevilha</i>	1,0	1,1 ± 0,01	103,5 ± 0,01	4,2 ± 0,01
		3,0	2,9 ± 0,02	96,8 ± 0,03	
		5,0	5,1 ± 0,01	100,8 ± 0,01	
		10,0	10,3 ± 0,01	103,4 ± 0,01	
		15,0	15,6 ± 0,02	103,8 ± 0,02	
	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	1,1 ± 0,02	111,1 ± 0,01	20,0 ± 0,02
		3,0	3,1 ± 0,02	103,8 ± 0,02	
		5,0	5,1 ± 0,01	101,6 ± 0,03	
		10,0	10,5 ± 0,01	105,1 ± 0,01	
		15,0	15,5 ± 0,02	103,3 ± 0,02	
$\gamma$ -Terpineno	<i>Manjerona 2</i>	1,0	0,9 ± 0,01	94,4 ± 0,02	6,4 ± 0,02
		3,0	3,2 ± 0,01	105,5 ± 0,01	
		5,0	5,2 ± 0,02	104,1 ± 0,02	
		10,0	10,1 ± 0,03	101,1 ± 0,03	
		15,0	14,8 ± 0,01	98,5 ± 0,01	
	<i>Manjerona 3</i>	1,0	1,1 ± 0,03	108,5 ± 0,01	19,8 ± 0,01
		3,0	3,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	
		5,0	5,2 ± 0,02	104,6 ± 0,02	
		10,0	10,6 ± 0,01	106,2 ± 0,02	
		15,0	15,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	
	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	10,4 ± 0,02
		3,0	3,1 ± 0,03	103,1 ± 0,02	
		5,0	5,4 ± 0,02	108,7 ± 0,03	
		10,0	9,9 ± 0,02	99,1 ± 0,03	
		15,0	15,7 ± 0,02	104,4 ± 0,03	

**Tabela XVI** (Continuação I)

<i>Analitos</i>	<i>Amostra</i>	<i>Concentração adicionada</i>	<i>Concentração encontrada</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Concentração na amostra</i>	
Linalol	<i>Manjerona 1</i>	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	3,4 ± 0,02	
		3,0	2,9 ± 0,03	97,5 ± 0,03		
		5,0	5,2 ± 0,02	104,4 ± 0,02		
		10,0	10,1 ± 0,01	100,6 ± 0,02		
		15,0	15,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01		
	<i>Manjerona 2</i>	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	4,5 ± 0,02	
		3,0	3,3 ± 0,02	108,5 ± 0,03		
		5,0	5,4 ± 0,03	107,4 ± 0,02		
		10,0	10,6 ± 0,01	105,7 ± 0,03		
		15,0	14,9 ± 0,01	99,5 ± 0,02		
	<i>Manjerona 3</i>	1,0	0,8 ± 0,01	81,4 ± 0,02	3,5 ± 0,01	
		3,0	3,1 ± 0,02	103,7 ± 0,03		
		5,0	5,6 ± 0,03	112,3 ± 0,02		
		10,0	9,3 ± 0,01	93,1 ± 0,01		
		15,0	15,5 ± 0,01	103,6 ± 0,01		
	<i>Manjerona Sevilha</i>	1,0	0,9 ± 0,01	96,3 ± 0,02	5,1 ± 0,02	
		3,0	2,8 ± 0,02	95,0 ± 0,02		
		5,0	5,1 ± 0,01	100,7 ± 0,02		
		10,0	10,2 ± 0,03	102,0 ± 0,01		
		15,0	15,8 ± 0,02	105,2 ± 0,03		
	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	0,9 ± 0,01	98,9 ± 0,02	3,6 ± 0,01	
		3,0	3,1 ± 0,02	101,4 ± 0,02		
		5,0	5,1 ± 0,02	101,6 ± 0,01		
		10,0	10,1 ± 0,01	100,8 ± 0,03		
15,0		14,9 ± 0,01	99,1 ± 0,02			
$\alpha$ -Pinenol	<i>Manjerona 2</i>	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	ND	
		3,0	3,1 ± 0,02	101,4 ± 0,03		
		5,0	5,1 ± 0,01	101,2 ± 0,02		
		10,0	9,9 ± 0,03	99,5 ± 0,03		
		15,0	15,1 ± 0,02	100,7 ± 0,03		
	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	0,8 ± 0,01	82,4 ± 0,03	1,0 ± 0,03	
		3,0	3,1 ± 0,02	103,1 ± 0,01		
		5,0	5,4 ± 0,03	108,7 ± 0,03		
		10,0	10,1 ± 0,01	101,0 ± 0,02		
		15,0	15,4 ± 0,02	102,9 ± 0,03		
	$\alpha$ -Terpineno	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	10,9 ± 0,02
			3,0	3,2 ± 0,02	107,9 ± 0,03	
			5,0	5,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	
			10,0	10,1 ± 0,03	101,3 ± 0,03	
15,0			15,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01		

**Tabela XVI** (Continuação II)

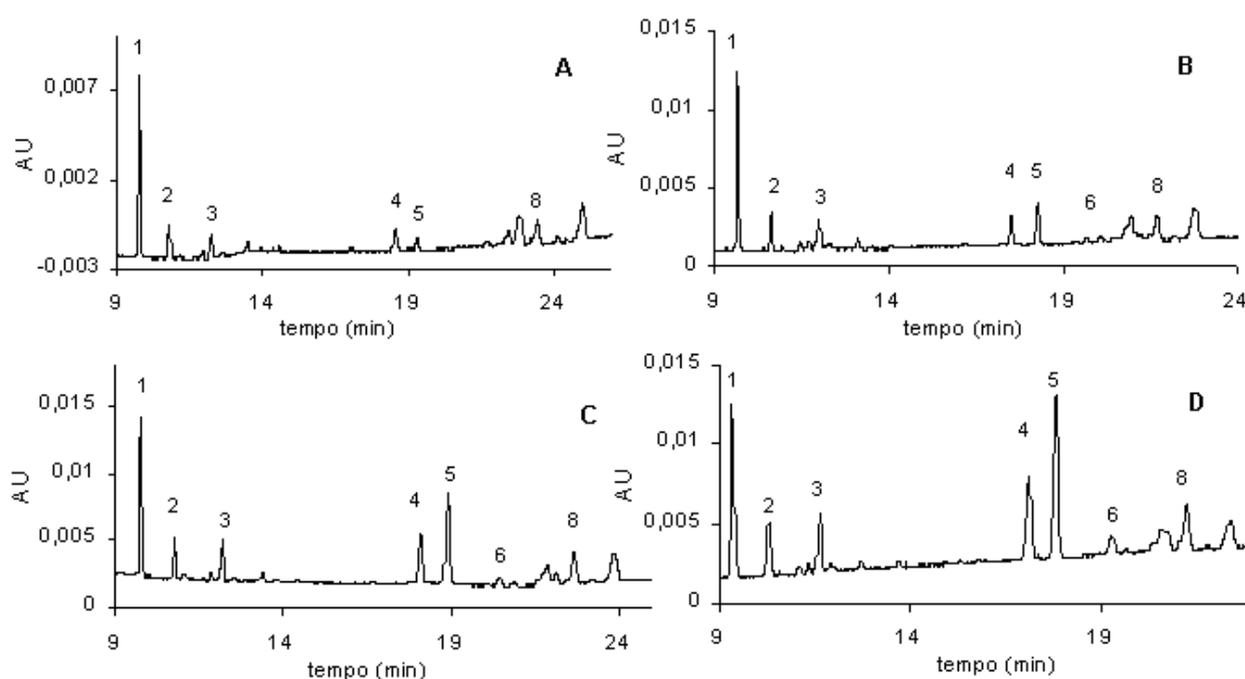
<i>Analitos</i>	<i>Amostra</i>	<i>Concentração adicionada</i>	<i>Concentração encontrada</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Concentração na amostra</i>
$\alpha$ -Terpineol	<i>Manjerona 1</i>	1,0	0,8 $\pm$ 0,02	85,5 $\pm$ 0,02	7,9 $\pm$ 0,01
		3,0	3,2 $\pm$ 0,02	105,7 $\pm$ 0,03	
		5,0	5,4 $\pm$ 0,01	108,3 $\pm$ 0,02	
		10,0	10,1 $\pm$ 0,03	100,5 $\pm$ 0,01	
		15,0	15,3 $\pm$ 0,01	101,8 $\pm$ 0,02	
	<i>Manjerona 2</i>	1,0	0,9 $\pm$ 0,03	94,7 $\pm$ 0,03	8,5 $\pm$ 0,02
		3,0	3,2 $\pm$ 0,01	105,3 $\pm$ 0,01	
		5,0	5,3 $\pm$ 0,01	105,6 $\pm$ 0,03	
		10,0	10,6 $\pm$ 0,02	106,2 $\pm$ 0,02	
		15,0	14,4 $\pm$ 0,01	96,0 $\pm$ 0,01	
	<i>Manjerona 3</i>	1,0	0,9 $\pm$ 0,01	93,5 $\pm$ 0,01	5,4 $\pm$ 0,02
		3,0	3,1 $\pm$ 0,02	104,8 $\pm$ 0,02	
		5,0	4,9 $\pm$ 0,03	99,3 $\pm$ 0,03	
		10,0	9,8 $\pm$ 0,02	97,8 $\pm$ 0,02	
		15,0	16,0 $\pm$ 0,01	106,3 $\pm$ 0,01	
	<i>Manjerona Sevilha</i>	1,0	1,0 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,01	14,0 $\pm$ 0,02
		3,0	2,8 $\pm$ 0,02	92,7 $\pm$ 0,03	
		5,0	5,1 $\pm$ 0,01	101,9 $\pm$ 0,01	
		10,0	10,6 $\pm$ 0,02	106,2 $\pm$ 0,01	
		15,0	14,9 $\pm$ 0,01	99,4 $\pm$ 0,01	
	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	1,0 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,01	7,2 $\pm$ 0,02
		3,0	3,1 $\pm$ 0,02	104,3 $\pm$ 0,02	
		5,0	5,3 $\pm$ 0,02	106,7 $\pm$ 0,03	
		10,0	10,3 $\pm$ 0,02	102,5 $\pm$ 0,02	
		15,0	15,0 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,01	
Terpinoleno	<i>Manjerona 1</i>	1,0	0,9 $\pm$ 0,01	94,7 $\pm$ 0,03	ND
		3,0	2,7 $\pm$ 0,01	88,7 $\pm$ 0,02	
		5,0	5,3 $\pm$ 0,02	105,3 $\pm$ 0,02	
		10,0	10,4 $\pm$ 0,02	104,1 $\pm$ 0,01	
		15,0	15,5 $\pm$ 0,01	103,3 $\pm$ 0,01	
	<i>Manjerona 2</i>	1,0	0,8 $\pm$ 0,02	80,7 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,02
		3,0	3,1 $\pm$ 0,01	101,1 $\pm$ 0,02	
		5,0	5,5 $\pm$ 0,02	109,0 $\pm$ 0,01	
		10,0	10,5 $\pm$ 0,01	105,2 $\pm$ 0,02	
		15,0	14,3 $\pm$ 0,02	95,5 $\pm$ 0,02	
	<i>Manjerona 3</i>	1,0	0,9 $\pm$ 0,01	98,0 $\pm$ 0,02	2,0 $\pm$ 0,03
		3,0	3,0 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,01	
		5,0	4,9 $\pm$ 0,02	99,3 $\pm$ 0,02	
		10,0	10,5 $\pm$ 0,02	105,5 $\pm$ 0,02	
		15,0	15,0 $\pm$ 0,01	100,0 $\pm$ 0,01	

**Tabela XVI** (Continuação III)

<i>Analitos</i>	<i>Amostra</i>	<i>Concentração adicionada</i>	<i>Concentração encontrada</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Concentração na amostra</i>	
Terpinoleno	<i>Manjerona Sevilha</i>	1,0	1,2 ± 0,03	113,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	
		3,0	2,9 ± 0,01	96,9 ± 0,02		
		5,0	5,1 ± 0,01	101,0 ± 0,02		
		10,0	10,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01		
		15,0	16,0 ± 0,02	106,5 ± 0,02		
	<i>Manjerona Sória</i>	1,0	1,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01	4,0 ± 0,01	
		3,0	3,2 ± 0,02	105,2 ± 0,01		
		5,0	5,5 ± 0,01	109,3 ± 0,02		
		10,0	10,6 ± 0,02	105,6 ± 0,02		
		15,0	14,6 ± 0,01	97,6 ± 0,03		
	p-Cimeno	<i>Manjerona 1</i>	1,0	0,8 ± 0,01	81,8 ± 0,03	ND
			3,0	2,6 ± 0,02	87,3 ± 0,02	
			5,0	5,1 ± 0,02	101,9 ± 0,02	
			10,0	10,8 ± 0,01	107,6 ± 0,01	
			15,0	15,2 ± 0,01	101,0 ± 0,01	
<i>Manjerona 2</i>		1,0	0,9 ± 0,01	89,5 ± 0,01	0,3 ± 0,01	
		3,0	3,1 ± 0,01	101,1 ± 0,02		
		5,0	4,9 ± 0,03	97,6 ± 0,03		
		10,0	10,5 ± 0,01	105,0 ± 0,02		
		15,0	14,7 ± 0,02	97,9 ± 0,02		
<i>Manjerona 3</i>		1,0	0,8 ± 0,01	83,5 ± 0,01	0,8 ± 0,01	
		3,0	3,1 ± 0,01	104,3 ± 0,01		
		5,0	5,5 ± 0,02	109,9 ± 0,02		
		10,0	10,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01		
		15,0	15,1 ± 0,02	100,4 ± 0,02		
<i>Manjerona Sevilha</i>		1,0	0,9 ± 0,02	98,2 ± 0,02	ND	
		3,0	2,7 ± 0,01	90,6 ± 0,02		
		5,0	4,7 ± 0,01	94,9 ± 0,01		
		10,0	10,0 ± 0,01	100,0 ± 0,01		
		15,0	15,3 ± 0,03	102,1 ± 0,02		
<i>Manjerona Sória</i>		1,0	0,8 ± 0,02	81,8 ± 0,02	2,5 ± 0,02	
		3,0	3,1 ± 0,01	101,5 ± 0,03		
		5,0	5,5 ± 0,01	109,4 ± 0,1		
		10,0	9,9 ± 0,01	99,3 ± 0,01		
		15,0	14,1 ± 0,02	94,3 ± 0,02		

A **Figura 22** apresenta os eletroferogramas da amostra do óleo essencial de manjerona (M2). O  $\alpha$ -terpineno não foi detectado quando a amostra M2 foi fortificada com diferentes concentrações dos álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos, devido à provável sobreposição deste com outros componentes,

Com base nos resultados apresentados na **Tabela XVI** e na **Figura 22**, pode-se afirmar que o método foi aplicado com sucesso nas amostras de manjerona (óleo essencial), que é uma matriz muito complexa. Dessa maneira acredita-se que possa ser aplicado para a separação e identificação desses e de outros tipos de compostos presentes em óleo essencial de outras plantas aromáticas.



**Figura 22** – Eletroferogramas dos álcoois e hidrocarbonetos monoterpênicos: (1) terpineol-4, (2)  $\alpha$ -terpineol, (3) linalol, (4) terpinoleno, (5) p-cimeno, (6) (+)- $\alpha$ -pineno, (7)  $\alpha$ -terpineno e (8)  $\gamma$ -terpineno, (A) óleo essencial da manjerona ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (B) fortificado com  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada monoterpeneo; (C) fortificado com  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada monoterpeneo; (D) fortificado com  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada monoterpeneo, Condições: ver **Figura 21**

**CAPÍTULO 6:  
COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS  
DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS  
ORGÂNICOS DE MANJERONA E DE  
ORÉGANO COM SOLVENTES  
ORGÂNICOS**

---

---

## EXPERIMENTAL

Neste capítulo são comparados os métodos de extração por maceração, Soxhlet e ultra-som, para amostras de flores e folhas de manjerona e de orégano.

### 1. AMOSTRAS

As amostras comerciais de manjerona e de orégano utilizadas nas extrações foram adquiridas no comércio e são distribuídas por Litte S/A Importadora e Comércio. Em algumas extrações, também foram utilizadas amostras cultivadas, conforme descrito no Capítulo 4.

### 2. REAGENTES E SOLVENTES

Todos os solventes utilizados foram grau p.a. Merck bi-distilados e usados no prazo máximo de uma semana. O sulfato de sódio anidro (p.a. Merck) foi previamente mantido em estufa, a 105 °C, por 4h. O N<sub>2</sub> era de grau UP (99,99%, White Martins).

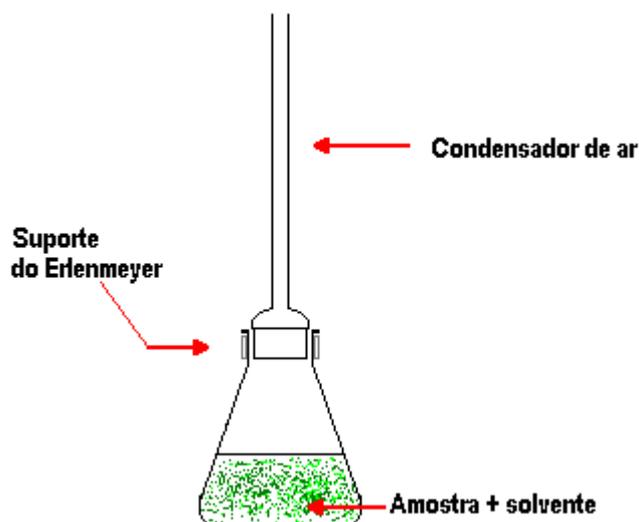
A sílica gel usada (Merck 70-230 mesh) foi tratada de acordo com o seguinte procedimento: 30,0 g são submetidas a lavagens sucessivas de 3 x 25 mL de acetona; 3 x 25 mL de hexano e 3 x 25 mL de diclorometano, em sistema de vácuo. A evaporação do solvente é realizada em cápsula de porcelana, por uma noite, à temperatura ambiente em capela, usando-se uma cobertura de papel de alumínio perfurado. A sílica seca foi ativada a 180 °C por 20 horas em cápsula de porcelana revestida com papel de alumínio perfurado e, posteriormente, guardada em dessecador.

Os padrões,  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, linalol, terpineol-4,  $\alpha$ -terpineol, carvacrol, timol e bifenila são da Aldrich, Palo Alto, CA, EUA. Foram preparadas soluções estoques de cada padrão (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em diclorometano (grau p.a. Merck) e guardadas sob refrigeração.

### 3. MÉTODOS UTILIZADOS

#### 3.1. MACERAÇÃO<sup>92</sup>

Cerca de 10 g de cada amostra foram colocadas em um erlenmeyer de 200 mL (**Figura 23**). A extração foi realizada usando os solventes orgânicos, hexano, acetato de etila e metanol. Adicionou-se cerca de 150 mL de hexano, deixando em contato por um período de 10 dias, com agitação ocasional. Após, filtrou-se e 150 mL do acetato de etila foram adicionados na mesma amostra, repetindo-se este procedimento para o metanol. Os filtrados foram concentrados em rotavapor, secos sob N<sub>2</sub> e guardados ao abrigo da luz e calor.

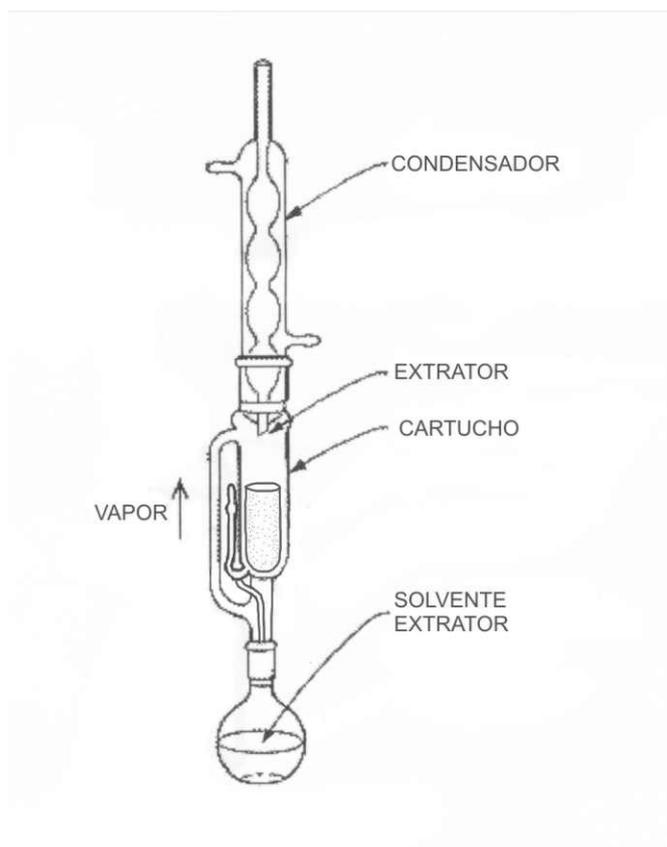


**Figura 23** – Desenho esquemático do equipamento usado para maceração

#### 3.2. SOXHLET<sup>91</sup>

Cerca de 10 g de cada amostra foram colocadas no cartucho de extração. No balão foram colocados cerca de 250 mL (**Figura 24**) de cada um dos seguintes solventes orgânicos: hexano, acetato de etila e metanol. Inicialmente, adicionaram-se cerca de 250 mL de hexano, deixando em refluxo por um período de 8 horas. Após, trocou-se o balão e 250 mL de acetato de etila foram adicionados na mesma amostra, repetindo-se este procedimento para o metanol. Os filtrados

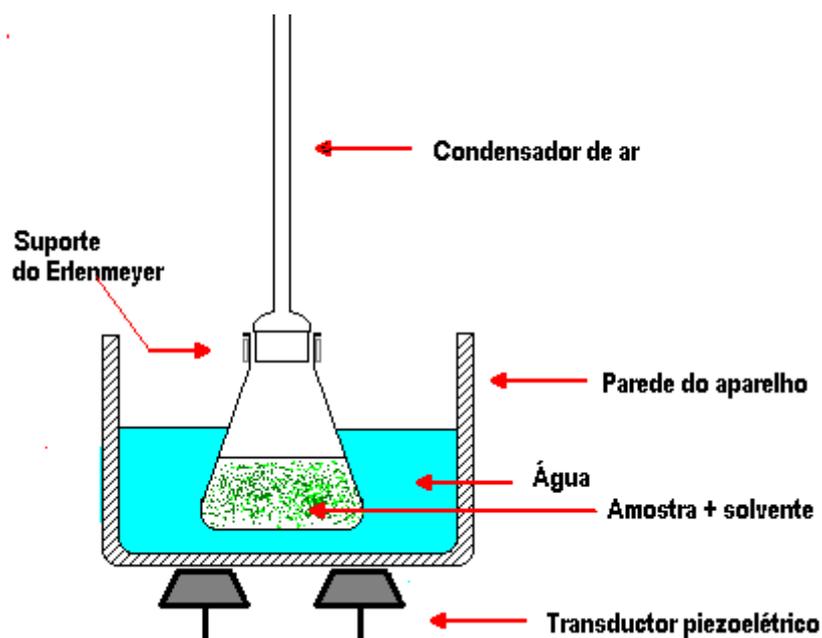
foram concentrados em rotavapor, secos sob  $N_2$  e guardados ao abrigo da luz e calor.



**Figura 24** - Desenho do equipamento usado para extração com Soxhlet.

### 3.3. ULTRA-SOM<sup>55,157</sup>

Cerca de 10 g de cada amostra foram colocadas em um erlenmeyer com condensador para a extração (equipamento tipo banho, Thorton, T-14, potência de 100 W) conforme esquema apresentado na **Figura 25**. Para a extração dos compostos ativos, amostras de orégano e manjerona secas foram sonicadas em 100 mL de cada solvente, por 1 h. O extrato foi recuperado por filtração em papel filtro Whatman 1PS. Os solventes foram usados pela ordem de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol. Após a extração com um solvente, o resíduo foi extraído com outro solvente. Estes extratos foram recuperados quantitativamente, secos sob  $N_2$ , pesados e guardados ao abrigo da luz e calor.



**Figura 25** - Equipamento utilizado para extração com ultra-som.

#### 4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM SÍLICA GEL<sup>4,5</sup>

Os extratos brutos de maceração, de Soxhlet e de ultra-som foram submetidos à cromatografia líquida preparativa em sílica gel, conforme metodologia descrita a seguir. Em uma coluna de vidro (30 cm x 11 mm) contendo 3,0 g de sílica previamente ativada, empacotada a seco, adicionou-se uma camada de 0,5 cm de sulfato de sódio anidro (aproximadamente 1,0 g). A coluna foi condicionada com 20 mL de hexano e, este eluente foi descartado. Em um béquer, colocaram-se cerca de 100 mg de cada extrato, obtido em cada extração, que foram adicionados com 0,500 g de sílica e 3 mL de diclorometano, misturando-se bem. Formou-se uma mistura finamente dividida pela evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente, esta mistura foi colocada no topo da coluna. A seguir fez-se eluir com cerca de 20 mL de cada um dos mesmos solventes usados na extração (hexano, acetato de etila e metanol). Foram obtidas três frações que posteriormente foram concentradas em atmosfera de nitrogênio e mantidas em dessecador, até peso constante. Cada fração foi dissolvida em diclorometano para, posteriormente, ser cromatografada.

## 5. ANÁLISE DAS FRAÇÕES POR CG/EM

As frações dos extratos de hexano e de acetato de etila da maceração, Soxhlet e ultra-som foram analisadas por CG/EM, conforme condições analíticas descritas na **Tabela XVII**. A identificação de alguns compostos foi feita com base na injeção de padrões ( $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, linalol, terpineol-4,  $\alpha$ -terpineol, carvacrol e timol) e da bifênila como padrão interno, através da comparação dos espectros de massas e do tempo de retenção de cada padrão. Os demais compostos foram identificados tentativamente por comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley do equipamento. Foram preparadas soluções estoque de cada padrão a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em diclorometano e misturas de todos padrões em várias concentrações. Foram injetados  $1 \mu\text{L}$  de cada solução, tanto dos padrões, quanto das frações dos extratos. Os extratos metanólicos não foram cromatografados devido a grande polaridade de seus constituintes.

**Tabela XVII** – Condições analíticas utilizadas na análise dos extratos de manjerona e orégano.

equipamento	CG/EM - Shimadzu QP5050A
coluna	HP -1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu\text{m}$ )
impacto eletrônico	70 eV
modo de injeção	split 1:30
gás de arraste; vazão	He; $1,5 \text{ mL min}^{-1}$
programação de temperatura	$50 \text{ }^\circ\text{C}$ (0 min) – $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ – $100 \text{ }^\circ\text{C}$ – $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ – $145 \text{ }^\circ\text{C}$ – $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ – $280 \text{ }^\circ\text{C}$ (25 min)
temperatura do injetor	$280 \text{ }^\circ\text{C}$
temperatura da coluna	$280 \text{ }^\circ\text{C}$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE MANJERONA E ORÉGANO

Os resultados obtidos nas extrações por maceração, Soxhlet e ultra-som dos extratos das folhas e das flores secas das amostras de manjerona e orégano são apresentados na **Tabela XVIII**. O teor médio de umidade das amostras foi de 10%. Para a extração com ultra-som, a amostra de manjerona foi usada somente para avaliar o tempo de extração, não se levando em conta o rendimento.

**Tabela XVIII** – Rendimento das extrações por maceração, Soxhlet e ultra-som, obtidos para as amostras de manjerona e orégano, expresso em mg (extrato) por 100 g de amostra.

Método	Amostra	Solventes		
		Hexano	Acetato de etila	Metanol
Maceração	Manjerona*	1,3	2,7	8,9
	Orégano*	1,1	2,8	10,7
Soxhlet	Manjerona T2	3,9	3,6	28,2
	Orégano T4	4,6	3,7	27,4
	Orégano*	5,9	5,6	25,3
Ultra-som	Orégano*	0,5	3,7	27,4

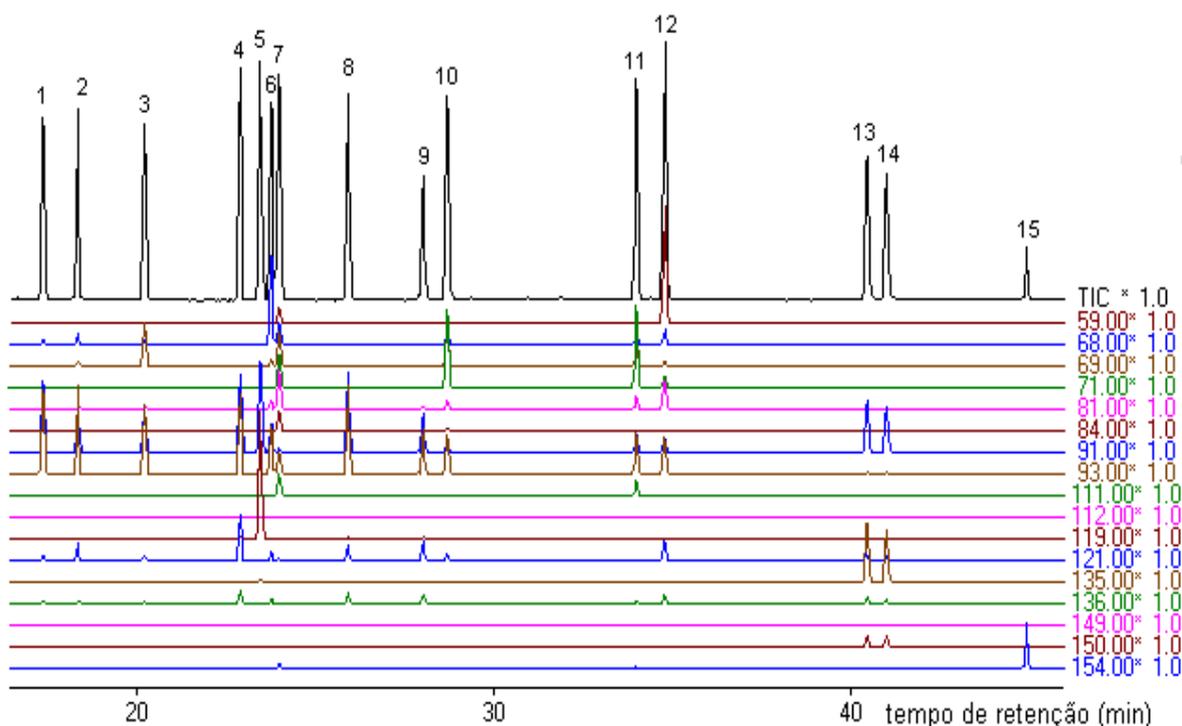
\* comercial

Em linhas gerais, o método de extração por Soxhlet apresentou maior rendimento, especialmente quando se utiliza o solvente mais polar, no caso, o metanol.

## 2. ANÁLISE DOS EXTRATOS DE MANJERONA E ORÉGANO VIA CG/EM

Foram analisados por CG/EM os extratos de hexano e acetato de etila, fracionados com hexano, acetato de etila e metanol (frações 1, 2 e 3 da CLP, respectivamente). A identificação de alguns compostos foi feita com base na injeção de padrões e da bifênila como padrão interno, através da comparação dos espectros de massas e do tempo de retenção de cada padrão.

A **Figura 26** apresenta o cromatograma destes padrões. A **Tabela XIX** apresenta os padrões, o tempo de retenção e os íons monitorados (59, 68, 69, 71, 81, 84, 91, 93, 111, 112, 119, 121, 135, 136, 149, 150 e 154), que são fragmentos característicos dos compostos encontrados nesses tipos de óleos. Os demais compostos foram tentativamente identificados com base na biblioteca Wiley NBS do equipamento.



**Figura 26** – Cromatograma pelo monitoramento de íons (modo SIM) dos padrões. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XIX**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVI I**.

**Tabela XIX** – Tempo de retenção e principais fragmentos iônicos dos hidrocarbonetos e álcoois monoterpênicos usados neste estudo.

Picos	Tempo de retenção (min)	Identificação via fragmentos de massa	Fragmentos iônicos*		PM	FM
1	17,508	$\alpha$ -pineno	<b>93</b>		136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
2	18,500	canfeno	<b>93</b>	121	136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
3	20,367	$\beta$ -pineno	69	<b>93</b>	136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
4	23,067	$\alpha$ -terpineno	93	<b>121</b>	136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
5	23,642	p-cimeno	91	<b>119</b>	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
6	23,950	limoneno	<b>68</b>	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
7	24,158	1,8-cineol	<b>81</b>	84	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
8	26,100	$\gamma$ -terpineno	91	<b>93</b>	136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
9	28,200	terpinoleno	<b>93</b>	121	136	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub>
10	28,875	linalol	43	<b>71</b>	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	34,158	terpineol-4	<b>71</b>	93	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	34,967	$\alpha$ -terpineol	<b>59</b>	93	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	40,633	timol	91	<b>135</b>	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
14	41,167	carvacrol	91	<b>135</b>	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
15	44,895	bifenila			<b>154</b>	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>

\* fragmentos monitorados em negrito

## 2.1. MACERAÇÃO

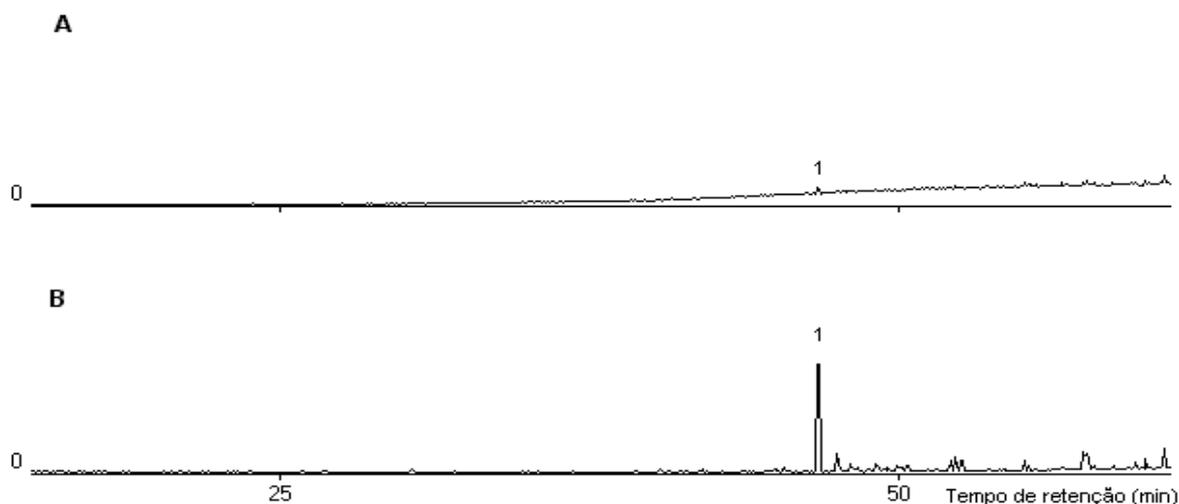
### 2.1.1. Extratos de Manjerona

As **Figuras 27, 28 e 29** apresentam os cromatogramas das frações de hexano, acetato de etila e metanol (frações 1, 2 e 3 da CLP, respectivamente), dos extratos obtidos por maceração, usando como solventes extratores o hexano e o acetato de etila.

A **Tabela XX** apresenta os principais compostos identificados, na fração acetato de etila, dos extratos de hexano e de acetato de etila, nas amostras de manjerona comercial. O tempo de retenção e a probabilidade foram obtidos para o extrato de acetato de etila.

Pelos cromatogramas da **Figura 27**, pode ser observado que a cromatografia líquida preparativa serviu como um *clean-up* da amostra. Somente um pico foi

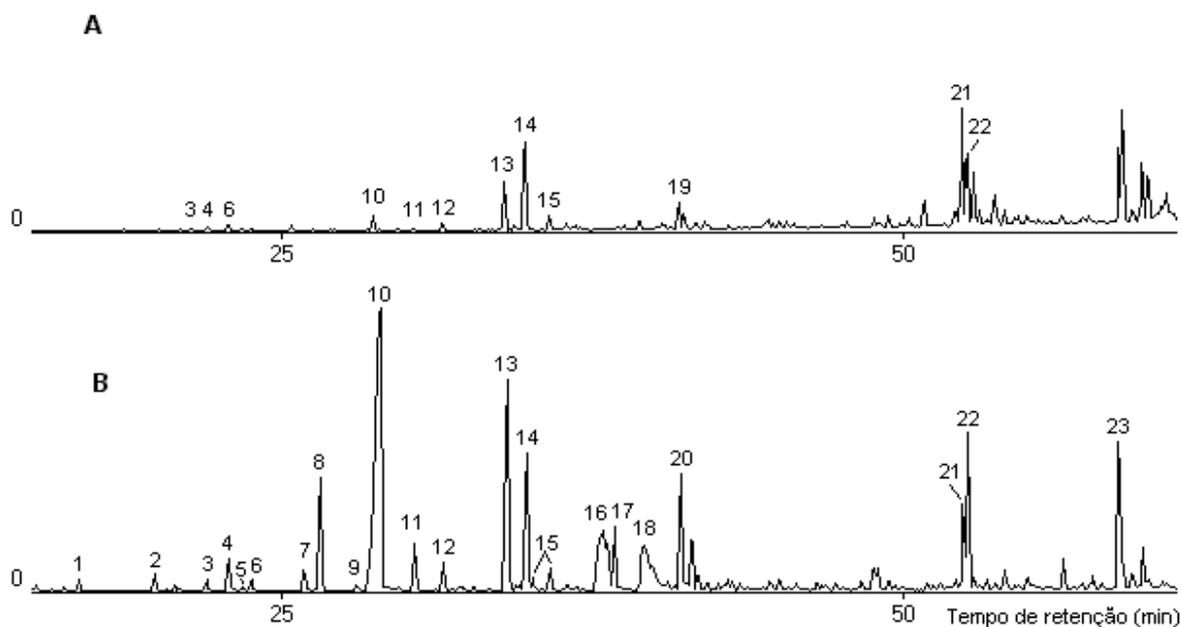
possível detectar, tanto no extrato de hexano, quanto no extrato de acetato de etila para a fração 1 da Cromatografia Líquida Preparativa (CLP), eluída com hexano. Com base nos espectros de massa da biblioteca Willey do equipamento, com ~95% de probabilidade, foi identificado o  $\beta$ -cariofileno, com tempo de retenção de aproximadamente de 46 min. Este composto não foi identificado nas outras frações dos outros extratos.



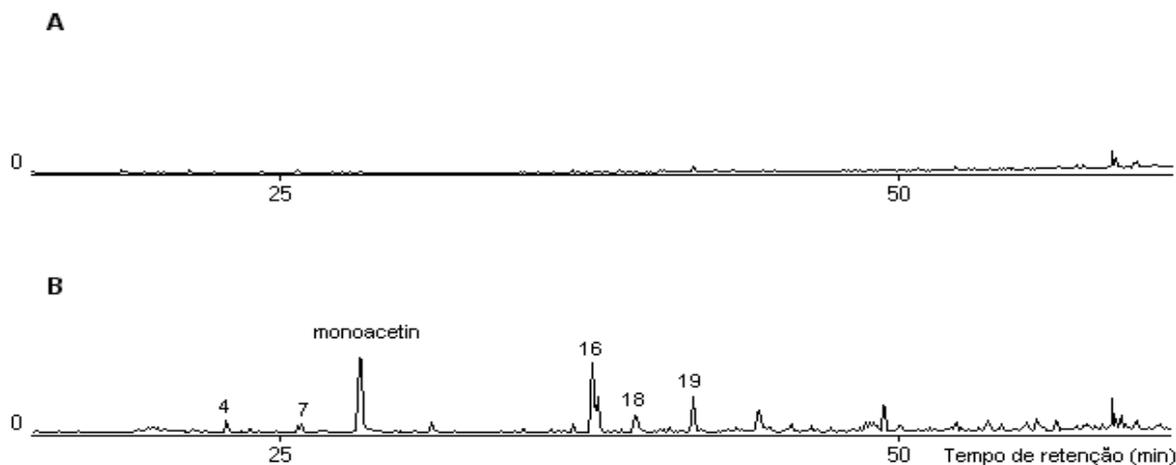
**Figura 27** – Cromatogramas do íon total das frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de manjerona comercial. O pico assinalado corresponde ao  $\beta$ -cariofileno. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XVII**.

Entretanto, como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 28**, as frações de acetato de etila, das extrações por maceração com hexano e com acetato de etila, foram eficientes na separação dos principais componentes extraídos das amostras de manjerona comercial.

A **Figura 29** apresenta os cromatogramas das frações de metanol da CLP, dos extratos de hexano e acetato de etila. Verifica-se a ausência de, praticamente todos hidrocarbonetos e álcoois terpênicos. Com isso, também comprova o efeito eficiente do acetato de etila na separação dos compostos.



**Figura 28** – Cromatogramas do íon total das frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de manjerona comercial. Os picos identificados estão na **Tabela XX**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XVII**.



**Figura 29** – Cromatogramas do íon total das frações de metanol (fração 3 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de manjerona comercial. Os picos identificados estão na **Tabela XX**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XVII**.

**Tabela XX** – Principais compostos identificados tentativamente nos extratos da maceração com hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de manjerona comercial.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Probabilidade %	PM	FM
1	16,908	$\alpha$ -pineno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	19,950	$\beta$ -pineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	22,050	$\alpha$ -felandreno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	22,917	$\alpha$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	23,475	p-cimeno	87	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
6	23,850	sabineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	25,933	$\gamma$ -terpineno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	26,600	trans sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	28,042	terpinoleno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	28,967	cis sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	30,383	p-menten-2-ol-1	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	31,542	trans-pineno hidratado	85	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	34,108	terpineol-4	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	34,892	$\alpha$ -terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	35,150	cis/trans-piperitol	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	35,833	cis/trans-piperitol	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	37,925	diacetin	95	176	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
17	38,417	acetato de linalila	96	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
18	39,600	hidroquinona	95	110	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
19	40,983	carvacrol	85	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
20	41,075	acetato de cis sabineno hidratado	87	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
21	52,383	espatulenol	92	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
22	52,608	óxido de cariofileno	95	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
23	58,642	fitol	91	296	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O

Os compostos, que foram tentativamente identificados, com os espectros de massa do equipamento, são os que estão presentes no óleo essencial de manjerona, obtido tanto por extração com solvente quanto por arraste a vapor. Pode-se destacar os compostos cis-sabineno hidratado e seu acetato, que segundo vários autores<sup>19,21,101</sup>, são os responsáveis pelo aroma da manjerona, bem como de seus álcoois monoterpênicos terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol. Esses compostos estão

presentes, em maior intensidade, no extrato de acetato de etila, estando associado, provavelmente à capacidade extratora desse solvente.

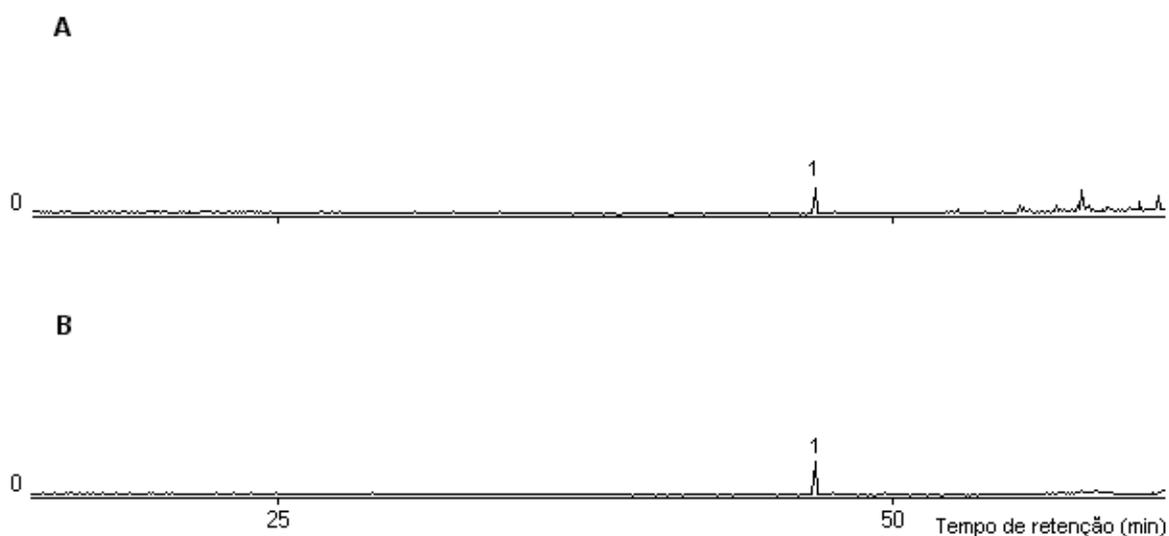
### 2.1.2. Extratos de Orégano

As **Figuras 30, 31 e 32** apresentam os cromatogramas das frações de hexano, acetato de etila e metanol (frações 1, 2 e 3 da CLP, respectivamente), dos extratos obtidos por maceração, usando como solventes extratores o hexano e o acetato de etila.

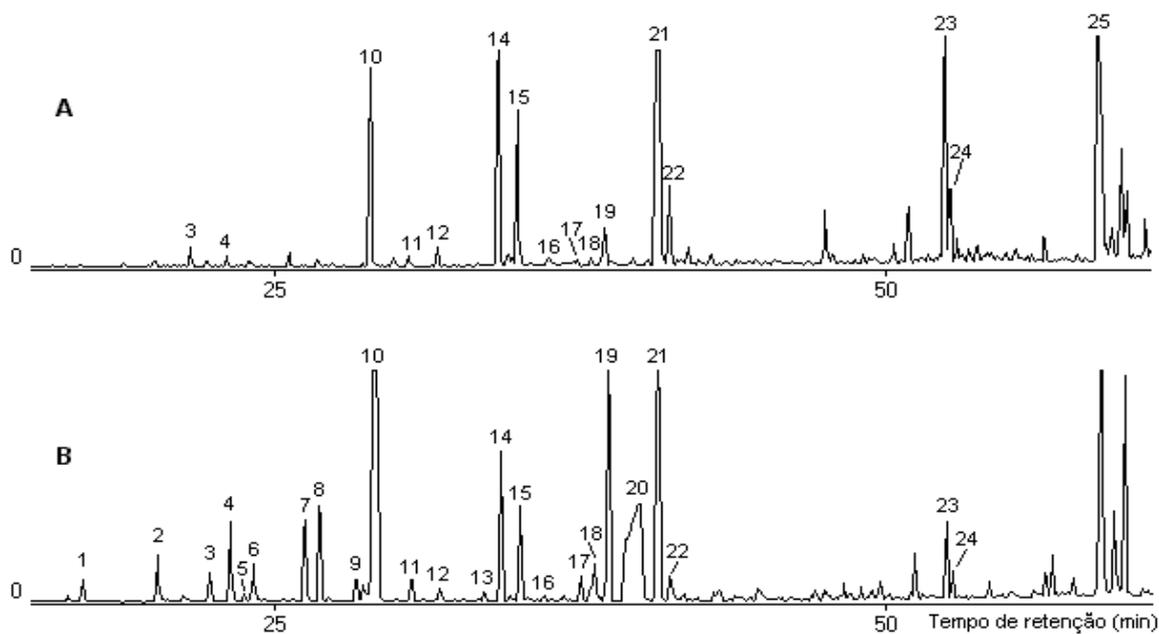
A **Tabela XXI** apresenta os principais compostos identificados, na fração acetato de etila, dos extratos de hexano e de acetato de etila, nas amostras de orégano comercial. As frações obtidas com hexano e metanol, como eluentes, não permitiram a identificação de um número maior de compostos, como pode ser visualizado nas **Figuras 30 e 32**.

Pelos cromatogramas da **Figura 30**, observa-se o mesmo fato ocorrido com a amostra de manjerona, ou seja, somente um pico foi identificado, tanto no extrato de hexano, quanto no extrato de acetato de etila, sendo este também o  $\beta$ -cariofileno.

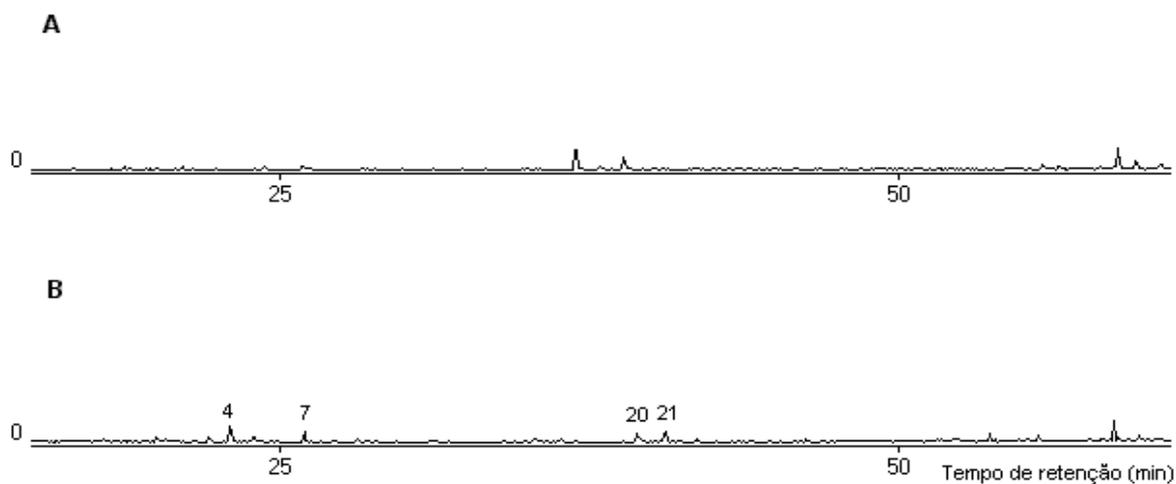
Da mesma forma, como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 31**, as frações de acetato de etila, das extrações por maceração com hexano e com acetato de etila permitiram a identificação dos principais componentes extraídos das amostras de orégano comercial. Os compostos identificados são os que estão presentes no óleo essencial de orégano. Pode-se destacar os compostos fenólicos, timol e carvacrol, característicos desse tipo de amostra, sendo o timol o composto majoritário. Também estão presentes o cis-sabineno hidratado, terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol em grandes quantidades. Comparando-se esses cromatogramas, constata-se que os compostos são os mesmos nos dois extratos, não se podendo diferenciar os solventes extratores, segundo a eficiência da extração.



**Figura 30** – Cromatogramas do íon total das frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de orégano comercial. O pico assinalado corresponde ao  $\beta$ -cariofileno. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XVII**.



**Figura 31** – Cromatogramas do íon total das frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de orégano comercial. Os picos identificados estão na **Tabela XXI**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XVII**.



**Figura 32** – Cromatogramas do íon total das frações de metanol (fração 3 da CLP) dos extratos obtidos por maceração com hexano (A) e acetato de etila (B), da amostra de orégano comercial. Os picos identificados estão na **Tabela XXI**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XVII**.

**Tabela XXI** – Principais compostos identificados tentativamente nos extratos da maceração com hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de orégano comercial.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Probabilidade %	PM	FM
1	16,908	$\alpha$ -pineno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	19,950	$\beta$ -pineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	22,050	$\alpha$ -felandreno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	22,917	$\alpha$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	23,475	p-cimeno	87	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
6	23,850	sabineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	25,933	$\gamma$ -terpineno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	26,600	trans sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	28,042	terpinoleno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	28,967	cis sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	30,383	p-menten-2-ol-1	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	31,542	trans-pineno hidratado	85	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	33,583	borneol	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	34,108	terpineol-4	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	34,892	$\alpha$ -terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	35,833	cis/trans-piperitol	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
17	37,567	éter metil timol	88	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
18	38,117	éter metil carvacrol	88	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
19	39,683	acetato de linalila	97	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
20	39,925	hidroquinona	95	110	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
21	40,725	timol	93	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
22	40,983	carvacrol	93	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
23	52,383	espatulenol	93	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
24	52,775	óxido de cariofileno	91	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
25	58,858	fitol	90	296	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O

## 2.2. SOXHLET

### 2.2.1. Extratos de Manjerona

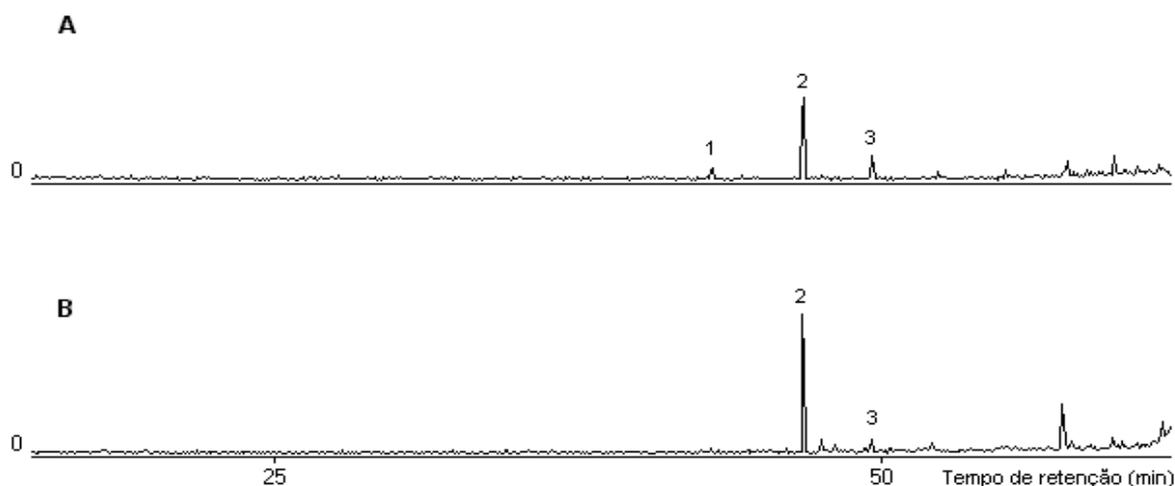
As **Figuras 33 e 34** apresentam os cromatogramas das frações de hexano e acetato de etila (frações 1e 2 da CLP, respectivamente), dos extratos obtidos da amostra de manjerona cultivada T2, com Soxhlet, usando como solventes extratores o hexano e o acetato de etila.

A **Tabela XXII** apresenta os principais compostos identificados, na fração acetato de etila, dos extratos de hexano e de acetato de etila, nas amostras de manjerona cultivada T2.

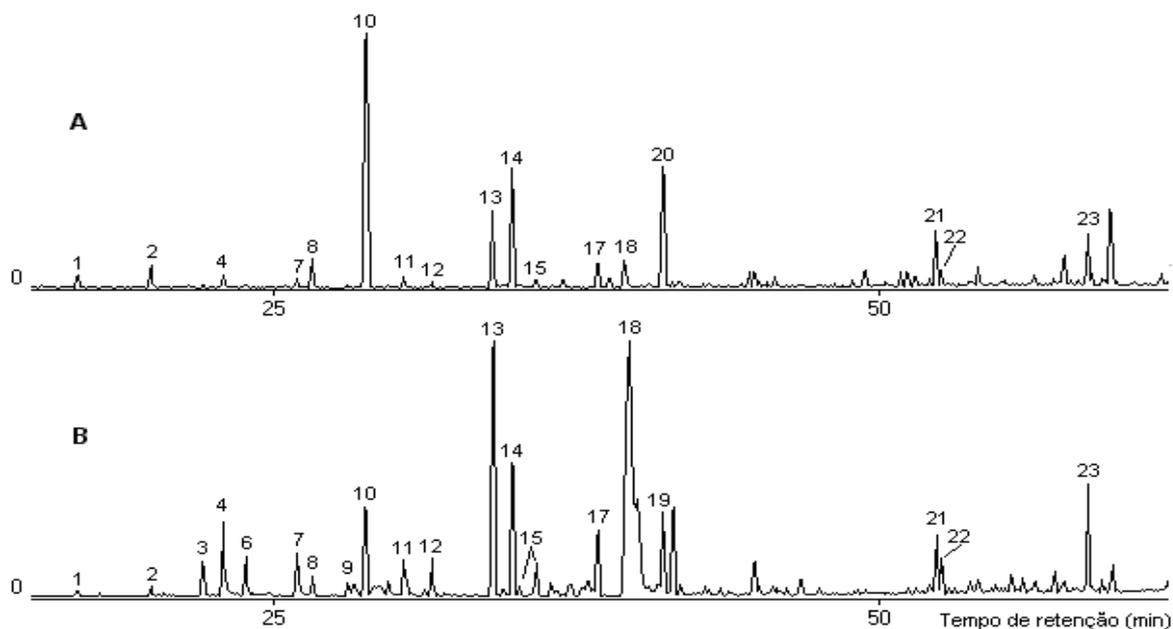
Pelos cromatogramas da **Figura 33** pode-se observar que a cromatografia líquida preparativa funcionou como um *clean-up* da amostra. Alguns picos foram possíveis detectar, tanto no extrato de hexano, quanto no extrato de acetato de etila. Com base nos espectros de massa da biblioteca Willey do equipamento, com ~95% de probabilidade, foram identificados o biciclogermacreno, o  $\beta$ -cariofileno e o  $\gamma$ -elemeno/ $\alpha$ -humuleno. Estes compostos não foram identificados nas outras frações dos outros extratos.

Entretanto, como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 34**, as frações de acetato de etila, das extrações com Soxhlet com hexano e com acetato de etila, foram eficientes na separação dos principais componentes extraídos das amostras de manjerona cultivada.

Os compostos que foram tentativamente identificados com os espectros de massa do equipamento, são os mesmos que estão presentes no óleo essencial de manjerona, com destaque para o cis-sabineno hidratado e seu acetato, bem como de seus álcoois monoterpênicos terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol.



**Figura 33** – Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de manjerona cultivada T2. Os picos assinalados foram tentativamente identificados como: 1) biciclogermacreno; 2)  $\beta$ -cariofileno e 3)  $\gamma$ -elemeno/ $\alpha$ -humuleno. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.



**Figura 34** – Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de manjerona cultivada T2. Os picos assinalados estão identificados **Tabela XXII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.

**Tabela XXII** – Principais compostos identificados tentativamente nos extratos com Soxhlet, de hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de manjerona cultivada T2.

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Probabilidade %	PM	FM
1	16,908	$\alpha$ -pineno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	19,950	$\beta$ -pineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	22,050	$\alpha$ -felandreno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	22,917	$\alpha$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	23,475	p-cimeno	87	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
6	23,850	sabineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	25,933	$\gamma$ -terpineno	97	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	26,600	trans sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	28,042	terpinoleno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	28,967	cis sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	30,383	p-menten-2-ol-1	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	31,542	trans-pineno hidratado	85	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	34,108	terpineol-4	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	34,892	$\alpha$ -terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	35,150	cis/trans-piperitol	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	35,833	cis/trans-piperitol	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	37,925	diacetin	95	176	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
17	38,417	acetato de linalila	96	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
18	39,600	hidroquinona	95	110	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
19	41,108	acetato de cis sabineno hidratado	85	196	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
20	41,125	carvacrol	87	150	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
21	52,383	espatulenol	92	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
22	52,608	óxido de cariofileno	95	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
23	58,642	fitol	91	296	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O

## 2.2.2. Extratos de Orégano

A **Tabela XXIII** apresenta os principais compostos identificados, na fração acetato de etila, dos extratos de hexano e de acetato de etila, nas amostras de orégano cultivado T4 e orégano comercial.

### 2.2.2.1. Extratos de Orégano Cultivado

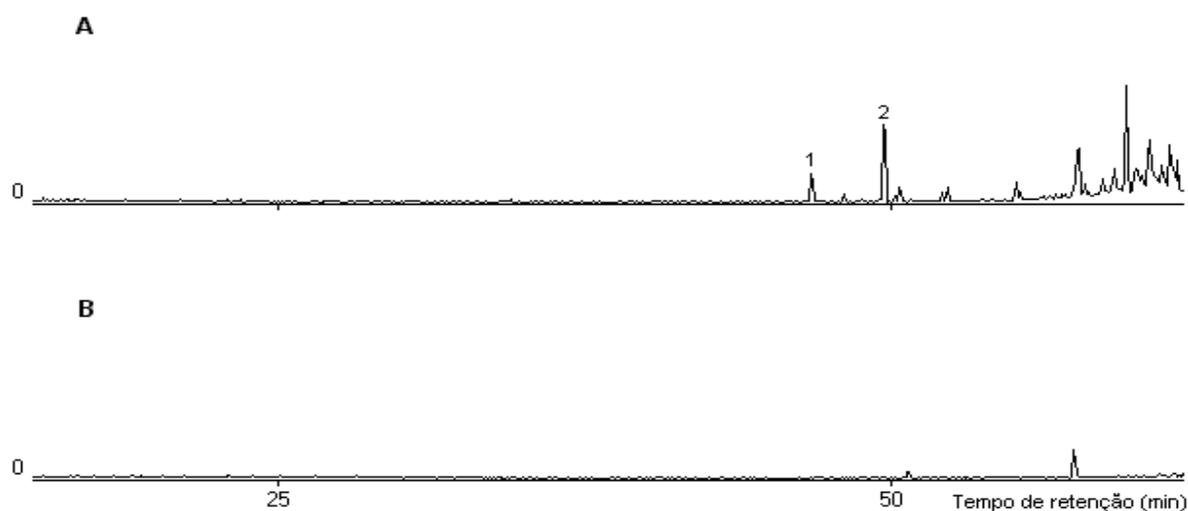
As **Figuras 35 e 36** apresentam os cromatogramas das frações de hexano e acetato de etila (frações 1 e 2 da CLP, respectivamente), dos extratos obtidos da amostra de orégano cultivado T4, com Soxhlet, usando como solventes extratores o hexano e o acetato de etila.

Cabem as mesmas observações feitas para análise anteriores, ou seja, nenhum composto foi identificado na fração de metanol (fração 3 da CLP), razão pela qual a mesma não é apresentada.

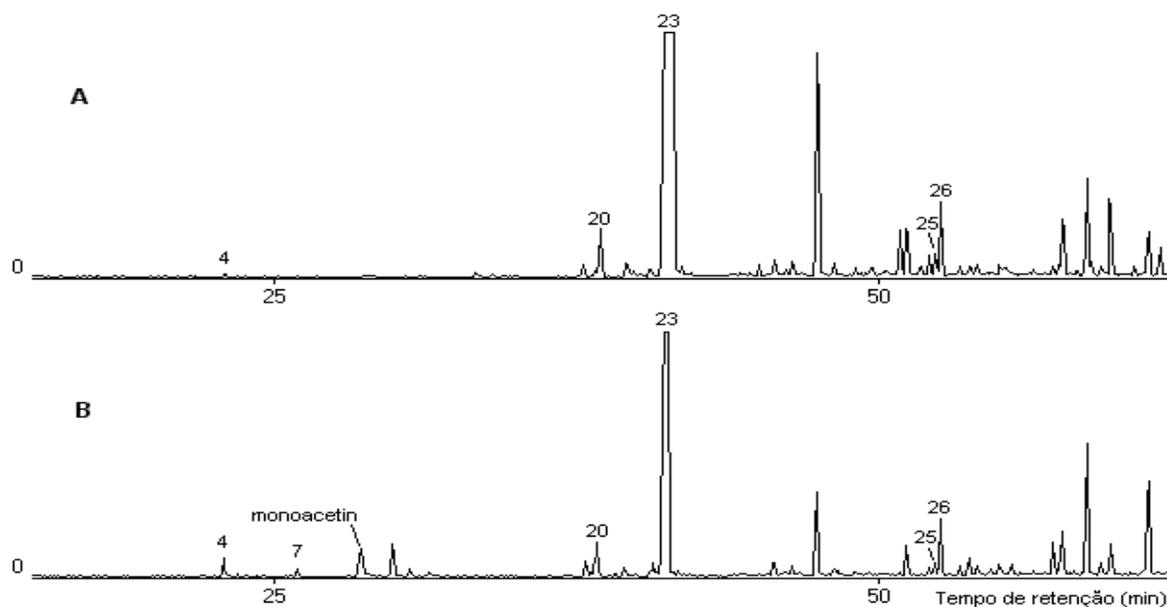
Por outro lado, apenas o  $\beta$ -cariofileno e o  $\beta$ -bisaboleno foram identificados na fração de hexano (**Figura 35**).

A **Figura 36**, também apresenta os mesmos compostos identificados no óleo essencial de orégano. Pode-se destacar os compostos fenólicos, timol e carvacrol, característicos desse tipo de amostra, sendo o carvacrol o composto majoritário.

Comparando-se esses cromatogramas e a identificação dos picos na **Tabela XXIII**, constata-se que os compostos são os mesmos nos dois extratos, não se podendo definir qual o solvente mais potente na extração.



**Figura 35** – Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano cultivado T4. Os picos assinalados foram tentativamente identificados como: 1)  $\beta$ -cariofileno e 2)  $\beta$ -bisaboleno. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.



**Figura 36** – Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano cultivado T4. Os picos assinalados estão identificados **Tabela XXIII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.

**Tabela XXIII** – Principais compostos identificados tentativamente nos extratos com Soxhlet, de hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de orégano cultivado T4 e comercial.

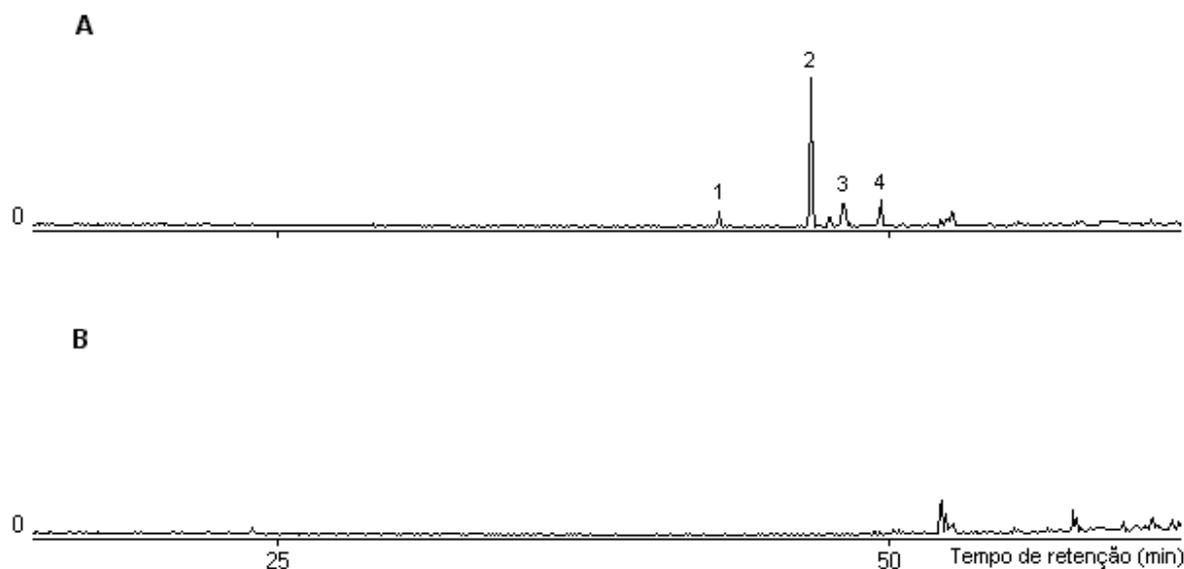
Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Probabilidade %	PM	FM
1	17,050	$\alpha$ -pineno	93	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	20,108	$\beta$ -pineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	22,225	$\alpha$ -felandreno	95	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	23,083	$\alpha$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	23,667	p-cimeno	92	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
6	24,033	sabineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	26,108	$\gamma$ -terpineno	94	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	26,775	trans sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	28,217	terpinoleno	90	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
10	28,892	linalol	93	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	29,117	cis sabineno hidratado	92	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	30,542	p-menten-2-ol-1	88	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	31,708	trans-pineno hidratado	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	34,242	terpineol-4	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	34,608	p-cimen-8-ol	87	150	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	35,025	$\alpha$ -terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
17	35,392	cis/trans-piperitol	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
17	36,142	cis/trans-piperitol	89	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
18	37,917	éter metil timol	93	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
19	38,017	éter metil carvacrol	93	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
20	38,575	acetato de linalila	97	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
21	39,775	cumarina	93	146	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
22	40,725	timol	91	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
23	41,250	carvacrol	94	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
24	41,783	ascaridol	87	168	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
25	52,475	espatulenol	94	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
26	52,675	óxido de cariofileno	90	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
27	58,725	fitol	90	220	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O

### 2.2.1.2. Extratos de Orégano Comercial

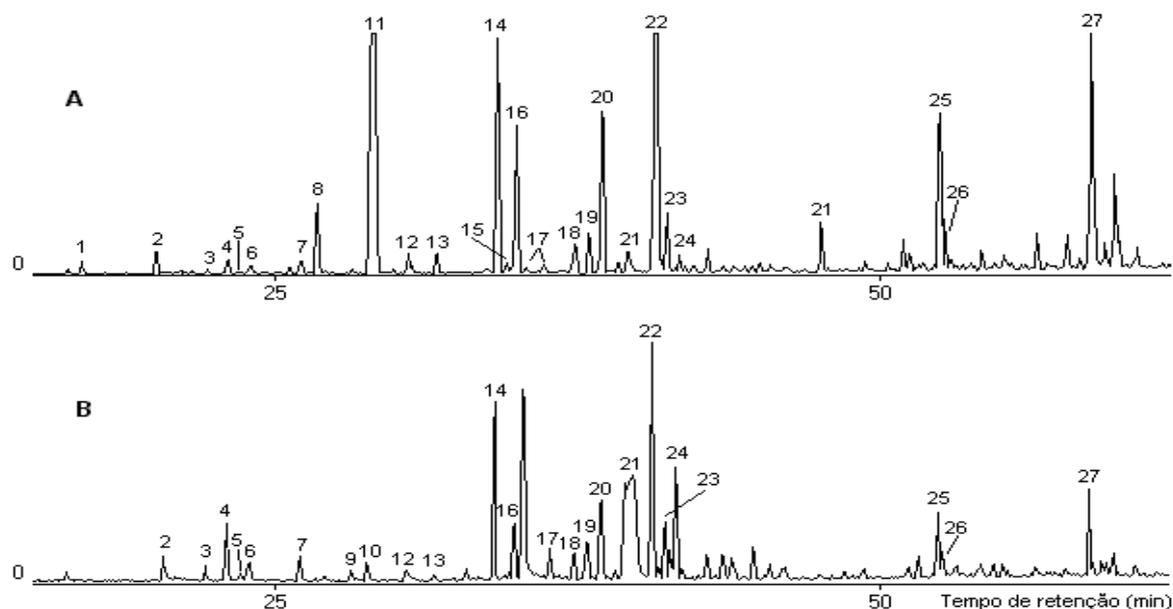
As **Figuras 37 e 38** apresentam os cromatogramas das frações de hexano e acetato de etila (frações 1 e 2 da CLP, respectivamente), dos extratos obtidos da amostra de orégano comercial, com Soxhlet, usando como solventes extratores o hexano e o acetato de etila.

De forma similar ao encontrado anteriormente, poucos compostos foram identificados nas frações de hexano e, nenhum composto foi identificado na fração de metanol.

Os compostos identificados na fração de acetato de etila são os mesmos presentes no óleo essencial de orégano, com os mesmos destaques, entretanto, sendo o timol o composto majoritário. Nada se podendo afirmar quanto a diferença de eficiência do poder extrator dos solventes.



**Figura 37** – Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial. Os picos assinalados estão identificados **Tabela XXIII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.



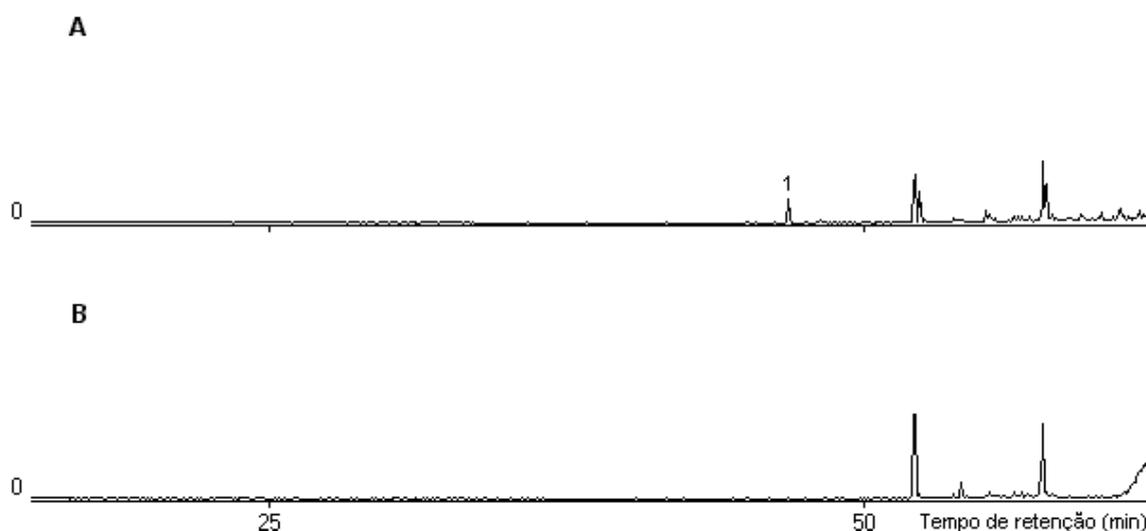
**Figura 38** – Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com Soxhlet, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial. Os picos assinalados estão identificados **Tabela XXIII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.

## 2.3. ULTRA-SOM

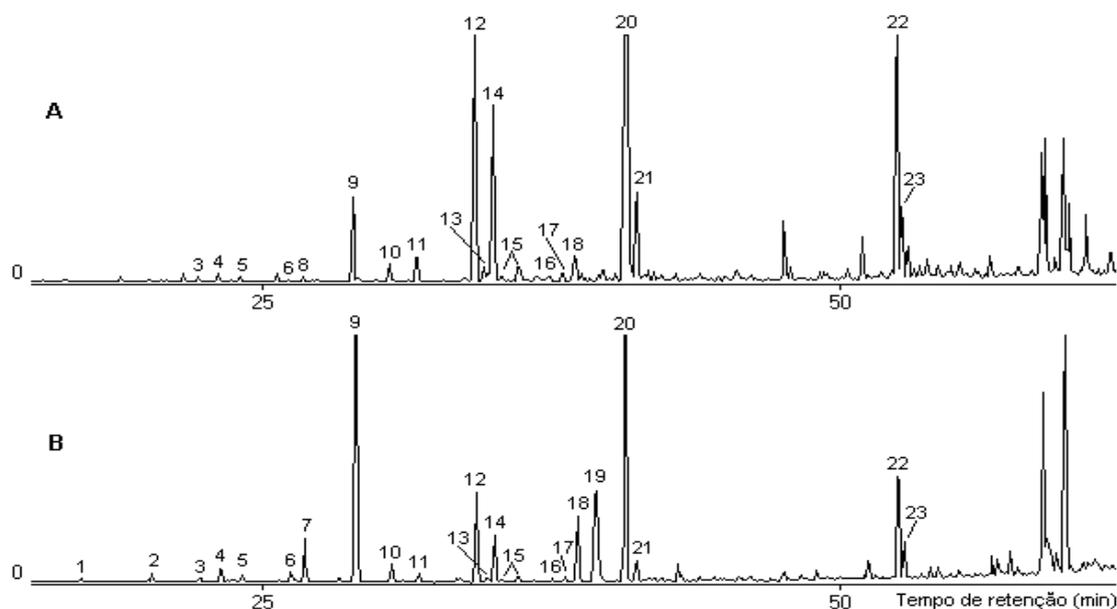
### 2.3.1. Extrato de Orégano Comercial

As **Figuras 39 e 40** apresentam os cromatogramas das frações de hexano e acetato de etila (frações 1 e 2 da CLP, respectivamente), dos extratos obtidos da amostra de orégano comercial, com ultra-som, usando como solventes extratores o hexano e o acetato de etila.

A **Tabela XXIV** apresenta os principais compostos identificados, na fração acetato de etila. A **Figura 39**, de forma semelhante às análises anteriores, apresenta apenas o  $\beta$ -cariofileno, como único pico identificado. Na **Figura 40** tem-se a identificação dos mesmos compostos encontrados no óleo essencial de orégano. Pode-se destacar os compostos fenólicos, timol e carvacrol, característicos desse tipo de amostra, sendo o timol o composto majoritário<sup>55</sup>. Também nada se pode afirmar quanto à seletividade dos solventes extratores utilizados.



**Figura 39** – Cromatogramas do íon total para as frações de hexano (fração 1 da CLP) dos extratos obtidos com ultra-som, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial. O pico tentativamente identificado é: 1)  $\beta$ -cariofileno. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.



**Figura 40** – Cromatogramas do íon total para as frações de acetato de etila (fração 2 da CLP) dos extratos obtidos com ultra-som, usando hexano (A) e acetato de etila (B), como solventes extratores da amostra de orégano comercial. Os picos assinalados estão identificados **Tabela XXIV**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XVII**.

**Tabela XXIV** – Principais compostos identificados tentativamente nos extratos do ultra-som, com hexano e acetato de etila, nas frações com acetato de etila, das amostras de orégano comercial

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Probabilidade %	PM	FM
1	17,150	$\alpha$ -pineno	85	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	20,242	$\beta$ -pineno	88	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	22,223	$\alpha$ -felandreno	83	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	23,092	$\alpha$ -terpineno	90	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	24,042	sabineno	90	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	26,242	$\gamma$ -terpineno	91	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
7	26,858	trans sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
8	26,775	linalol	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	28,958	cis sabineno hidratado	90	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
10	30,533	p-menten-2-ol-1	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	31,708	trans-pineno hidratado	85	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	34,225	terpineol-4	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	34,608	p-cimen-8-ol	89	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
14	35,017	$\alpha$ -terpineol	97	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	35,408	cis/trans-piperitol	85	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	36,125	cis/trans-piperitol	87	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
16	37,467	éter metil timol	80	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
17	38,017	éter metil carvacrol	80	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
18	38,692	acetato de linalila	96	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
19	39,450	hidroquinona	95	110	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
20	40,472	timol	94	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
21	41,233	carvacrol	90	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
22	52,567	espatulenol	91	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
23	52,800	óxido de cariofileno	90	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O

**CAPÍTULO 7:  
APLICAÇÃO DO CO<sub>2</sub> A ALTAS  
PRESSÕES NA EXTRAÇÃO DE  
COMPOSTOS ORGÂNICOS DE  
MANJERONA E ORÉGANO**

---

---

## EXPERIMENTAL

### 1. AMOSTRAS

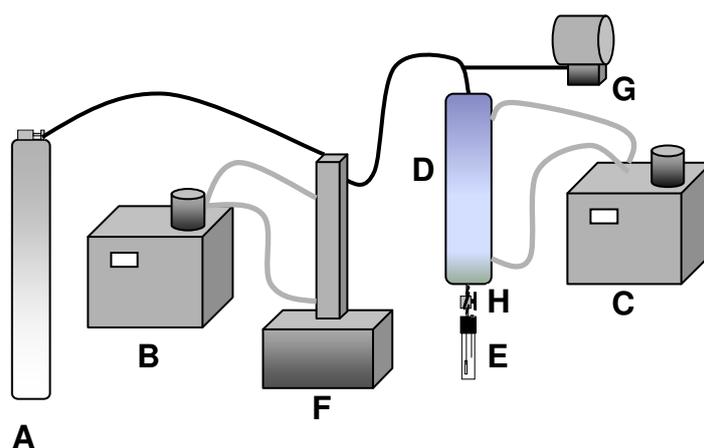
Sementes de *Origanum vulgare* Linneus e de *Majorana hortensis* Moench, adquiridas da Dinamarca, foram cultivadas sob controle agrônômico em Viamão, RS, na Estação Experimental da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agrônômica), sob a orientação do Sr Luis Osório de Castro, técnico da FEPAGRO. As amostras foram identificadas e as exsiccatas estão depositadas no Herbário da FEPAGRO (ver Capítulo 4). As folhas e flores de orégano e de manjerona foram secas à temperatura ambiente por três semanas. As amostras de orégano comercial foram adquiridas da CBS Alimentos Ltda, Canoas/RS e as de manjerona, da Litte – Indústria e Comércio de Alimentos Ltda – Porto Alegre/RS.

### 2. REAGENTES E SOLVENTES

O CO<sub>2</sub> (White Martins) usado foi de grau UP com 99,99% pureza. Os padrões,  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, linalol, terpineol-4,  $\alpha$ -terpineol, carvacrol, timol e bifenila foram adquiridos da Aldrich, Palo Alto, CA, EUA. Foram preparadas soluções estoques de cada padrão (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em diclorometano e guardadas sob refrigeração. Os solventes utilizados foram grau p.a. Merck bidestilados.

### 3. EQUIPAMENTO

As extrações foram realizadas em uma unidade de escala de laboratório (**Figura 41 e Anexo 2**), que consistia basicamente de um cilindro de CO<sub>2</sub>, dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 260D), um reator em aço inoxidável (200 mL), um transdutor (SMAR, LD301), equipado com um sistema para aquisição de dados (SMAR, HT 201) com uma precisão de  $\pm 0,012$  MPa e um tubo coletor de vidro.



**Figura 41** – - Esquema representativo de um sistema de extração a altas pressões. (A) – cilindro de CO<sub>2</sub>; (B) e (C) – banhos termostáticos; (D) - extrator ; (E) – tubo coletor de vidro; (F) – bomba de alta pressão; (G) – transdutor de pressão; (H) – sistema de aquecimento.

#### 4. EXTRAÇÃO COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO

As amostras eram colocadas no extrator e em seguida faz-se passar o CO<sub>2</sub>, deixando em contato com a amostra por 1 h para que houvesse estabilização do sistema. Após, a válvula micrométrica era aberta, o óleo produzido começava a ser coletado e o fluxo de CO<sub>2</sub> era acompanhado através do registrador da bomba de alta pressão. O óleo coletado era pesado em intervalos de tempo definidos (~15 a 20 min), um outro tubo conectado ao equipamento e a extração continuava até que não mais se obtivesse quantidade significativa de extrato ou, em alguns casos, quando não excedia um tempo pré-determinado. O tempo de extração em cada experimento foi de aproximadamente 400 min, isotermicamente, à pressão constante. Cada experimento consome em média 10 h, incluindo pesagem da amostra, carga do extrator, estabilização da temperatura do extrator e dos banhos, extração, depressurização e descarga do extrator.

Um planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> foi estabelecido para avaliar a influência das variáveis do processo no rendimento e na composição química do extrato. As extrações foram realizadas nas temperaturas de 20 – 40 °C e pressões

de 100 a 200 atm. As corridas foram realizadas em triplicata para todas as condições.

## 5. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Os extratos obtidos na extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões, das amostras de manjerona e de orégano, foram analisadas por CG/EM, conforme condições analíticas descritas na **Tabela XXV**. A identificação e quantificação de alguns compostos foram feitas com base na injeção de padrões e da bifenila como padrão interno, através da comparação dos espectros de massas e do tempo de retenção de cada padrão. Os demais compostos foram identificados tentativamente por comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley do equipamento. Foram preparadas soluções de cada extrato a 500 µg mL<sup>-1</sup> em diclorometano, sendo injetado 1 µL de cada solução.

**Tabela XXV** – Condições cromatográficas utilizadas na análise dos óleos extraídos com CO<sub>2</sub> a altas pressões por CG/EM

equipamento	CG/EM - Shimadzu QP5050A
coluna	DB – 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
impacto eletrônico	70 eV
modo de injeção	split 1:30
gás de arraste; vazão	He; 1,5 mL min <sup>-1</sup>
programação de temperatura	50 °C (0 min) – 2 °C min <sup>-1</sup> – 100 °C – 3 °C min <sup>-1</sup> – 145 °C – 5 °C min <sup>-1</sup> – 280 °C (25 min)
temperatura do injetor	280 °C
temperatura da coluna	280 °C

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS

A etapa inicial da extração dos óleos de manjerona e de orégano consistiu em avaliar o efeito da pressão e da temperatura sobre a extração dos compostos terpênicos, que são responsáveis pelo aroma, e avaliar a co-extração dos compostos indesejáveis (ácidos graxos e seus ésteres metílicos e alguns pigmentos).

#### 1.1. EXTRAÇÃO DO ORÉGANO

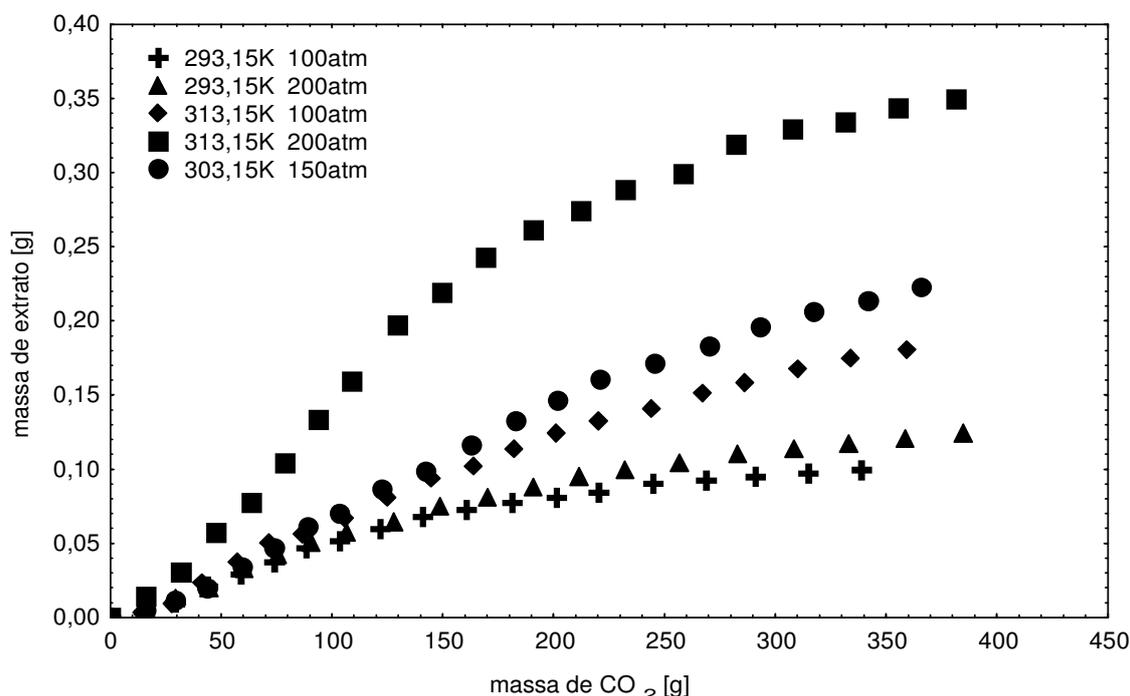
A **Tabela XXVI** sumariza as condições de extração e os resultados alcançados no tocante ao rendimento das extrações. As variáveis vazão do solvente e massa de orégano foram mantidas constantes em torno de  $1 \text{ g min}^{-1}$  e 26 g, respectivamente. Os rendimentos foram calculados com base na porcentagem do óleo extraído em relação à massa da amostra colocada no extrator. Observou-se uma grande variação na densidade do solvente (0,6164 a  $0,9378 \text{ g cm}^{-3}$ ), calculada com base em dados fornecidos por Angus e colaboradores<sup>158</sup>.

**Tabela XXVI** - Condições experimentais e rendimentos obtidos nas extrações de orégano comercial com  $\text{CO}_2$  a altas pressões.

Corrida	T (°C)	P (atm)	Densidade $\text{CO}_2$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )	Rendimento (%)
1	20	100	0,8553	0,38
2	20	200	0,9378	0,46
3	40	100	0,6164	0,67
4	40	200	0,8408	1,32
5	30	150	0,8475	0,82

Outro fator observado é que o rendimento do extrato de orégano foi sensível à variação da temperatura e pressão. O aumento da temperatura à pressão constante leva a um aumento no rendimento do óleo, apesar da grande variação na densidade. Embora, em menor extensão, um aumento na pressão à temperatura constante leva a um aumento no rendimento do óleo<sup>115</sup>. A amostra de orégano comercial analisada a 200 atm e 40 °C foi a que apresentou maior rendimento, cerca de 1,32%.

A **Figura 42** apresenta curvas experimentais de extração calculadas através da variação da massa total do extrato de orégano versus as massas de CO<sub>2</sub> utilizada.



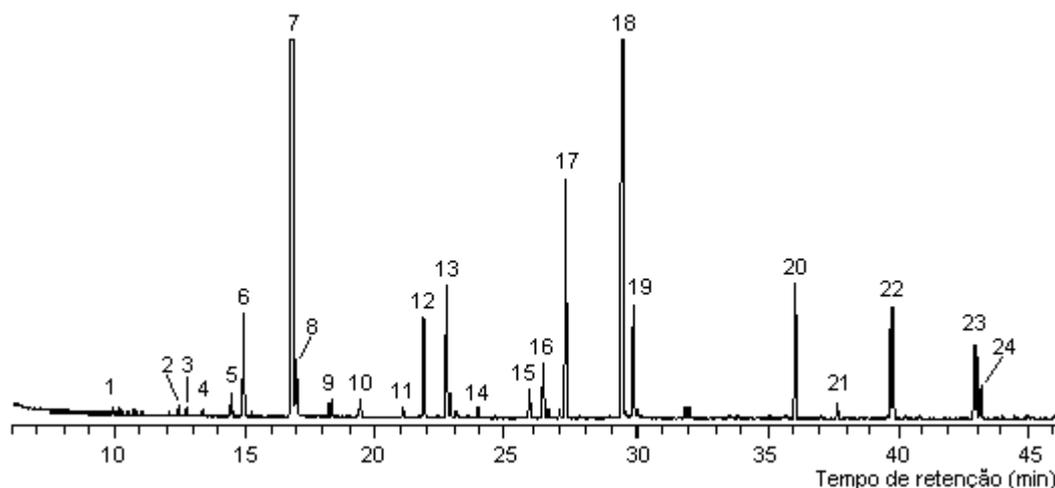
**Figura 42** – Curvas de extração obtidas para orégano comercial usando CO<sub>2</sub> a altas pressões (condições descritas na **Tabela XXVI**).

Como pode ser observado nesta **Figura**, as curvas de extração são formadas por uma etapa linear inicial (taxa constante de extração) onde a solubilidade do óleo no solvente (função somente da temperatura e da pressão) governa a extração. Nesta etapa, o óleo está completamente exposto e as partículas sólidas estão cobertas por uma camada deste.

Nesta etapa, o solvente deixa o extrator saturado de óleo e a concentração do óleo no solvente, na saída do extrator, é igual a sua solubilidade no solvente. Numa segunda etapa, a taxa de extração decresce em função da resistência à difusão no interior das folhas. Neste período a superfície do sólido começa a apresentar falhas na camada superficial de óleo e a área efetiva de troca diminui consideravelmente. Assim, a transferência de massa é controlada pela difusão do solvente para o interior das partículas do sólido e a difusão do solvente-soluto para fora da matriz porosa<sup>115</sup>.

### 1.1.1. Análise Cromatográfica dos Extratos de Orégano

A **Figura 43** apresenta um cromatograma do extrato de orégano comercial obtido nas condições de extração de 100 atm e 40 °C cujos picos identificados, são apresentados na **Tabela XXVII**. Através da análise do cromatograma, com base nas áreas relativas (sem considerar o fator de resposta), observa-se que o cis-trans-sabineno hidratado é o composto majoritário e, dentro dos compostos fenólicos, o timol é o majoritário.



**Figura 43** - Cromatograma do íon total do extrato de orégano comercial obtido via extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, a 100 atm e 40 °C. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XXVII**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XXV**.

**Tabela XXVII** – Compostos tentativamente identificados via CG/EM nos extratos de orégano comercial obtidos com CO<sub>2</sub> a altas pressões

Pico nº	Composto	PM	FM
1	β-pineno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	p-cimeno	134	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
3	limoneno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	canfeno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	γ-terpineno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	trans-sabineno hidratado	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
7	cis-sabineno hidratado	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
8	linalol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	p-menten-2-ol-1	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
10	trans-pineno hidratado	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	borneol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	terpineol-4	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	α-terpineol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	cis/trans-piperitol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
15	éter metil timol	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
16	éter metil carvacrol	164	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O
17	acetato de linalila	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
18	timol	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
19	carvacrol	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
20	β-cariofileno	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
21	α-cariofileno	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
22	germacreno-B/γ-humuleno	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
23	espatulenol	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
24	óxido de cariofileno	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O

Alguns trabalhos recentes<sup>81-87</sup>, tem se preocupado em identificar os constituintes do óleo essencial de orégano, obtido via extração com fluido supercrítico. Os resultados desses trabalhos indicam que este óleo essencial é uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos terpênicos, terpenos oxigenados e compostos aromáticos. Em geral, todos esses estudos esclarecem que nas

condições de extração estudadas, os terpenos oxigenados são a fração maior e, sendo o carvacrol (considerado terpeno fenólico) o composto majoritário.

No presente estudo, os extratos obtidos da extração com CO<sub>2</sub> do orégano comercial, analisados via CG/EM, apresentaram, em geral, em sua composição 5 monoterpenos, 10 álcoois terpênicos, 2 fenóis, 3 sesquiterpenos e 4 outros compostos oxigenados, representando 20,83% de MT (monoterpeno) e 79,17% de NMT (não monoterpeno), de acordo com a **Tabela XXVII**.

Observando o cromatograma da **Figura 43**, a contribuição em massa dos MT é muito pequena, quase desprezível (traços). Este resultado está de acordo com a idéia de obter extratos com pouco ou nenhuma concentração desta fração de hidrocarbonetos terpênicos, pois eles trazem pouca contribuição ao aroma dos óleos essenciais. Como essa fração é formada por compostos insaturados, que são instáveis ao calor e à luz, são rapidamente oxidados pelo oxigênio atmosférico, conseqüentemente, decompõem-se em compostos indesejáveis<sup>159</sup>.

A análise quantitativa desses extratos, usando como padrões o timol e o carvacrol e a bifenila como padrão interno, permitiu calcular a concentração desses compostos. A **Tabela XXVIII** apresenta as concentrações dos compostos majoritários, do orégano, carvacrol e timol, calculadas usando como padrão interno a bifenila.

**Tabela XXVIII** - Concentração de timol e carvacrol (mg L<sup>-1</sup>) nos extratos de orégano comercial, obtidos via extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões

Compostos	Condições de extração				
	100 atm, 20°C	200 atm, 20°C	100 atm, 40°C	200 atm, 40°C	150 atm, 30°C
Timol	25,32	25,75	46,13	25,82	36,82
Carvacrol	2,88	2,73	4,61	2,45	3,31

Observou-se que na condição de 100 atm e 40 °C, foi obtido a maior concentração de timol (~46 mg L<sup>-1</sup>), para as amostras comerciais. Também se observa, que apesar do extrato obtido a 200 atm e 40 °C ter apresentado o maior rendimento em massa, foi o que apresentou a menor concentração de timol, embora este composto esteja sempre em maiores concentrações que seu isômero carvacrol.

Tal fato está de acordo com dados da literatura, que pressões entre 80 e 100 atm e temperaturas próximas a 40°C são as requeridas para extrair os compostos responsáveis pelo aroma de óleos essenciais<sup>25</sup>.

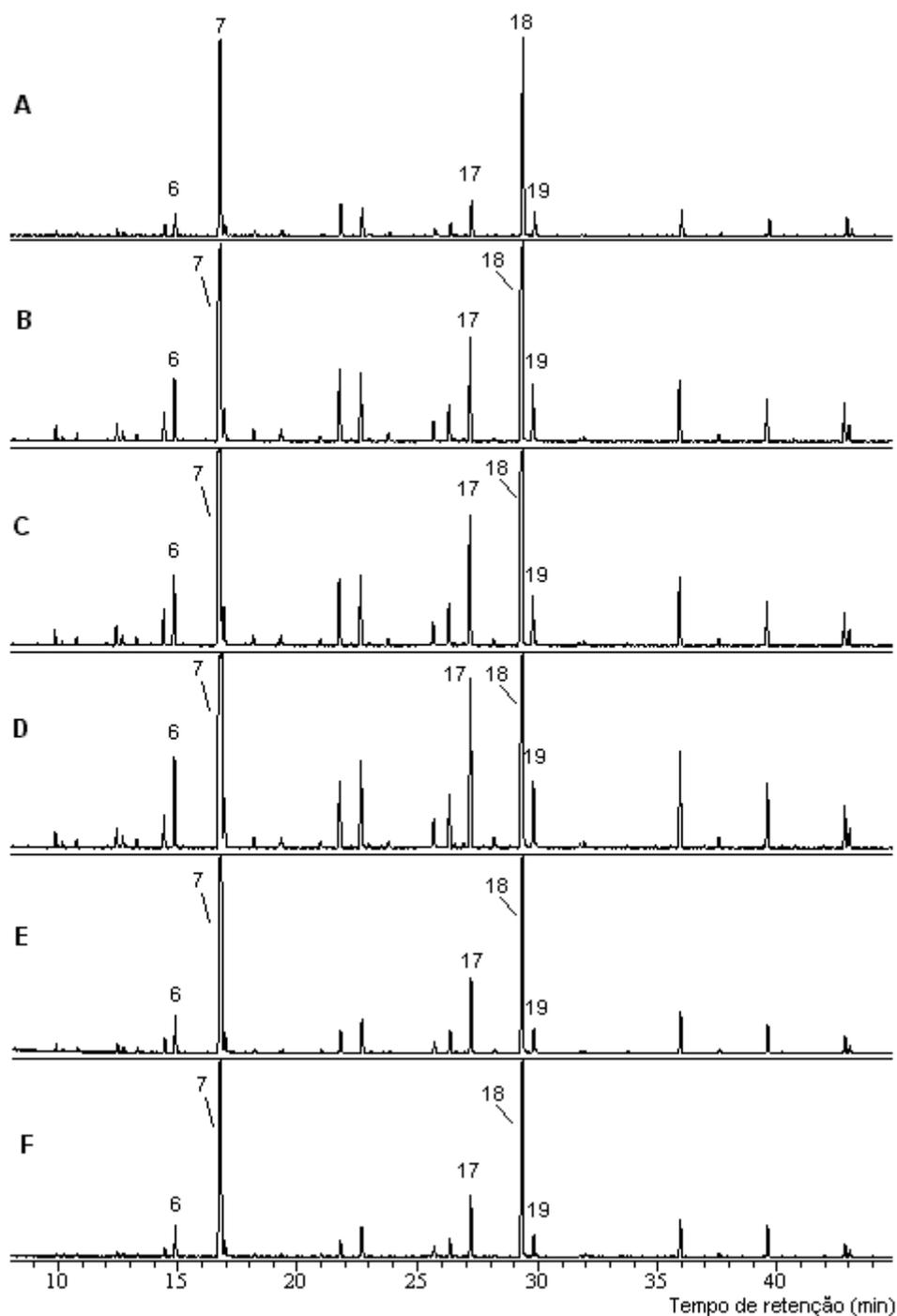
A amostra de orégano cultivada sob controle agrônômico e uma amostra comercial foram submetidas à extração com CO<sub>2</sub> nas condições de 150 atm e 30 °C e os extratos foram coletados de 50 em 50 min, num total de 6 h, aproximadamente.

As **Figuras 44 e 45** apresentam os cromatogramas obtidos. Os resultados obtidos em termos de rendimento foram de 0,53% e 0,86% respectivamente. Cada extrato foi analisado via CG/EM, nas mesmas condições anteriormente descritas. Através da análise cromatográfica desses extratos, observou-se que o extrato obtido da amostra cultivada apresentou maior concentração de carvacrol (~33 mg L<sup>-1</sup>) do que timol (~3,5 mg L<sup>-1</sup>), enquanto que na amostra comercial, a concentração do carvacrol foi de ~3,3 mg L<sup>-1</sup> e a de timol, ~37mg L<sup>-1</sup>.

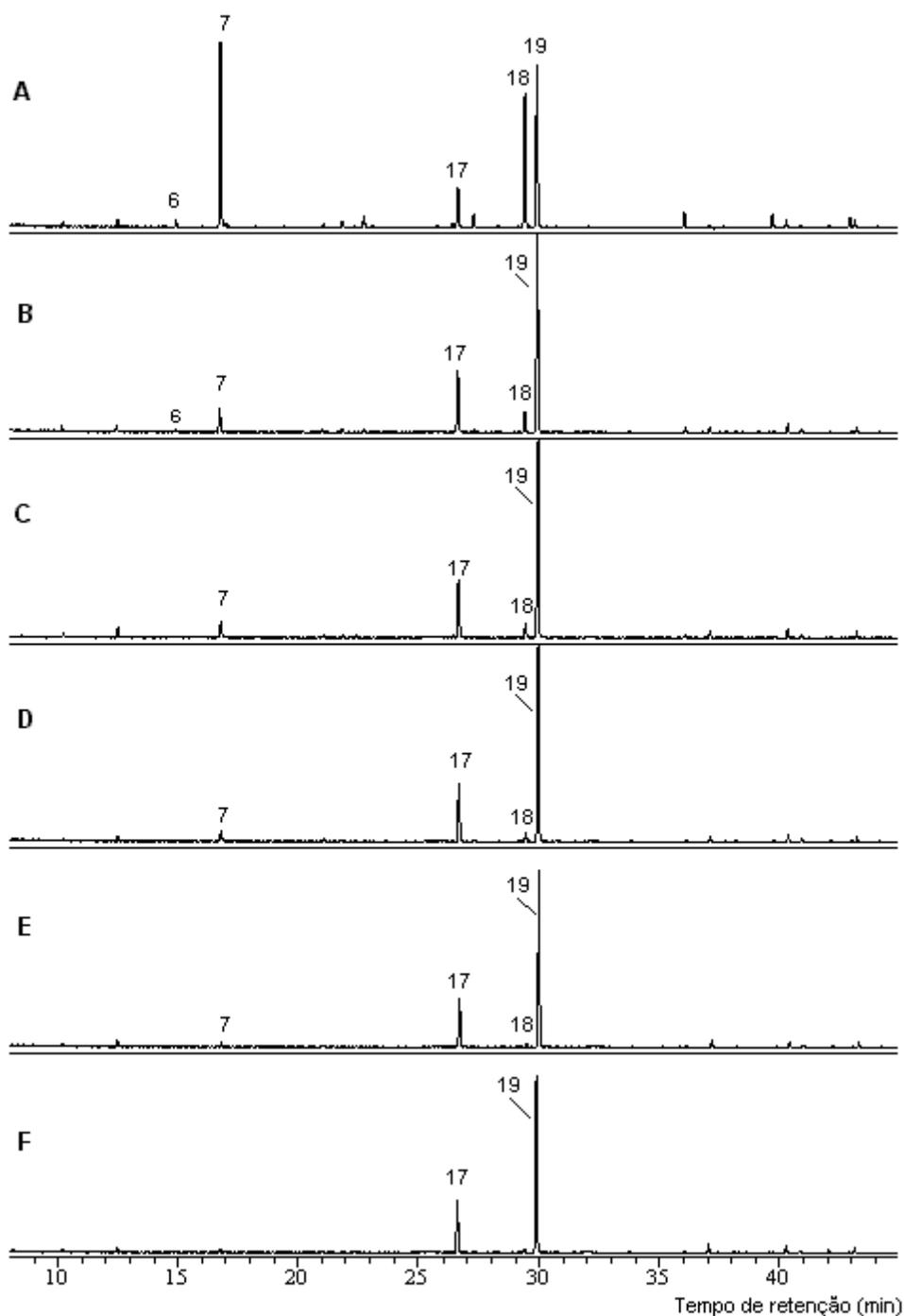
A **Figura 46** apresenta um gráfico das áreas normalizadas dos picos cromatográficos de alguns componentes. Na amostra comercial, pode-se observar que o timol é o composto fenólico majoritário, enquanto que o cis-sabineno hidratado é o componente majoritário na análise total. Observa-se um aumento crescente em área de todos os compostos até 200 min, após este tempo, há um decréscimo, porém este efeito é praticamente desprezível.

Ao contrário, na amostra cultivada (**Figura 47**), o carvacrol é o composto fenólico majoritário, o que comprova a origem dessa planta como *Origanum vulgare*. Somente nos 50 min iniciais a área do cis-sabineno hidratado é maior que a do carvacrol, mas passado esse tempo, tanto cis-sabineno hidratado quanto timol são pouco perceptíveis.

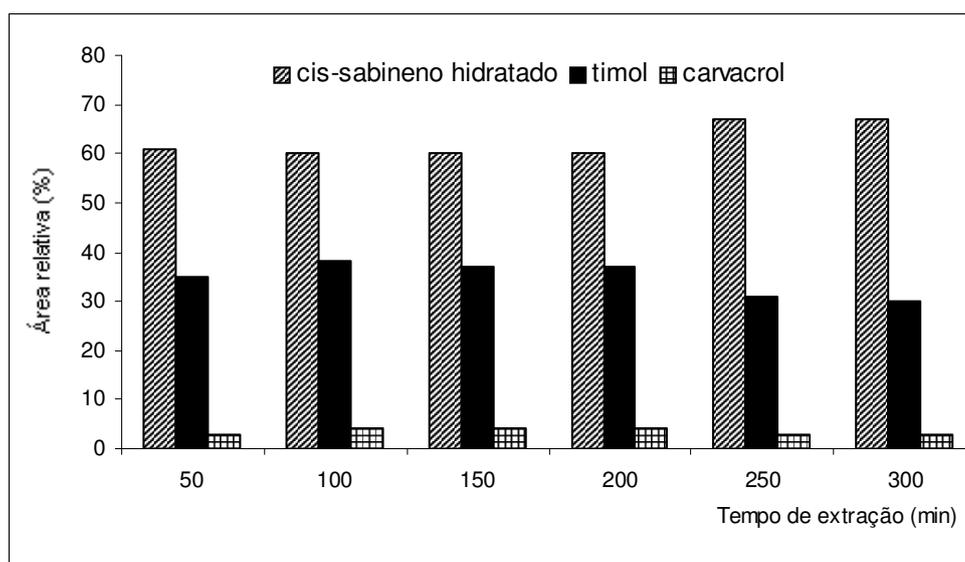
Dados da literatura demonstram que há 39 espécies<sup>43</sup> que são usadas no mundo inteiro como condimento ou medicinal, chamadas orégano. Então, para se classificar um orégano tem-se que fazer a avaliação em função de seus compostos fenólicos (carvacrol e timol). Poucos autores encontraram orégano com quantidades significativas de timol<sup>73,86</sup>.



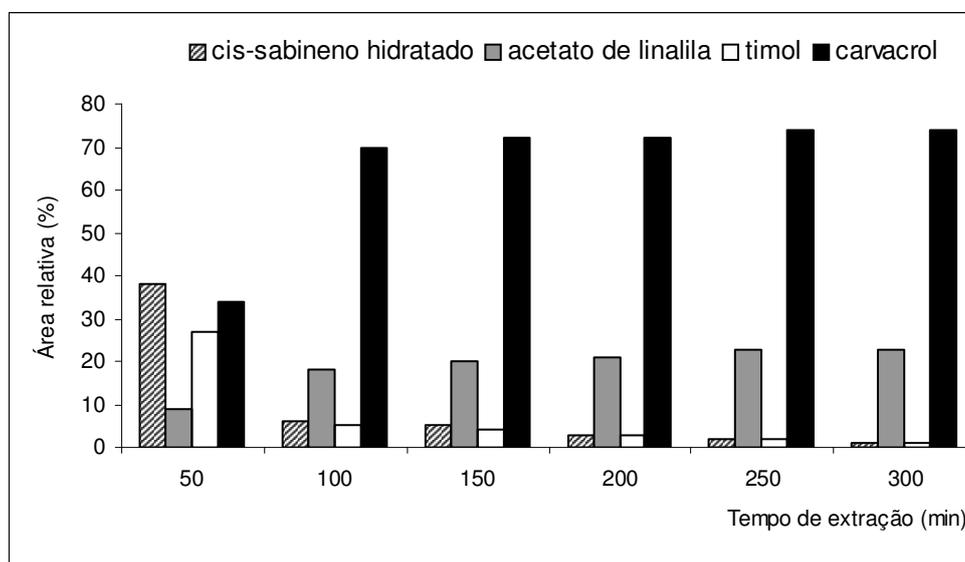
**Figura 44** – Cromatogramas do íon total para os extratos de orégano comercial, obtidos a 150 atm e 30 °C. **(A)** 50 min; **(B)** 100 min; **(C)** 150 min; **(D)** 200 min; **(E)** 250 min; **(F)** 300 min. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XXVII**. Condições cromatográficas conforme a **Tabela XXV**.



**Figura 45** – Cromatogramas do Íon total para os extratos de *Origanum vulgare* obtidos a 150 atm e 30 °C. **(A)** 50 min; **(B)** 100 min; **(C)** 150 min; **(D)** 200 min; **(E)** 250 min; **(F)** 300 min. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XXVII**. Condições cromatográficas conforme a **Tabela XXV**.



**Figura 46** – Gráfico da variação das áreas relativas com o tempo de extração, para os compostos cis-sabineno hidratado, timol e carvacrol, presentes nos extratos de orégano comercial, obtidos na extração com CO<sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C.



**Figura 47** – Gráfico da variação das áreas relativas com o tempo de extração, para os compostos cis-sabineno hidratado, acetato de linalila, timol e carvacrol, presentes nos extratos de *Origanum vulgare*, obtidos na extração com CO<sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C.

## 1.2. EXTRAÇÃO DA MANJERONA

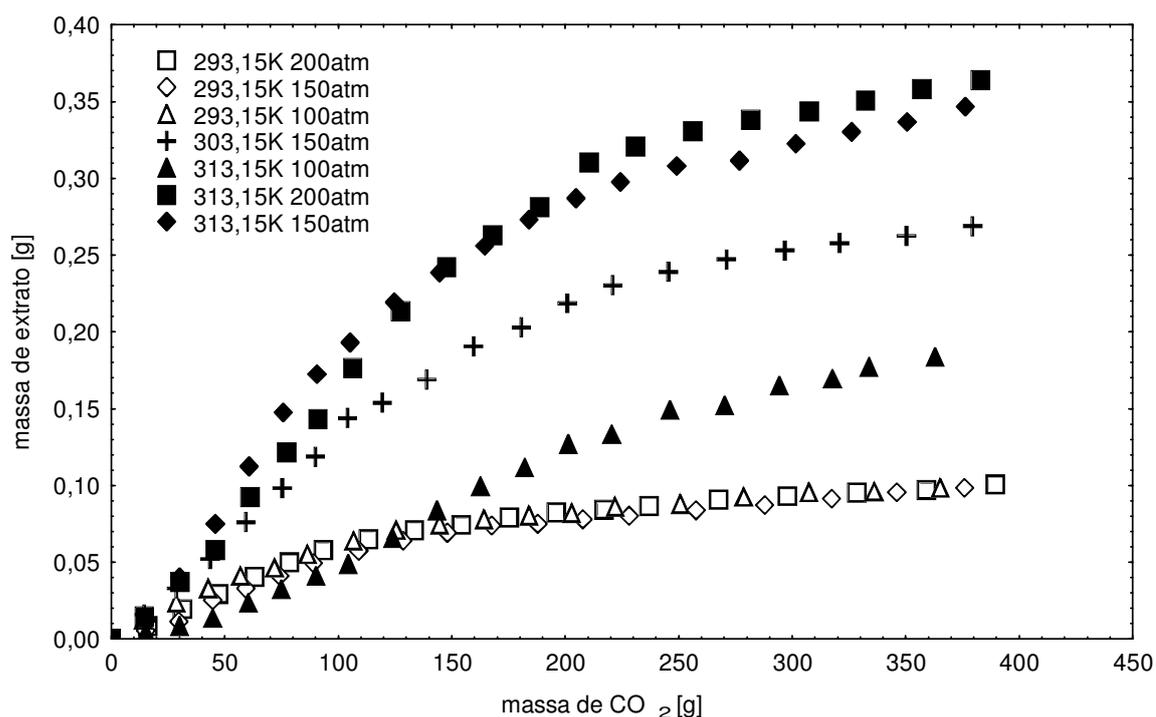
A **Tabela XXIX** apresenta as condições de extração e os resultados obtidos quanto ao rendimento das extrações. As variáveis vazão do solvente e massa de manjerona, foram mantidas constantes em torno de  $1 \text{ g min}^{-1}$  e 25 g, respectivamente. O procedimento para o cálculo do rendimento foi o mesmo do citado e comentado no item 1.1 (extração de orégano). Entretanto, comparando-se as corridas 1, 4 e 7 (~densidade) ou as corridas 3 e 7 (mesma pressão, aumento de temperatura – diminuição da densidade do solvente) é bem claro que a temperatura tem maior efeito no rendimento quando comparada com a densidade.

**Tabela XXIX** – Condições experimentais e rendimentos obtidos nas extrações de manjerona comercial com  $\text{CO}_2$  a altas pressões.

Corrida	T (°C)	P (atm)	Densidade $\text{CO}_2$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )	Rendimento (%)
1	20	100	0,8553	0,64
2	20	150	0,9044	0,64
3	20	200	0,9378	0,66
4	30	150	0,8475	1,074
5	40	100	0,6164	0,730
6	40	150	0,7807	1,380
7	40	200	0,8408	1,450

Em termos de rendimento, a amostra de manjerona comercial analisada a 200 atm e 40 °C foi a que apresentou maior rendimento, cerca de 1,45%. De fato, o extrato obtido tinha visualmente um aspecto pastoso, provavelmente pela presença dos compostos lipofílicos e pigmentos, entre outros.

A **Figura 48** apresenta as curvas experimentais de extração obtidas da variação da massa total do extrato de manjerona versus a massa de  $\text{CO}_2$ .



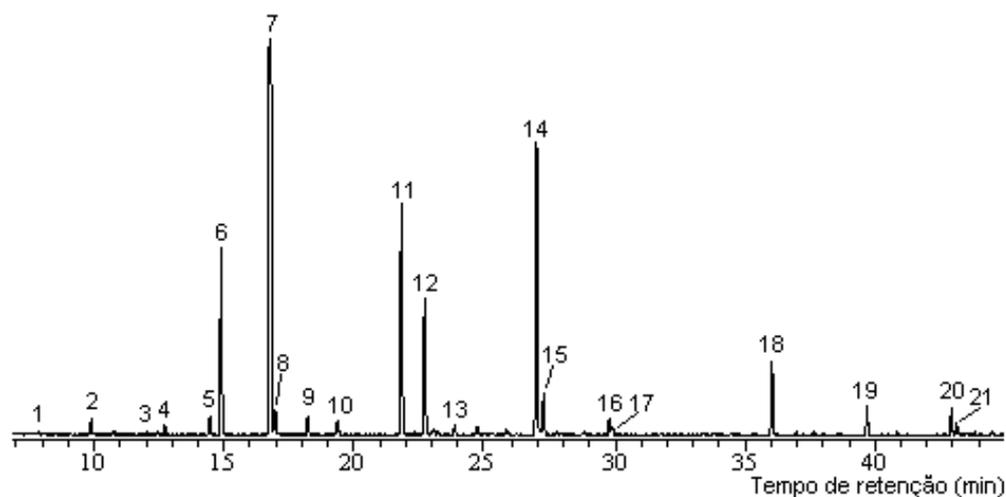
**Figura 48** – Curvas de extração obtidas da amostra de manjerona comercial com CO<sub>2</sub> a altas pressões. Condições descritas na **Tabela XXIX**.

Da mesma maneira que o comentado para a amostra de orégano comercial (item 1.2 e **Figura 42**), observando-se a **Figura 48**, as curvas de extração são formadas por uma etapa linear inicial (taxa constante de extração), onde a solubilidade do óleo no solvente (função somente de temperatura e da pressão) governa a extração e, numa segunda etapa a transferência de massa é controlada pela difusão do solvente para o interior das partículas do sólido e a difusão do solvente-soluto para fora da matriz porosa<sup>115</sup>.

### 1.2.1. Análise Cromatográfica dos Extratos de Manjerona

Na **Figura 49** observa-se um cromatograma do íon total do extrato de manjerona comercial, obtido nas condições de 150 atm e 30 °C cujos picos identificados são apresentados na **Tabela XXX**. Através da análise do cromatograma, com base nas áreas relativas (sem considerar o fator de resposta),

observa-se que o cis-sabineno hidratado e o acetato de cis-sabineno hidratado são os compostos majoritários, seguidos do terpineol-4 e do  $\alpha$ -terpineol.



**Figura 49** - Cromatograma do íon total do extrato de manjericão comercial obtido via extração com CO<sub>2</sub> a 150 atm e 30 °C. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XXX**. Condições cromatográficas conforme a **Tabela XXV**.

Alguns estudos<sup>22-24</sup> têm se preocupado em identificar os constituintes do óleo essencial de manjericão, obtido via extração com fluido supercrítico. Os resultados desses trabalhos indicam que este óleo essencial é uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos terpênicos, terpenos oxigenados e compostos aromáticos.

Neste estudo, os extratos obtidos da extração com CO<sub>2</sub> da manjericão comercial, analisados via CG/EM, apresentaram, em geral (**Tabela XXX**), em sua composição 5 monoterpenos, 8 álcoois terpênicos, 1 fenol, 3 sesquiterpenos e 4 outros compostos oxigenados, representando 23,81% de MT e 76,19% de NMT.

Observando o cromatograma da **Figura 49**, a contribuição em massa desses MT é muito pequena, quase desprezível (traços). Este resultado está de acordo com a idéia de obter extratos com pouco ou nenhuma concentração desta fração de hidrocarbonetos terpênicos, pois eles trazem pouca contribuição ao aroma dos óleos essenciais<sup>159</sup>.

**Tabela XXX** – Compostos tentativamente identificados via CG/EM nos extratos de manjerona obtidos com CO<sub>2</sub> a altas pressões

Pico	Composto	PM	FM
1	$\alpha$ -pineno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	$\beta$ -pineno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	$\alpha$ -terpineno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	Canfeno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	$\gamma$ -terpineno	136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	trans-sabineno hidratado	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
7	cis-sabineno hidratado	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
8	linalol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
9	p-menten-2-ol-1	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
10	terpineol-1	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
11	terpineol-4	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
12	$\alpha$ -terpineol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
13	cis/trans-piperitol	154	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O
14	acetato de cis-sabineno hidratado	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
15	acetato de linalila	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
16	acetato de $\alpha$ -terpineol	196	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
17	carvacrol	150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
18	$\beta$ -cariofileno	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
19	germacreno-B	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
20	espatulenol	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
21	óxido de cariofileno	220	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O

Segundo Temelli e colaboradores<sup>159</sup> essa fração é formada por compostos insaturados, que são instáveis ao calor e à luz, são rapidamente oxidados pelo oxigênio atmosférico, conseqüentemente, decompõem-se em compostos indesejáveis. Outra importância dos óleos essenciais desterpenados é sua aplicação em alimentos, que podem ser aquecidos e, em bebidas nas quais os terpenos e seus produtos de oxidação podem ser questionáveis.

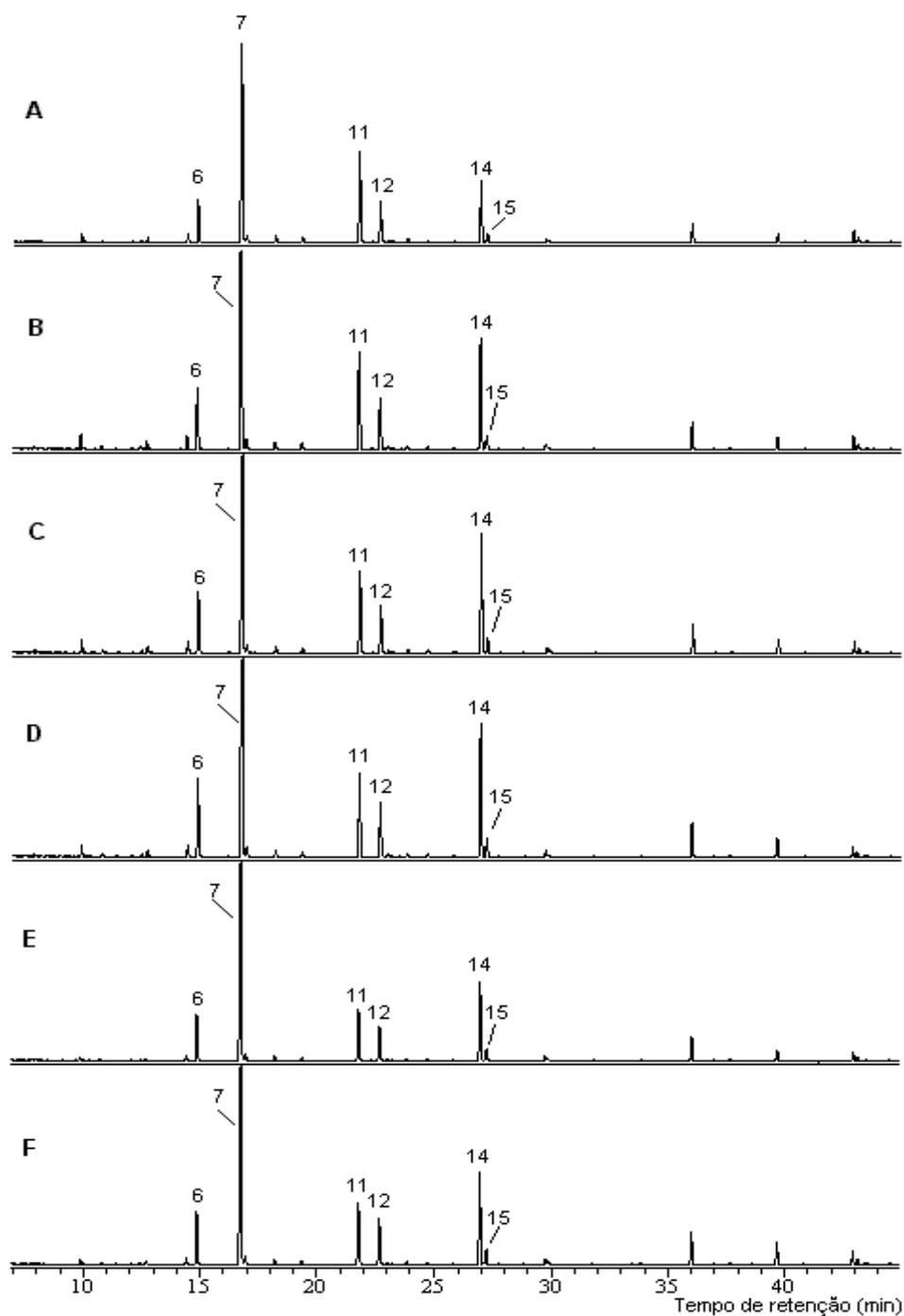
A **Tabela XXXI** apresenta as concentrações dos compostos majoritários presentes na manjerona comercial, do terpineol-4 e do  $\alpha$ -terpineol, calculadas usando como padrão interno a bifenila. Observou-se que na condição de extração de 150 atm e 30 °C, foi obtido a maior concentração do terpineol-4 e do  $\alpha$ -terpineol, ~16,06 e 9,53 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para as amostras comerciais. Observando-se os resultados apresentados na **Tabela XXIX**, constata-se que não é nessas condições de extração que se obteve o maior rendimento. Da mesma maneira, como comentado para a amostra de orégano comercial, de acordo com dados da literatura, as pressões entre 80 e 120 atm e temperaturas próximas a 40°C são as requeridas para extrair os compostos responsáveis pelo aroma de óleos essenciais<sup>22</sup>.

**Tabela XXXI** - Concentração de terpineol-4 e  $\alpha$ -terpineol (mg L<sup>-1</sup>) nos extratos de manjerona comercial, obtidos via extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões.

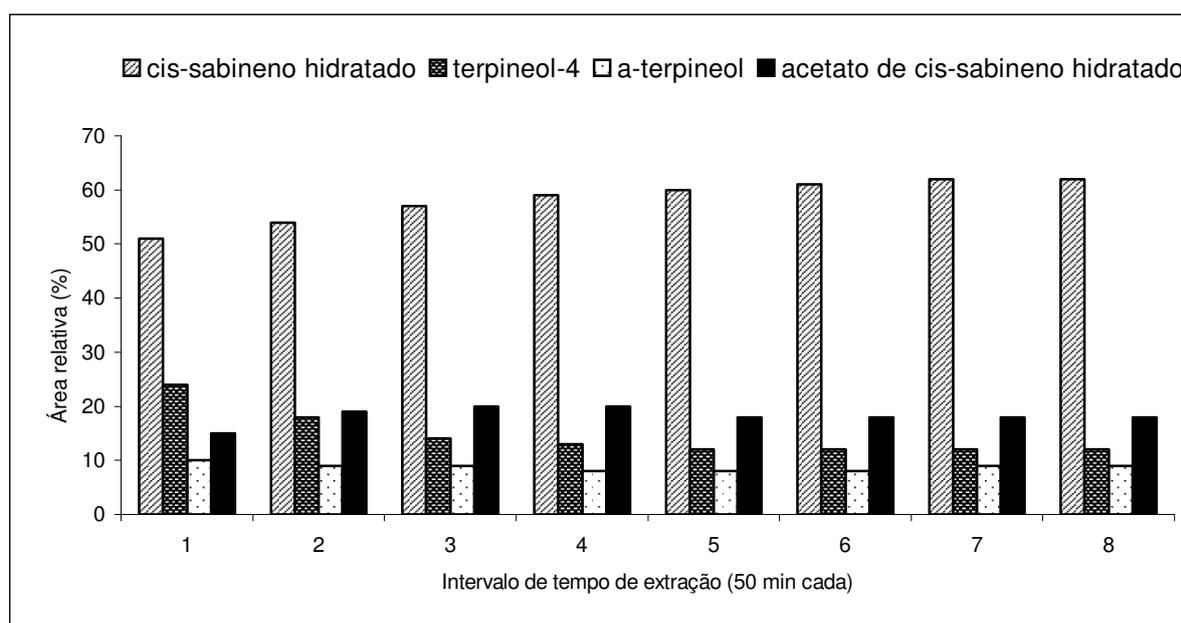
Compostos	Condições de extração						
	100 atm	150 atm	200 atm	150 atm	100 atm	150 atm	200 atm
	20 °C	20 °C	20 °C	30 °C	40 °C	40 °C	40 °C
Terpineol-4	5,21	6,57	7,22	16,06	14,14	13,37	13,21
$\alpha$ -terpineol	3,94	4,76	5,39	9,53	9,84	7,75	7,64

Com a finalidade de se avaliar o tempo necessário para se extrair os principais compostos do óleo essencial de manjerona, uma amostra comercial foi submetida à extração com CO<sub>2</sub> nas condições de 150 atm e 30 °C. Os extratos foram coletados de 50 em 50 min, num total, aproximadamente de 6h. Cada extrato foi analisado via CG/EM, nas mesmas condições anteriores descritas. A **Figura 50** apresenta os cromatogramas desses extratos.

A **Figura 51** apresenta um gráfico das áreas normalizadas dos picos cromatográficos de alguns componentes. Pode-se observar que o cis-sabineno hidratado e o acetato de cis-sabineno hidratado são os componentes majoritários na análise total. Observa-se um aumento em área de todos os compostos, em geral, até 200 min, aproximadamente.

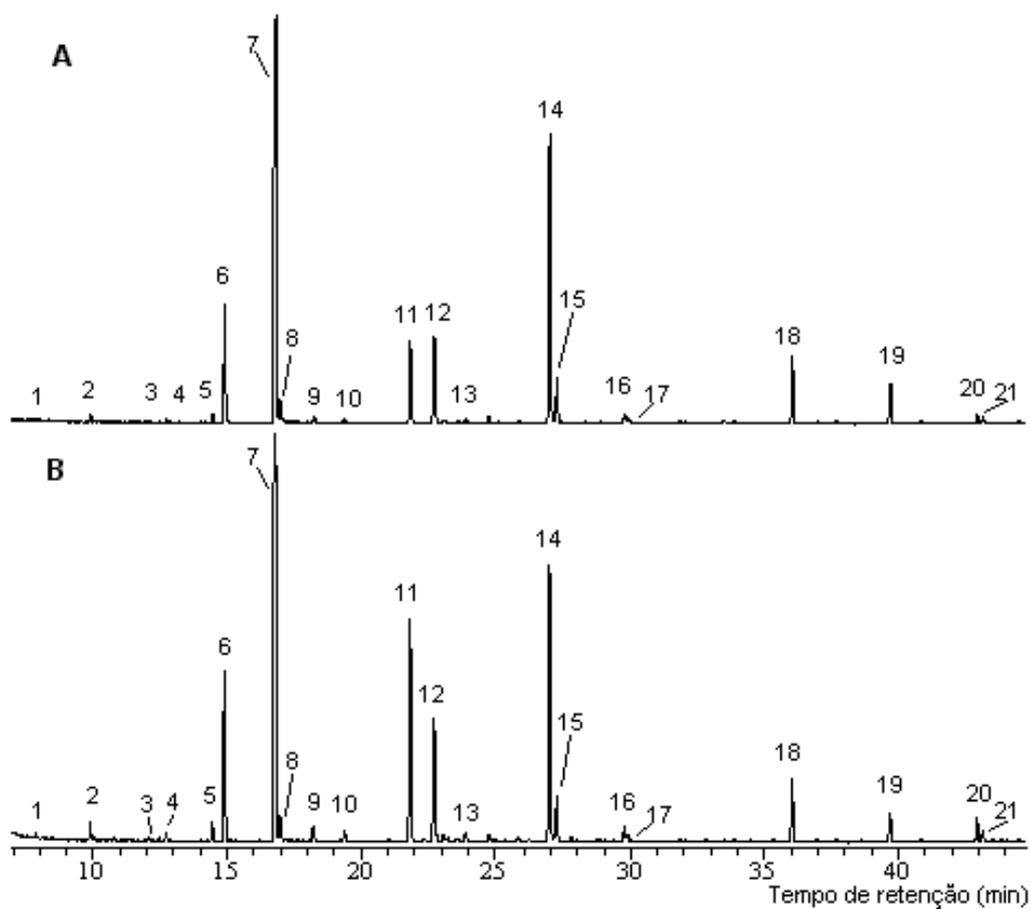


**Figura 50** – Cromatogramas do íon total dos extratos de manjericão comercial, obtidos a 150 atm e 30 °C. **(A)** 50 min; **(B)** 100 min; **(C)** 150 min; **(D)** 200 min; **(E)** 250 min; **(F)** 300 min. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XXX**. Condições cromatográficas conforme a **Tabela XXV**.



**Figura 51** – Gráfico da variação das áreas relativas com o tempo de extração, para os compostos cis-sabineno hidratado, terpineol-4,  $\alpha$ -terpineol e acetato de cis-sabineno hidratado, presentes nos extratos de manjerona comercial, obtidos na extração com  $\text{CO}_2$  a 150 atm e 30 °C.

Com a finalidade de se avaliar a composição química de uma amostra cultivada sob controle agrônômico, 25 g de folhas e flores de *Majorana hortensis* Moench. foram submetidas à extração com  $\text{CO}_2$  a 40 °C e 150 atm, obtendo-se um rendimento de 1,28% (w/w), portanto menor que a amostra comercial, nas mesmas condições de extração. A análise cromatográfica permitiu identificar os mesmos compostos presentes na amostra comercial (**Tabela XXX**). A **Figura 52** apresenta um cromatograma do íon total, da amostra cultivada comparado com o cromatograma da amostra comercial nas mesmas condições de extração. Comparando-se os cromatogramas nenhuma diferença significativa é observada.



**Figura 52** – Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos das amostras de **(A)** *Majorana hortensis* Moench e de **(B)** manjerona comercial, submetidas à extração com CO<sub>2</sub> a 40 °C e 150 atm. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XXX**. Condições cromatográficas conforme a **Tabela XXV**.

# CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES

---

---

A partir dos resultados apresentados e discutidos nos capítulos anteriores, pode-se elaborar as seguintes conclusões sobre o trabalho desenvolvido:

**Quanto à caracterização inicial das amostras:**

- a) terpineol-4 é o componente majoritário em todas as amostras de manjerona e o timol é o maior componente do orégano;
- b) teor de umidade de cada amostra foi calculado sendo encontrado, para todas as amostras, um valor médio de 10%.

**Quanto à época da colheita:**

- a) a composição química do óleo essencial de manjerona não variou muito com a mudança da estação e nem com a origem da semente. Um alto conteúdo de terpineol-4 foi encontrado em todas as amostras. Foram identificados cerca de 32 compostos (15 hidrocarbonetos terpênicos e 17 terpenos oxigenados);
- b) a composição química do óleo essencial de orégano variou em cada estação e com a origem. O composto majoritário, cuja semente é proveniente da Dinamarca, foi o carvacrol, e nos demais o óxido de cariofileno/espatulenol. Na amostra de origem francesa, o carvacrol não foi encontrado durante o inverno estando, também, ausente na amostra proveniente da Alemanha, independente da estação do ano. Nas duas últimas amostras, o limoneno apresentou uma área de pico no cromatograma bem maior durante o inverno e a primavera do que durante o outono.

**Quanto à técnica analítica utilizada:**

- a) Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas: esta técnica mostrou-se adequada para análise dos extratos de manjerona e orégano, independente do método de extração, permitindo o isolamento e a identificação de aproximadamente 30 compostos em cada planta;

b) Cromatografia Capilar Eletroforética Micelar: aplicando-se esta técnica com as variáveis otimizadas (25°C, comprimento de onda em 200 nm, 20 kV de voltagem, modo de injeção hidrodinâmica de 5 s, solução tampão: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 6 mM, DSS 50 mM,  $\gamma$ -ciclodextrina 7 mM e acetonitrila 10%), o método proposto permitiu que os hidrocarbonetos e álcoois monoterpênicos fossem determinados com baixos níveis de detecção (LD entre 0,09 e 1,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O limite de quantificação obtido ficou entre 0,30 e 4,33  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para todos os terpenos. A aplicação desta metodologia a amostras reais apresentou uma recuperação entre 80 e 113 %.

**Quanto à comparação entre os métodos de extração com solventes orgânicos:**

- a) em linhas gerais, o método de extração por Soxhlet apresentou maior rendimento, especialmente quando se utiliza o solvente mais polar, no caso, o metanol;
- b) a aplicação da Cromatografia Líquida Preparativa às amostras serviu como um *clean-up* das mesmas pois tanto a fração eluída com hexano como a porção retida irreversivelmente na coluna permitiram um melhor isolamento dos compostos de interesse;
- c) os compostos, que foram tentativamente identificados, com os espectros de massa, são os que estão normalmente presentes tanto no óleo essencial de manjerona como no de orégano;
- d) nada se pode afirmar quanto à seletividade dos solventes extratores, hexano e acetato de etila, utilizados, uma vez que esses extratos, quando fracionados por CLP com acetato de etila, apresentaram aproximadamente o mesmo perfil.

**Quanto à extração com CO<sub>2</sub>:**

- a) em termos de rendimento, o óleo extraído de manjerona apresentou, em média, valores mais altos que o óleo extraído de orégano, quando obtidos nas mesmas condições de extração;

- b) o composto majoritário dos extratos de manjerona e de orégano (comercial) foi o cis-sabineno hidratado e, ambos extratos apresentaram pouco ou nenhuma concentração da fração de hidrocarbonetos terpênicos;
- c) a desterpenização do óleo essencial representa uma grande aplicação da extração com CO<sub>2</sub> supercrítico em função da retirada destes compostos que se oxidam facilmente com a luz e calor, tornando-se compostos indesejáveis no produto final;
- d) em termos de rendimento, as amostras comerciais de manjerona e orégano analisadas a 200 atm e 40 °C apresentaram os maiores rendimentos, cerca de 1,45% e 1,32%, respectivamente;
- e) observou-se que extrato obtido da amostra cultivada de orégano apresentou maior concentração de carvacrol (~33 mg L<sup>-1</sup>) do que timol (~3,5 mg L<sup>-1</sup>) enquanto que na amostra comercial, a concentração do carvacrol foi ~3,3 mg L<sup>-1</sup> e a de timol, ~37mg L<sup>-1</sup>; entretanto nenhuma diferença significativa é observada na comparação entre os extratos da amostra comercial e a cultivada de manjerona.

*Em resumo, esses resultados são de grande importância para classificar as amostras de manjerona e orégano, baseado em seus quimiotipos. Várias investigações apresentam que há dois quimiotipos nos óleos essenciais de manjerona: cis-sabineno hidratado/ terpineol-4 e carvacrol/timol e que a composição do aroma varia de acordo com a origem geográfica da planta. A importância da identificação desse tipo de compostos está relacionada com a informação obtida para confirmar se o óleo essencial obtido de amostras de manjerona, como por exemplo, na extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões, é de *Majorana hortensis* Moench ou de outra espécie. As amostras de manjerona (*Majorana hortensis* Moench) cultivada no sul do Brasil podem ser consideradas como do quimiotipo cis-sabineno hidratado. Da mesma forma, para o óleo essencial de orégano, cuja classificação é baseada na presença dos compostos fenólicos timol/carvacrol. Nas amostras de orégano (*Origanum vulgare* Linneus) cultivados no sul do Brasil o carvacrol é o componente majoritário, classificando-se essa planta como de quimiotipo carvacrol.*

*O método eletroforético, desenvolvido com sucesso pela primeira vez para os compostos (hidrocarbonetos e oxigenados terpênicos) presentes em óleo essencial de plantas aromáticas, pode ser considerado uma metodologia alternativa à Cromatografia Gasosa que é a técnica clássica mais usada até o momento.*

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

1. Meireles, M.A.A.; *Bol. SBCTA* **1997**, 31 (1), 9.
2. Craveiro, A.A.; Fernandes, A.G.; Andrade, C.H.S.; Matos, F.J.A.; Alencar, J.W.; Machado, M.I.L.; *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*, Ed. UFC: Fortaleza, CE, **1981**.
3. Ugaz, O.L.; In *Investigación Fitoquímica – Terpenoides y Esteroides*; Fondo Edictoral: Peru, 2<sup>a</sup> ed., **1994**, p 23.
4. Araújo, J.M.A.; *Química de Alimentos – Teoria e Prática – Óleos Essenciais*; Ed. Impr. Univ. UFV: Viçosa, MG, **1995**.
5. Simões, C.M.O.; Spitzer, V.; In *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento - Óleos Voláteis*; Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/ Florianópolis/SC, **1999**, p 387.
6. Baratta, M.T.; Dorman, H.J.D.; Deans, S.G. Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Ruberto, G.; *Flavour Fragr. J.* **1998**, 13, 235.
7. Von Hertwig, I.F.; In *Plantas Aromáticas e Medicinais - Origanum majorana L.*; Icone Editora Ltda: São Paulo,SP, **1986**, p 349.
8. Quer, Dr. P.F.; In *Plantas Medicinales - Labiadas – Mayorana*; Editorial Labor S.A.: Barcelona, 11 ed., **1988**, p 696.
9. Von Hertwig, I.F.; In *Plantas Aromáticas e Medicinais - Origanum vulgare L.*; Icone Editora Ltda: São Paulo,SP, **1986**, p 361.
10. Quer, Dr. P. F.; In *Plantas Medicinales - Labiadas – Oregano*; Editorial Labor S.A.: Barcelona, 11 ed., **1988**, p 695.
11. Ken, H.W.Y.; In *Tratado de Farmacognosia - Drogas de Origen Vegetal – Mejorana*; Editorial Atlante: México, **1951**, p 934.
12. Kokkini, S.; In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition -Herbs of the Labiatae - Marjoram*; Macrae, R.; Robinson, R.K.; Sadler, M.J. Eds.; Academic Press: London, **1993**, vol 4, p 2345.
13. Guenther, E.; In *The Essential Oils - Oil of Marjoram*; D. Van Nostrand Company: New York, **1949**, vol III, p 519.
14. Sarer, E.; Scheffer, J.J.C.; Svendsen, A.B.; *Planta Med.* **1982**, 46, 236.
15. Taskinen, J.; *Acta Chem. Scand.B* **1974**, 28, 1121.
16. Nykänen, I.Z.; *Lebensm. Unters. Forsch.* **1986**, 183, 172.
17. Oberdieck, R.; *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1981**, 77, 63.

18. Baser, K.H.C.; Kirimer, N.; Tümen, G.; *J. Essential Oil Res.* **1993**, *5*, 577.
19. Fischer, N.; Nitz, S.; Drawert, F.; *Flavour Fragr. J.* **1987**, *2*, 55.
20. Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Eggling, S. B. e Teranishi, R., *J. Agric. Food. Chem.* **1977**, *25*, 446.
21. Fischer, N.; Nitz, S.; Drawert, F.; *J. Agric. Food. Chem.* **1988**, *36*, 996.
22. Reverchon, E.; Donsì, G.; Pota, F.; *Ital. J. Food Sci.* **1992**, *3*, 187.
23. Reverchon, E.; *J. Supercrit. Fluids* **1992**, *5*, 256.
24. Reverchon, E.; Donsì, G.; Osséo, L.S.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **1993**, *32*, 2721.
25. Reverchon, E.; *J. Supercrit. Fluids*, **1997**, *10*, 1.
26. Jiménez-Carmona, M.M.; Ubera, J.L.; Luque de Castro, M.D.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 625.
27. Sarer, E.; Scheffer, J.J.C.; Janssen, A.M.; Svendsen, A.B.; In *Essential Oils and Aromatic Plants - Composition of the Essential Oil of Origanum majorana Grown in Different Localities in Turkey*; A. Svenden, B.; Scheffer, J.J.C. Eds.; M. Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers: Dordrecht, **1985**, p 209.
28. Daouk, R.K.; Dagher, S.M.; Sattout, E.J.; *J. Food Proct.* **1995**, *58* (10), 1147.
29. Economou, K.D.; Oreopoulou, V.; Thomopoulos, C.D.; *JAOCS* **1991**, *68*, 109.
30. Balias, C.; Oreopoulou, V.; Thomopoulos, C.D.; *JAOCS* **1992**, *69*, 520.
31. Charai, M.; Mosaddak, M.; Faid, M.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 657.
32. Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; Beek, T.A. van; Linssen, J.P.H.; *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140.
33. Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G.; *J. Agric. Chem.* **2000**, *48*, 2576.
34. El-Alim, S.S.L.A.; Lugasi, A.; Hóvári, J.; Dworschák, E.; *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 277.
35. Zandi, P.; Ahmadi, L.; *J. Food Sci. Techn.-MysoreAgric.* **2000**, *37*, 436.
36. Singh, M.; Raghavan, B.; Abraham, K.O.; *Nahrung-Food* **1996**, *40*, 264.
37. Raghavan, B.; Rao, L.J.; Singh, M.; Abraham, K.O.; *Nahrung-Food* **1997**, *41*, 159
38. Ken, H.W.Y.; In *Tratado de Farmacognosia - Drogas de Origen Vegetal – Mejorana*; Editorial Atlante: México, **1951**, p 938 Ken, H.W.Y.; In *Tratado de Farmacognosia - Drogas de Origen Vegetal – Mejorana*; Editorial Atlante: México, **1951**, p 934.

39. Fleisher, A.; Fleisher, Z.; *Econ. Bot.* **1988**, *42*, 232.
40. Kokkini, S.; Karousou, R.; Vokou, D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1994**, *22*, 517.
41. Afsharypuor, S.; Sajjadi, S.E.; Erfan-Manesh, M.; *Planta Med.* **1997**, *63*, 179.
42. Kaul, V. K.; Singh, B.; Sood, R.P.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 101.
43. Vokou, D.; Kokkini, S.; Bessiere, J. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1993**, *21*, 287.
44. Kokkini, S.; In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition -Herbs of the Labiatae - Marjoram*; Macrae, R.; Robinson, R.K.; Sadler, M.J. Eds.; Academic Press: London, **1993**, vol 4, p 2346.
45. Rhyu, H.Y.; *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 1373.
46. Fleisher, A.; Sneer, N.; *J. Sci. Food Agric.* **1982**, *33*, 441.
47. Ravid, U.; Putievsky, E.; In *Progress in Essential Oil Research - Carvacrol and Thymol Chemotypes of East Mediterranean Wild Labiatae Herbs.*; Ernst-Joachim Brunke Eds.; Walter de Gruyter-Berlin:**1986**; p 163.
48. Ruberto, G.; Biondi, D.; Meli, R.; Piattelli, M.; *Flavour Fragr. J.* **1993**, *8*, 197.
49. Harvala, C.; Menounos, P.; Argyriadou, N.; *Planta Méd.* **1987**, *53*, 107.
50. Daouk, R.K.; Dagher, S.M.; Sattout, E.J.; *J. Food Proct.* **1995**, *58* (10), 1147.
51. Economou, K.D.; Oreopoulou, V.; Thomopoulos, C.D.; *JAOCS* **1991**, *68*, 109.
52. Baratta, M.T.; Dorman, H.J.D.; Deans, S.G.; Biondi, D.M.; Ruberto, G.; *J. Essent. Oil Res.* **1998**, *10*, 618.
53. Baniyas, C.; Oreopoulou, V.; Thomopoulos, C.D.; *JAOCS* **1992**, *69*, 520.
54. Vekiari, S.A.; Oreopoulou, V.; Tzia, C.; Thomopoulos, C.D.; *JAOCS* **1993**, *70*, 483.
55. Kanazawa, K.; Kawasaki, H.; Samejima, K.; Ashida, H.; Danno, G.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 404.
56. Ozcan, M.; Akgul, A.; *Acta Alim.*; **1995**, *24*, 81.
57. Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; Beek, T.A. van; Linssen, J.P.H.; *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140.
58. Milic, B.L.; Milic, N; *Phytother. Res.* **1998**, *12*, S3-S6.
59. Azcan, N.; Kara, M.; Asilbekova, D.T.; Ozek, T.; Baser, K.H.C.; *Chem. Nat. Compounds* **2000**, *36*, 132.
60. Dorman, H.J.D.; Surai, P.; Deans, S.G.; *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 241.

61. Dorman, H.J.D.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Deans, S.G.; *Flavour Fragr J.* **2000**, *15*, 12.
62. Ozcan, M.; Boyraz, N.; *Europ. Food Res. Technol.* **2000**, *212*, 86.
63. Milos, M.; Mastelic, J.; Jerkovic, I.; *Food Chem.* **2000**, *71*, 79.
64. Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G.; *J. Agric. Chem.* **2000**, *48*, 2576.
65. Skandamis, P.; Koutsoumanis, K.; Fasseas, K.; Nychas, G.J.E.; *Ital. J. Food Sci.* **2001**, *13*, 65.
66. Vichi, S.; Zitterl-Eglseer, K.; Jugi, M.; Franz, C.; *Nahrung-Food* **2001**, *45*, 101.
67. Justesen, U.; Knuthsen, P.; *Food Chem.* **2001**, *73*, 245.
68. Putievsky, E.; Ravid, U.; *Acta Hort.*, **1984**, *144*, 71.
69. Putievsky, E.; Ravid, U.; Dudai N.; *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *43*, 225.
70. Scheffer, J.J.C.; Looman, A.; Svendsen, A.B.; Sarer, E.; In *Progress in Essential Oil Research - The Essential Oils of Three Origanum Species Grown in Turkey*; Ernst-Joachim Brunke Eds.; Walter de Gruyter-Berlin: **1986**, p 151.
71. Kokkini, S.; Vokou, D.; Karousou, R.; *Bot. Chronica* **1991**, *10*, 337.
72. Baser, K.H.C.; Özek, T.; Tümen, G.; Sesik, E.; *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 619.
73. Baser, K.H.C.; Özek, T.; Kürkçüoğlu, M.; Tümen, G.; *J. Essent. Oil Res.* **1994**, *6*, 31.
74. Sesik, E.; Tümen, G.; Kirimer, N.; Özek, T.; Baser, K.H.C.; *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 425.
75. Tümen, G.; Baser, K.H.C.; *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 315.
76. Souleles, Chr.; *Planta Med.*; **1991**, *57*, 77.
77. Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N.; Lanaras, T.; *Phytochem.* **1997**, *44*, 883.
78. Russo, M.; Galletti, G.C.; Bocchini, P.; Carnacini, A.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3741.
79. D'Antuono, L.F.; Galletti, G.C.; Bocchini, P.; *Annals of Bot.* **2000**, *86*, 471.
80. García, M.A.; Sanz, J.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *918*, 189.
81. Ondarza, M.; Sanchez, A.; *Chromatographia* **1990**, *30*, 16.
82. Platin, S.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö.; *Turk. J. Eng. Environ. Sci.* **1994**, *18*, 369.
83. Köse, O.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö.; *Proceedings of the Fifth International Symposium on Supercritical Fluids* **1998**, *vol 2*, 437.

84. Köse, O.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö.; *J. Supercrit. Fluids* **2000**, *18*, 49.
85. Kubat, H.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö.; *Chem. Eng. Proces.* **2001**, *40*, 19.
86. Simándi, B.; Oszagyán, M.; Lemberkovics, É.; Kéry, Á.; Kaszács, J.; Thyrión, F.; Mátyás, T.; *Food Res.Int.* **1998**, *31*, 723.
87. Gaspar, F.; Santos, R.; King, M.B.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 4603.
88. Guenther, E.; In *The Essential Oils - Essential Oil Content of Plant Material*; D. Van Nostrand Company: New York, **1948**, *vol I*, p 316.
89. Woodbury, J.E.; In *Spices and Other Condiments - Volatile Oil in Spices - AOAC - Official Methods of Analysis*; AOAC Inc.,**1990**, vol. 2, ed. 15, p 999.
90. Ertl, F.; *J. AOAC Inter.* **1997**, *80*, 901.
91. Soares, B.G.; Souza, N.A. de; Pires, D.X.; *Química Orgânica, Teoria e Técnicas de Preparação, Purificação e Identificação de Compostos Orgânicos*, Editora Guanabara: RJ, **1988**, p 65.
92. Ferri, P.H.; In *Química de produtos naturais: métodos gerais – Plantas Medicinais: Arte e Ciências*; Stasi, L.C. di, organizador, Editora UNESP, SP: **1996**, p 129.
93. Wise, S.A.; Benner, B.A.; Byrd, G.D.; Chesler, S.N.; Rebbert, R.E.; Shantz, M.M.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 887.
94. Eiceman, G.A.; Viau, A.C.; Karash, F W.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1492.
95. Blanco, C.G.; Prado, J. G.; Borrego, A. G.; *Org. Geochem.* **1992**, *18 (3)*, 313.
96. Marvin, C.H.; Allan, A.; McCarry, B.; *Intern. J. Envirom. Anal. Chem.* **1992**, *49*, 221.
97. Guillén, M.D.; Dominguez, A.; Iglesia, M.J.E.; Blanco, C.G.; *Fuel* **1995**, *74 (2)*, 233.
98. Ricards, M.; Campbell, R.M.; *LC-GC* **1987**, *9 (5)*, 358.
99. Barboza, J.C.S.; Serra, A.A.; *Química Nova* **1992**, *15 (4)*, 302.
100. Riaz, A.F.; *Aldrichimica Acta* **1988**, *21 (2)*, 31.
101. Tena, M.T.; Valcárcel, M.; Hidalgo, P.J.; Ubera, J.L.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 521.
102. Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M.; Tena, M.T.; *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer: Berlin, **1994**.

103. McHugh, M.A.; Krukonis, V.J.; *Supercritical Fluid Extraction, Principles and Practice*; Butterworth Stoncham: Boston, MA, 1986.
104. Araújo, J.M.A.; *Química de Alimentos – Teoria e Prática – Fluido Supercrítico*; Ed. Impr. Univ. UFV: Viçosa, MG, **1995**.
105. Hawthorne, S.B.; Krieger, M.S.; Miller, D.J.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 472.
106. Hawthorne, S. B.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 633A.
107. Walker, D.F.G.; Bartle, K.D.; Breen, D.G.P.A.; Clifford, A.A.; Costiou, S.; *Analyst* **1994**, *119*, 2789.
108. Lang, Q.; Wai, C.M.; *Talanta* **2001**, *53*, 771.
109. Modey, W.K.; Mulholland, D.A., Raynor, M.W.; *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 1.
110. Kery, A.; Ronyai, E.; Simandi, B.; Lemberkovics, E.; Keve, T.; Deak, A.; Kemeny, S.; *Chromatographia* **1999**, *49*, 503.
111. Zebovic, Z.; Lepojevic, Z.; Vujic, Dj.; *Chromatographia* **2000**, *51*, 175.
112. Lanças, F.M.; Vilegas, J.H.Y.; Sargenti, S.R.; Moraes, M.L.L.; Nossak, A.C.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1994**, *14* (Supl), 56.
113. Reverchon, E.; Senatore, F.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 154.
114. Blanch, G.P.; Ibáñez, E.; Herralz, M.; Reglero, G.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 888.
115. Coelho, L.A.F.; Oliveira, J.V.; d'Ávila, S.G.; Vilegas, J.H.Y.; Lanças, F.M.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1997**, *20*, 431.
116. Hawthorne, S.B.; Riekkola, M-L.; Serenius, K.; Holm, Y.; Hiltunen, R.E.; Hartonen, K.; *J. Chromatogr.* **1993**, *634*, 297.
117. Roy, B.C.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T.; *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, *67*, 21.
118. Reverchon, E.; Osséo, L.S.; Gorgoglione, D.; *J. Supercrit. Fluids* **1994**, *7*, 185.
119. Reverchon, E.; Porta, G.D.; Senatore, F.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1654.
120. Ferreira, S.R.S.; Nikolov, Z.L.; Doraiswamy, L.K.; Meireles, M.A.; Petenate, A.J.; *J. Supercrit. Fluids* **1999**, *14*, 235.
121. Lanças, F.M.; *Cromatografia em Fase Gasosa*, Acta: São Carlos, SP, **1993**, p 87.
122. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*: Editora da UNICAMP: Campinas, SP, 6 ed., **1995**.

123. Araújo, J.M.A.; In *Química de Alimentos – Teoria e Prática – Cromatografia Gasosa*; Ed. Impr. Univ. UFV: Viçosa, MG, **1995**, p 163.
124. Alencar, J.W.; Craveiro, A.A.; Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; *Química Nova* **1990**, *13*, 282.
125. Esteban, J. L.; Valero, E.; Miranda, E.; Jimenez, M.I.; Martinez-Castro, I.; Sanz, J.; Morales, R.; *LC-GC* **1997**, *15*, 264.
126. Marriott, P.J.; Shellie, R.; Cornwell, C.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *936*, 1.
127. Pavia, D.L. Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; *Introduction to Spectroscopy* Saunders College Publishing: Florida, USA; 2 ed.; **1996**.
128. Kitagishi, K.; In *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*; Shintani, H.; Polonský, J. Eds; Chapman & Hall: London, UK, **1997**.
129. Altria, K.D.; In *Capillary Electrophoresis Guidebook*; Altria, K.D. Eds; Humana Press: Hertfordshire, UK, **1996**.
130. St. Claire, R.L.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 569R.
131. Fernandes, J.B.; Fernandes, F.A.N. In *Produtos Naturais no Controle de Insetos – Cromatografia Capilar Eletroforética de Zona e Eletrocínética Micelar Aplicadas a Produtos Naturais*; Ferreira, J.T.B.; Corrêa, A.G.; Vieira, P.C. (organizadores); EdUFSCar: São Carlos, SP, **2001**, vol. III, p 129.
132. Hjertén, S.; *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9*, 122.
133. Virtinen, R.; *Acta Polytech. Scand.* **1974**, *123*, 1.
134. Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, T.P.E.M.; *J. Chromatogr.* **1979**, *169*, 1.
135. Jorgenson, J. W.; Luckacs, K. D.; *Anal. Chem.* **1981a**, *53*, 1298.
136. Jorgenson, J. W.; Luckacs, K. D.; *J. Chromatogr.* **1981b**, *218*, 209.
137. Jorgenson, J.W.; Luckacs, K..D.; *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Comm.* **1981c**, *4*, 230.
138. Blanco, C.C.; *Electroforesis Capilar*; Universidad de Almeria, Servicios de Publicaciones: Almeria, **1998**.
139. Beckman Instruments, Inc.; *Introduction to Capillary Electrophoresis*; Beckman Instruments. Inc.: California, **1991**.
140. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111.

141. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.; *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 834.
142. Terabe, S.; Ozaki, H.; Otsuka, K.; Ando, T.; *J. Chromatogr.* **1985**, *332*, 211.
143. Nishi, H.; Terabe, S.; *Electrophoresis* **1990**, *11*, 691.
144. Terabe, S.; Miyashita, Y.; Ishihama, Y.; Shibata, O.; *J. Chromatogr.* **1993**, *636*, 47.
145. Janini, G.M.; Muschik, G.M.; Issaq, H.J.; *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1575.
146. Rodrigues, M.R.A.; Caramão, E.B.; Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M.; *J. Microcolumn Sep.* **2001**, *13*, 293.
147. Terabe, S.; *Micellar Electrokinetic Chromatography*; Beckman Instruments, Inc.: California, **1992**.
148. Rogan, M.M.; Altria, K.D.; *Introduction to the Theory and Applications of Chiral Capillary Electrophoresis*; Beckman Instruments, Inc.: California, **1993**.
149. Terabe, S.; Miyashita, Y.; Shibata, O. E.; Barnhart, R.; Alexander, L. R.; Patterson, D. J.; Karger, B. L.; Hosoya, K.; Tanaka, N. J.; *Chromatogr.* **1990**, *516*, 23. 21
150. Armstrong, D.W.; Zukowski, J.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 445.
151. Gahm, K.H.; Chang, L.W.; Armstrong, D.W.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *759*, 149.
152. Rodrigues, M.R.A.; Caramão, E.B.; Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4215.
153. Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1202.
154. Biondi, D.; Cianci, P.; Geraci, C.; Ruberto, G.; Piattelli, M.; *Flavour Fragr. J.* **1993**, *8*, 331.
155. Vera, R.R.; Chane-Ming, J.; *Food Chem.* **1999**, *66*, 143.
156. Nishi, H.; Terabe, S.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 245.
157. Luz, L.P.; *Dissertação de Mestrado*, PG-QUI/UFRGS, **1998**.
158. International Thermodynamic Tables of the Fluid State: Carbon Dioxide, Angus, S.; Armstrong, B.; Reuck, K.M. Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, **1976**.
159. Temelli, F.; Braddock, R.J.; Chen, C.S.; Nagy, S.; *ACS Symp. Ser.* **1988**, *366*, 109.

# ANEXOS

---

---

## TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

**1. Maria Regina Alves Rodrigues**, Maurício de Souza, Elina B. Caramão “*Estudos preliminares sobre a extração ultrassônica da manjerona e do orégano*”, trabalho apresentado durante a 22<sup>a</sup> reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, maio de 1999. Resumo publicado nos anais do Congresso, PN-202.

**2. Maria Regina Alves Rodrigues**, Priscila P. Zini, Luiz O. de Castro, Elina B. Caramão, “*Composição do óleo essencial da manjerona (Marjorana hortensis Moench) cultivada no Rio Grande do Sul*”, trabalho apresentado durante o X ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, Santa Maria, RS, setembro de 1999. Resumo publicado nos anais do Encontro, CE-22.

**3. Maria Regina Alves Rodrigues**, Maurício de Souza, Priscila P. Zini, Elina B. Caramão, “*Ultrassom aplicado à extração de óleo de manjerona e de orégano*”, trabalho apresentado durante o IX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Porto Alegre, RS, outubro de 1999. Resumo publicado nos Anais do Encontro.

**4. Maria Regina Alves Rodrigues**, Priscila P. Zini, Maurício de Souza e Elina B. Caramão, “*Óleo essencial de manjerona: estudo via Clevenger e GC/MS*”, trabalho apresentado durante o IX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Porto Alegre, RS, outubro de 1999. Resumo publicado nos Anais do Encontro. Esse trabalho foi apresentado de forma oral e recebeu destaque.

**5. Maria Regina Alves Rodrigues**, , Priscila P. Zini, Luiz O. de Castro e Elina B. Caramão, “*Caracterização do óleo essencial da manjerona via GC/MS*”, trabalho apresentado durante o VII Encontro de Química da Região Sul, Tubarão, SC, novembro de 1999. Resumo publicado nos Anais do Encontro, QA-87. Esse trabalho foi escolhido para ser apresentado de forma oral.

**6. Maria Regina Alves Rodrigues**, Priscila P. Zini, Elina B. Caramão “*Caracterización del azeite esencial de oregano via GC/MS*”, trabalho apresentado no VIII COLACRO – Congresso Latino-Americano de Cromatografia, Buenos Aires, Argentina, abril de 2000. Resumo publicado nos Anais do Colóquio.

**7. Maria Regina Alves Rodrigues**, Priscila P. Zini, Elina B. Caramão, “*Estudo do óleo essencial de manjerona e de orégano cultivados no Rio Grande do Sul*”, trabalho apresentado na 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, maio de 2000. Resumo publicado nos Anais do Congresso.

**8. Maria Regina Alves Rodrigues**, Elina B. Caramão, Lourdes Arce, Angel Rios e Miguel Valcárcel “*Use of cyclodextrins for the separation of monoterpene isomers by micellar electrokinetic capillary chromatography*” trabalho apresentado no 24th International Symposium on Capillary Chromatography, Las Vegas, EUA, maio de 2001. Publicado via on-line, na página web do Simpósio.

**9. Maria Regina Alves Rodrigues**, Elina B. Caramão, Priscila P. Zini, “*Caracterização do óleo essencial de manjerona e de orégano via CG/EM*”, trabalho apresentado durante o XXXIX CBABQ – Congresso Brasileiro da Associação Brasileira de Química, Porto Alegre, RS, agosto de 2001. Resumo publicado nos anais do Encontro.

**10. Maria Regina Alves Rodrigues**, Elina B. Caramão, Lourdes Arce, Angel Rios e Miguel Valcárcel, “*Separação e identificação de monoterpenos presentes em óleo essencial de manjerona usando eletroforese capilar*”, trabalho apresentado durante o XI ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, Campinas, SP, setembro de 2001. Resumo publicado nos anais do Encontro.

**11. Maria Regina Alves Rodrigues**, Elina B. Caramão, Jonathan G. dos Santos, Rafael D. Vecchia, Cláudio Dariva, José Vladimir de Oliveira, “*Analysis of chemical composition and liquid yield of the extract *origanum vulgare* obtained with CO<sub>2</sub> at high pressures.*”, trabalho apresentado no 25th International Symposium on Capillary

Chromatography, Riva del Garda, Verona, Itália, maio de 2002. Publicado no CD-room do Simpósio.

**12. Maria Regina Alves Rodrigues**, Elina B. Caramão, Jonathan G. dos Santos, Cláudio Dariva, José Vladimir de Oliveira, “*Extração supercrítica do óleo essencial de orégano e análise da composição química*”, trabalho apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, RS, agosto de 2002. Aceito para publicação.

**13. Maria Regina Alves Rodrigues**, Elina B. Caramão, Jonathan G. dos Santos, Cláudio Dariva, José Vladimir de Oliveira, “*Chemical composition and extraction yield of labiatae species from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction*”, trabalho a ser apresentado no Fourth International Symposium on High-Pressure Process Technology and Chemical Engineering, Veneza, Itália, 2002. Aceito para publicação.

## TRABALHOS PUBLICADOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS

1. Rodrigues, M.R.A.; Caramão, E.B.; Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Use of Cyclodextrins for the Separation of Monoterpenes Isomers by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography; *J. Microcolumn Sep.* **2001**, 13(7), 293.

2. Rodrigues, M.R.A.; Caramão, E.B.; Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M.; Determination of Monoterpene Hydrocarbons and Alcohols in *Majorana hortensis* Moench by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatographic; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(15), 4215.

## TRABALHOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO EM REVISTAS INTERNACIONAIS

1. Rodrigues, M.R.A.; Caramão, E.B.; Santos, J.G.; Vecchia, R.D.; Dariva, C.; Oliveira, J.V.; Analysis of chemical composition and liquid yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained with CO<sub>2</sub> at high pressures *J. Supercr. Fluids* Submetido para publicação, **2002**.

2. Rodrigues, M.R.A.; Caramão, E.B.; Santos, J.G.; Vecchia, R.D.; Dariva, C.; Oliveira, J.V.; The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction of *Majorana hortensis* Moench. *J. Agric. Food Chem.* Submetido para publicação, **2002**.

# Use of Cyclodextrins for the Separation of Monoterpene Isomers by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

Maria Regina A. Rodrigues,<sup>1</sup> Elina B. Caramão,<sup>2</sup> Lourdes Arce,<sup>3</sup>  
Angel Rios,<sup>3</sup> Miguel Valcárcel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Organic Chemistry / University Federal of Pelotas, 96000-970, Pelotas / RS / Brazil

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, University Federal of Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre / RS / Brazil

<sup>3</sup> Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, Edificio Anexo C-3, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

Received 20 May 2001; revised 7 August 2001; accepted 16 August 2001

**Abstract:** The micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the determination of monoterpenes such as camphene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinene, terpinolene and p-cymene was established. Addition of cyclodextrins (CDs) to the buffer solution permits the separation of these monoterpenes. The separation is dependent on the type of CD, and gamma-CD was the most effective cyclodextrin, in the method here developed. The method permits low concentrations of monoterpenes to be separated and detected. The addition of an organic solvent (acetonitrile) as modifier in the buffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM SDS, 7 mM de  $\gamma$ -CD) allowed this separation. The analysis was performed with a positive power supply of 20 kV at a temperature of 25°C. The samples were hydrostatically (5 s) introduced into the anodic end of the capillary and electropherograms were recorded at 200 nm. This method could be highly suitable for the separation and determination of monoterpenes in essential oils of leaves, and the flowers of marjoram and oregano among other real samples. © 2001

John Wiley & Sons, Inc. J Micro Sep 13: 293–299, 2001

**Key words:** monoterpenes; cyclodextrins; MEKC

## INTRODUCTION

In the last decade capillary electrophoresis (CE) has emerged as one of the most efficient methods for separation of charged components in mixtures [1–3]. Despite the high efficiency of this technique, only ionic or charged compounds can be separated. Later, the introduction of micellar electrokinetic chromatography (MEKC), as a special mode of basic capillary electrophoresis, has provided the separation of a wide variety of neutral molecules [4–9]. In terms of separation principles, MEKC is based on both different electrophoretic mobilities and differ-

ent partition coefficients between two liquid phases, and has to be regarded therefore, as a combination of chromatography and electrophoresis. The advantage of the MEKC technique is the manner in which retention can be manipulated through simple adjustment of the composition of the electrolyte-buffer acting as the mobile phase. Both the primary (mobile) and secondary (micellar) phases can be changed to allow changes in retention and to provide a better separation [10–12]. Generally in MEKC, anionic surfactants (micelles), especially sodium dodecyl sulfate (SDS) are the most widely used. These micelles migrate electrophoretically in the direction opposite that of electro-osmotic flow (EOF) and do not adsorb onto the negatively charged wall of a fused-silica capillary [13]. Other separation media of interest are cyclodextrins (CD) that had been used extensively as chiral selectors for liquid chromatography (LC) and CE. Cyclodextrins are commonly available in three different sizes and a variety of racemic analytes may be separable with the choice of the appropriate

Presented at the 24th International Symposium on Capillary Chromatography, Las Vegas, Nevada, USA, May 20–24, 2001.

Correspondence to: Miguel Valcárcel; e-mail: qa1ricaa@uco.es.

Contract grant sponsor: Spain's DG del MCT.

Contract grant number: Project BQU2001-1815.

Contract grant sponsor: Brazil's Foundation CAPES program.

cyclodextrin [14–16]. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides containing six to eight glucopyranose units arranged in such a way as to create a cavity. They can separate molecules on the basis of their size relative to the CD cavity and on the stereo selectivity due to the optically active nature of the carbohydrate units [17]. The first use of CDs in CE was reported by Terabe et al. [18,19] for the separation of positional isomers by CD-modified MEKC.

The enantioresolution of neutral analytes such as terpenes ( $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene) are not easy tasks. Most enantioresolutions have been carried out by gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC), where the direct enantioresolution of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene via reversed-phase HPLC with an  $\alpha$ -CD bonded stationary phase was reported [15]. As an alternative to the classical techniques used for the separation of these compounds, CE was employed showing the following advantages compared with GC and HPLC: better resolution, higher sensitivity with simple sample preparation, short time of analysis, the use of organic solvent and a minimum production of residue, among others.

Reviewing the literature, only one article reported a substantial enantioresolution of neutral analytes such as  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene and limonene, by CE techniques, using mixtures of  $\alpha$ -CD and sulphated  $\beta$ -CD as chiral additives in CE [14].

The aim of this investigation was to develop a method for separation of monoterpenes such as  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinene, terpinolene, camphene and p-cymene. This type of compound is of special interest in the analysis of essential oils. Generally, the terpene fraction makes little contribution to the flavor or fragrance of the oil. This fraction is mostly unsaturated compounds; it exhibits instability to heat and light, and it is rapidly oxidized by atmospheric oxygen, consequently decomposing to undesirable compounds. Several processes are used to obtain essential oils without terpenes, such as vacuum distillation, steam distillation, extraction with solvents and adsorption processes, and more recently, supercritical fluid extraction processes. The advantages of obtaining de-terpened essential oils is in flavoring food products that will be heated and in beverages where terpenes and oxidation products might be objectionable, and moreover reduction in storage and transportation costs due to reduced volume [20]. This article describes separation of these terpene isomers (all have same molecular formula  $C_{10}H_{16}$ , except p-cymene,  $C_{10}H_{14}$ ) by employing CDs with SDS solutions. The effects of CDs concentrations, types of CDs, voltage,

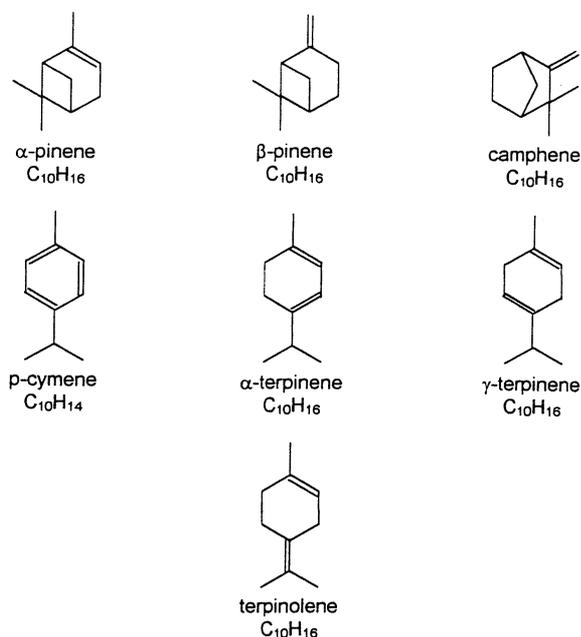
temperature, organic solvent addition and pH are discussed.

## EXPERIMENTAL

**Materials.** Terpenes (see Figure 1) such as (+)- $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinene, terpinolene, p-cymene and (+)-camphene were obtained from Fluka and (+)- $\alpha$ -pinene from Sigma. The stock solutions were prepared at  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  by dissolving each solute in methanol and all were stored in the refrigerator. Working standard solutions were prepared daily by diluting with purified water. These solutions were prepared before each run because of the low solubility in water of these stock solutions. CDs ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) were obtained from Fluka and sodium dodecyl sulphate (SDs) were obtained from Sigma.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  were obtained from Aldrich. The water used to prepare all standard and buffer solution was deionized.

**Instrumentation.** The experiments were carried out using a Beckman P/ACE 5500 capillary electrophoresis system with a diode array detector. System control and data processing was carried out with Gold software. A fused-silica capillary column,  $75 \mu\text{m}$  i.d. with an effective length (between inlet and detector) of 50 cm (total length 57 cm), used for the separation of the analytes, was also from Beckman.

**Operating conditions.** The MEKC separation was performed in the fused-silica capillary with a positive power supply of 20 kV (average current  $64 \mu\text{A}$ ) at a



**Figure 1.** Chemical structures of the monoterpenes used in this study.

temperature of 25°C. The samples were hydrostatically (5 s) introduced into the anodic end of the capillary. Electropherograms were recorded at 200 nm. The running electrolyte consisted of 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM SDS, 7 mM de  $\gamma$ -CD and 10% acetonitrile adjusted to pH 8.0 by addition of 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The capillary was cleaned daily by flushing with deionized water for 10 min, 10 min with 0.1 M NaOH, 5 min with deionized water and 15 min with buffer. Between separations the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH (2 min), deionized water (3 min) and buffer (5 min). These steps were very important to prevent adsorption of monoterpenes on the wall capillary. It was observed that after several hours of use, the capillary started to lose its capacity of resolution of some peaks and any cleaning method was enough to reactive the capillary. A new capillary was used when this problem occurred.

## RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned in the introduction, MEKC has been successfully applied to the separation of a number of enantiomers and positional isomers. This is possible because of its ability to separate complex mixtures of isomers due to the solutes generated hydrophobic interaction with the micelle. CDs are widely used in analytical applications, especially as a mobile phase additive of the stationary phase in HPLC [17,18].

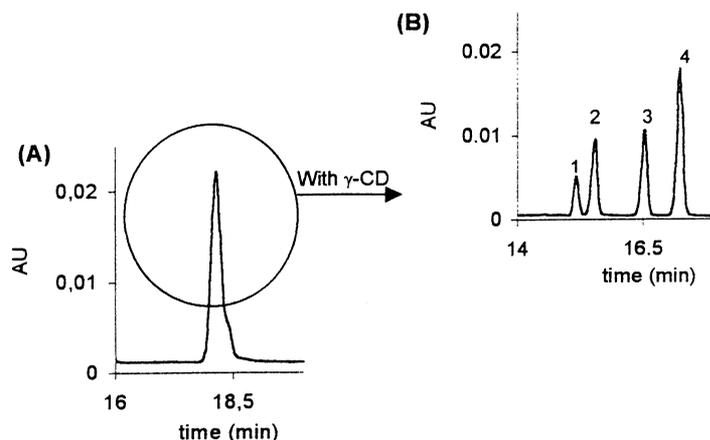
In this study, a mixture of phosphate/borate was used with a surfactant anionic SDS and a CD to obtain a buffer capable of separating mixtures of neutral compounds.

**Instrumental variables.** The influence of temperature on the resolution of terpenes was tested. On the basis of the results obtained, it was concluded that at 25°C a good resolution was achieved. Between 15 and 20°C, the migration times were longer and peak areas larger than those obtained at 25°C; as a consequence of that, broad and poor integration peaks were obtained. The increase in temperature from 20 to 30°C produced a decrease in the time of analysis because the analytes migrate faster at higher temperatures. However, higher temperature resulted in poorer sensitivity.

A diode array detector was used to determine the maximum absorbance of these monoterpenes. The UV detection was tested at 214, 210 and 200 nm. All monoterpenes presented a maximum absorbance at 200 nm.

The electro-osmotic flow-rate and the velocity of migration of the analytes are proportional to the applied voltage used for the separation. To optimize this variable, different voltages were tested (10, 15 and 20 kV). When the applied voltage was increased, the analysis time was shorter. A voltage of 20 kV seems to be a good compromise of sufficient resolution with acceptable speed of analysis. At 15 kV a good resolution of six monoterpenes was achieved but a longer time was required.

Hydrodynamic injection mode was used for introducing the samples into the capillary. The duration of hydrodynamic injection (3–10 s) was tested to achieve the sensitivity necessary for the separation of the monoterpenes. It was observed that 5 s was enough time and allowed a good resolution for the range of concentrations studied (1–20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

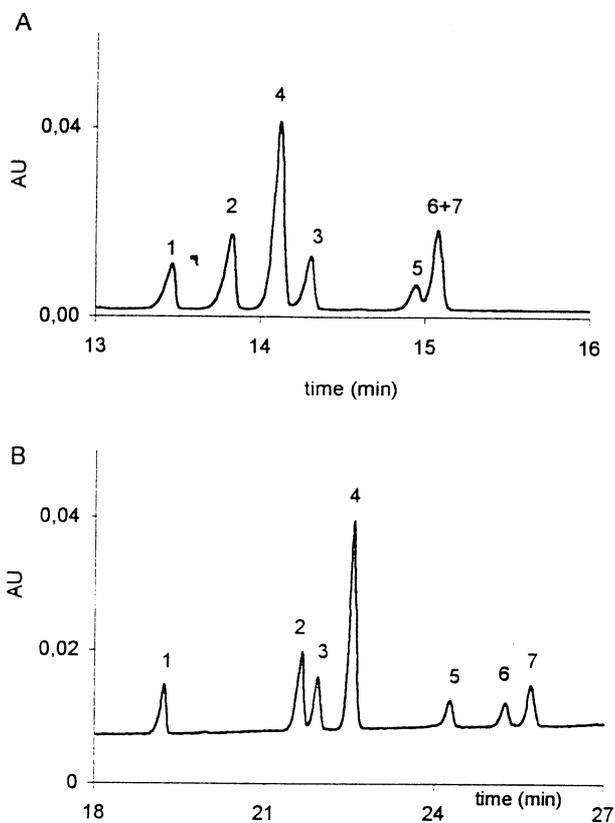


**Figure 2.** Study of the influence of the type of CD on the separation of the standard mixture. Compounds: (1) (+)-camphene, (2) (+)- $\beta$ -pinene, (3) (+)- $\alpha$ -pinene, and (4)  $\gamma$ -terpinene. (a) 10 mM  $\alpha$ -CD and (b) mM  $\gamma$ -CD. Conditions: Buffer: 10 mM phosphate, 6 mM borate of pH 8.0 containing 50 mM SDS and 5% of acetonitrile; fused-silica capillary 50 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  i.d.; applied voltage: 20 kV; detection: 200 nm; temperature: 25°C. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

**Chemical variables.** In using phosphate/borate/SDS buffer monoterpenes cannot be separated by MEKC since all substances migrate with the same velocity and only one peak was observed. CDs have been used as chiral additives to the electrophoretic buffer system due to the possibility of creating diastereomeric associates, which should be resolvable due to their different conformation and thus electrophoretic mobilities [21]. In a micellar solution, a monomeric surfactant, which is in equilibrium with the micelle, exists in an aqueous phase and it can be included by the CD because of the presence of the lipophilic hydrocarbon chain [14]. The type of CD in the separation of four monoterpenes, ((+)- $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene and (+)- $\alpha$ -pinene), was first investigated by using a buffer solution of 50 mM SDS, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , and 6 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , to which one of each CD was added individually. The separation was not effective using  $\alpha$  and  $\beta$ -CD. Nevertheless, in HPLC,  $\alpha$ -CD is reported as a good mobile phase additive to separate some enantiomers monoterpenes such as ( $\pm$ )- $\beta$ -pinene, ( $\pm$ )-camphene and ( $\pm$ )- $\alpha$ -pinene [17]. Terabe et al. [16] also reported that  $\beta$ -CD was used to separate hydrophobic compounds with a good resolution. The effects of CD concentration on the resolution of the mixture of monoterpenes were investigated using  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -CD over the concentration range 5–15 mM. When  $\alpha$ -CD was added to the running buffer, only one peak was observed [Figure 2(a)]. With  $\beta$ -CD, four peaks were achieved but the resolution was less than 1. However, with  $\gamma$ -CD, four monoterpenes were successfully resolved by CD-MEKC [Figure 2(b)]. The migration times of the solutes were considerably reduced with an increase of  $\gamma$ -CD concentration.

In order to test the buffer composition, concentrations of SDS and electrolytes ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) were also studied. The concentration of SDS was investigated on the range of 30–70 mM using  $\gamma$ -CD 7 mM in all cases. At 70 mM, the migration times were longer and two peaks unresolved. A further decrease in SDS concentration (30 mM) decreased the resolution, in spite of considerable decreases in migration times. The results obtained demonstrated that the optimum value to achieve the separation of the analytes of interest was at a SDS concentration of 50 mM. The composition of phosphate/borate was examined at concentration from 6 to 20 mM. The best results were obtained by using 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 6 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , respectively.

In addition to CDs, the separation or selectivity of MEKC can be manipulated by other additives as an organic modifier. Addition of acetonitrile or



**Figure 3.** Effect of the addition of acetonitrile in the separation of monoterpenes. Compounds: (1) (+)-camphene, (2) terpinolene, (3) (+)- $\beta$ -pinene, (4) p-cymene, (5) (+)- $\alpha$ -pinene, (6)  $\alpha$ -terpinene, and (7)  $\gamma$ -terpinene ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  each). Conditions: Buffer: 10 mM phosphate, 6 mM borate of pH 8.0 containing 50 mM SDS, 7 mM  $\gamma$ -CD and 5% of acetonitrile (a) and 10% of acetonitrile (b); fused-silica capillary 50 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  i.d.; applied voltage: 20 kV; detection: 200 nm; temperature: 25°C. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

methanol on the buffer was used to evaluate the migration times of seven [(+)- $\alpha$ -pinene, (+)- $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -terpinene, terpinolene,  $\gamma$ -terpinene, (+)-camphene and p-cymene] compounds. At the same concentration (5%) acetonitrile exhibits better resolution than methanol. A further increase in acetonitrile content improved the resolution, in spite of considerable increases in migration times. Addition of 5% of acetonitrile in the buffer solution [Figure 3(a)] resulted in the overlapping of two peaks ( $\alpha$ -terpinene and  $\gamma$ -terpinene), while an addition of 10% provided the separation of the seven monoterpenes [Figure 3(b)] but a longer time was required.

**Performance of the method.** Calibration graphs were obtained by injecting standard solutions of the

Table I. Figures of merit of the monoterpenes determined by using the proposed method.

Analyte	$y = a + bx$	$S_{y/x}$	$r$	$R^2$	RSD area (%)	RSD time (%)	LOD	LOQ
Camphene	$a = 0.061 \pm 1.43 \cdot 10^{-3}$	0.023	0.998	99.56	8.2	1.8	0.11	0.36
	$b = -0.039 \pm 1.20 \cdot 10^{-2}$							
Terpinolene	$a = 0.011 \pm 1.88 \cdot 10^{-3}$	0.030	0.999	99.77	7.1	2.1	0.08	0.26
	$b = -0.071 \pm 1.00 \cdot 10^{-2}$							
$\beta$ -Pinene	$a = 0.066 \pm 1.33 \cdot 10^{-3}$	0.021	0.998	99.67	6.4	1.9	0.11	0.40
	$b = -0.036 \pm 1.10 \cdot 10^{-2}$							
p-Cymene	$a = 0.321 \pm 6.97 \cdot 10^{-3}$	0.112	0.998	99.62	7.8	2.0	0.16	0.53
	$b = -0.131 \pm 5.90 \cdot 10^{-2}$							
$\alpha$ -Pinene	$a = 0.029 \pm 0.78 \cdot 10^{-3}$	0.013	0.997	99.43	7.6	2.0	0.12	0.41
	$b = -0.019 \pm 0.66 \cdot 10^{-2}$							
$\alpha$ -Terpinene	$a = 0.037 \pm 0.94 \cdot 10^{-3}$	0.015	0.998	99.50	7.1	2.1	0.11	0.36
	$b = -0.026 \pm 0.80 \cdot 10^{-2}$							
$\gamma$ -Terpinene	$a = 0.066 \pm 1.51 \cdot 10^{-3}$	0.024	0.998	99.58	7.4	2.1	0.12	0.40
	$b = -0.038 \pm 1.30 \cdot 10^{-2}$							

$a$  = intercept;  $b$  = slope;  $r$  = correlation coefficient;  $S_{y/x}$  = standard deviation of residuals;  $R^2$  = curve-fitting level (%) obtained by ANOVA for the validation of the method; RSD = relative standard deviation of the peak area and electrophoretic migration time values; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification. Concentration, LOD and LOQ are expressed in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Buffer: 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6 mM Na  $\beta$ -CD, 50 mM SDS, 7 mM  $\gamma$ -CD and 10% acetonitrile; pH 8.0; 20 kV; 25°C; 5 s hydrodynamic injection; 200 nm.

monoterpenes in a concentration range between 1–20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Each point of the calibration graph corresponded to three independent measurements of peak area. The corresponding regression equations and other parameters for the determination of the analytes studied are shown in the Table I. The individual area-concentration sets of value have been used to apply linear regression by the minimum least squares method. The limit of detection (LOD) was calculated by using three times the standard deviation of the intercept divided by the slope. The limit of quantification (LOQ) was calculated by using ten times the standard deviation of the intercept divided by the slope. Standard deviation of residuals ( $S_{y/x}$ ) and the curve-fitting level ( $R^2$ ) were obtained by

**Table II.** Analysis of synthetic samples by the proposed method in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Synthetic samples	Analytes	Amount added	Amount found	Recovery (%)
Sample 1	Camphene	10	10.22	102
	Terpinolene	3	2.89	96
	$\beta$ -Pinene	5	4.89	98
	p-Cymene	3	3.21	107
	$\alpha$ -Pinene	10	4.91	104
	$\alpha$ -Terpinene	5	5.00	100
	$\gamma$ -Terpinene	5	5.40	108
Sample 2	Camphene	5	5.19	104
	Terpinolene	5	4.91	98
	$\beta$ -Pinene	5	5.00	100
	p-Cymene	10	10.89	109
	$\alpha$ -Pinene	5	4.91	98
	$\alpha$ -Terpinene	3	2.87	94
	$\gamma$ -Terpinene	3	3.32	111
Sample 3	Camphene	3	3.21	107
	Terpinolene	1	0.97	97
	$\beta$ -Pinene	3	2.91	97
	p-Cymene	5	5.31	106
	$\alpha$ -Pinene	3	2.95	98
	$\alpha$ -Terpinene	10	10.76	108
	$\gamma$ -Terpinene	10	10.82	108
Sample 4	Camphene	15	15.16	101
	Terpinolene	10	10.00	100
	$\beta$ -Pinene	10	10.17	102
	p-Cymene	1	1.06	105
	$\alpha$ -Pinene	15	15.13	101
	$\alpha$ -Terpinene	1	0.93	93
	$\gamma$ -Terpinene	1	0.97	97
Sample 5	Camphene	1	1.00	100
	Terpinolene	3	2.91	97
	$\beta$ -Pinene	1	0.93	93
	p-Cymene	3	3.18	106
	$\alpha$ -Pinene	1	0.94	94
	$\alpha$ -Terpinene	5	5.00	100
	$\gamma$ -Terpinene	15	15.14	101

analysis of variance (ANOVA) in validation of the calibration model. A mean value of 0.03 was obtained for  $S_{y/x}$  whereas  $R^2$  was always higher than 98%. The proposed method allows monoterpenes to be determined at low levels (with LODs between 0.08–0.16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

In order to evaluate the precision of the method, eleven replicates were performed on the standard solution (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for each monoterpene). In all cases the relative standard deviation for the retention time were less than 2.1% and less than 8.2% for the peak area.

*Analytical applications.* In order to demonstrate the applicability of the proposed method, it was applied to the determination of seven monoterpenes in synthetic samples. Five synthetic samples were prepared for different concentrations of these analytes. The concentrations of each analyte in the different synthetic samples were different and similar to those present in real samples according with the data found in the literature [22,23]. The results are summarized in Table II, showing recoveries between 93 and 110%. This method could be used for the separation and quantification of monoterpenes in essential oils of leaves, and the flowers of marjoram and oregano among other real samples.

## REFERENCES

1. Kitagishi, K. In Handbook of Capillary Electrophoresis Applications; Shintani, H.; Polonsky, J., Eds.; Chapman & Hall: London, 1997; pp 1–14.
2. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. Anal Chem 1981, 53, 1298–1302.
3. Atria, K. D. In Capillary Electrophoresis Guidebook; Atria, K. D., Ed.; Humana Press: Hertfordshire, UK, 1996; pp 1–15.
4. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. Anal Chem 1984, 56, 111–113.
5. Otsuka, K.; Terabe, S. In Capillary Electrophoresis Guidebook; Atria, K. D., Ed.; Humana Press: Hertfordshire, UK, 1996; pp 125–155.
6. Swartz, M. E.; Mazzeo, J. R.; Grover, E. R. In Handbook of Capillary Electrophoresis Applications; Shintani, H.; Polonsky, J., Eds.; Chapman & Hall: London, 1997; pp 366–385.
7. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T. Anal Chem 1985, 57, 834–841.
8. Janini, G. M.; Muschik, G. M.; Issaq, H. J. Electrophoresis 1996, 17, 1575–1583.
9. Nishi, H.; Fukuyama, T.; Terabe, S. J Chromatogr 1991, 553, 503–516.
10. Nishi, H.; Terabe, S. Electrophoresis 1990, 11, 691–701.
11. Kuhn, R.; Kuhn, S. H. Chromatogr 1992, 34, 505–512.
12. Holland, R. D.; Sepaniak, M. J Anal Chem 1993, 65, 1140–1146.

13. Li, G.; Locke, D. C. *J Chromatogr A* 1996, 734, 357-365.
14. Gahm, K.-H.; Chang, L. W.; Armstrong, D. W. *J Chromatogr A* 1997, 759, 149-155.
15. Armstrong, D. W.; Zukowski, J. *J Chromatogr A* 1994, 666, 445-448.
16. Terabe, S.; Miyashita, Y.; Ishihama, Y.; Shibata, O. *J Chromatogr* 1993, 636, 47-55.
17. Nishi, H.; Terabe, S. *J Chromatogr A* 1995, 694, 245-276.
18. Terabe, S. *Trends Anal Chem* 1989, 8, 129-134.
19. Terabe, S.; Miyashita, Y.; Shibata, O. E.; Barnhart, R.; Alexander, L. R.; Patterson, D. J.; Karger, B. L.; Hosoya, K.; Tanaka, N. *J Chromatogr* 1990, 516, 23-31.
20. Temelli, F.; Braddock, R. J.; Chen, C. S.; Nagy, S. *ACS Symp Ser* 1988, 366, 109.
21. Guttman, A.; Paulus, A.; Cohen, A. S.; Grinberg, N.; Karger, B. L. *J Chromatogr* 1988, 448, 41-53.
22. Biondi, D.; Cianci, P.; Geraci, C.; Ruberto, G. *Flavor Fragr J* 1993, 8, 331-337.
23. Baratta, M. T.; Dorman, H. J. D.; Deans, S. G.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Ruberto, G. *Flavor Fragr J* 1998, 13, 235-244.

## Determination of Monoterpene Hydrocarbons and Alcohols in *Majorana hortensis* Moench by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatographic

M. R. A. RODRIGUES,<sup>†</sup> E. B. CARAMÃO,<sup>‡</sup> L. ARCE,<sup>§</sup> A. RÍOS,<sup>§</sup> AND  
 M. VALCÁRCEL<sup>\*,§</sup>

Institute of Chemistry and Geology, University Federal of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil,  
 Institute of Chemistry, University of Rio Grande do Sul, 91501970 Porto Alegre, RS, Brazil, and  
 Analytical Chemistry Division, Campus de Rabanales, Edificio Anexo C-3, University of Córdoba,  
 E-14071 Córdoba, Spain

Micellar electrokinetic capillary chromatography was used to determine the essential oils obtained by steam distillation of different samples of marjoram (*Majorana hortensis* Moench) dried leaves and flowers. The electrophoretic method consisted of a running buffer of 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM SDS, 7 mM  $\gamma$ -cyclodextrin, and 10% acetonitrile, adjusted to pH 8.0 by the addition of 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The following monoterpene hydrocarbons and alcohol compounds were extracted from real samples and determined by the method proposed:  $\alpha$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -terpinene, terpinolene, *p*-cymene, linalool,  $\alpha$ -terpineol, and terpinen-4-ol. The most prominent component of dried leaves, flowers, and commercial samples was terpinen-4-ol in four of the samples analyzed; only in one sample was  $\alpha$ -terpineol present as the major compound.

**KEYWORDS:** *Majorana hortensis* Moench; essential oil; micellar electrokinetic capillary chromatography; monoterpene hydrocarbons and alcohols

### INTRODUCTION

The vernacular term marjoram comprises several aromatic Labiatae herbs belonging to different species. *Origanum majorana* L. (syn. *Majorana hortensis* Moench., *M. vulgaris* Miller) is the type of marjoram most well-known. This type of sample is a native of Cyprus and southern Turkey. It is cultivated extensively as sweet marjoram, an annual herb, in several areas of Europe, Africa, America, and Asia. The dried leaves of sweet marjoram are widely used by the food industry as flavoring agents for dressings and soups and in the formulation of vermouth and bitters, among others (1–3). The essential (volatile) oil of sweet marjoram has been known since antiquity due to its biological activities, such as antibacterial, antifungal, and antioxidant properties. For all of these reasons, the flavor composition of cultivated marjoram has been investigated in recent years (4, 5). Nykänen (6) has demonstrated that the aroma composition varies with the origin of plants and many other factors. These authors found essential oils of marjoram with high contents of monoterpene alcohols and other phenols. The term essential oil implicates by definition the method of preparation, namely, the separation of volatile substances by distillation at atmospheric pressure and elevated temperature

(7). In some oils, terpinen-4-ol was the major component, alone or together with other monoterpene alcohols such as *cis*- and *trans*-sabinene hydrate and  $\alpha$ -terpineol. High contents of carvacrol (65%) were found in marjoram oil by Sarer et al. (3), whereas Nykänen (6) reported a type of marjoram oil with high levels of thymol (up to 47%).

Other methods of distillation, such as simultaneous steam distillation–extraction (SDE) and supercritical fluid extraction (SFE), can also produce high-quality essential oils from herbaceous materials (8, 9). Capillary gas chromatography with mass spectrometry was widely used to analyze the composition of essential oils (3–12). High-performance liquid chromatography (HPLC) is widely employed for the determination of antioxidants present in extracts from plants (13, 14). Nowadays, micellar electrokinetic capillary chromatographic (MEKC) is also used for the separation and quantification of these hydrophobic antioxidants, which can be present as different enantiomeric compounds (15, 16). MEKC is a mode of capillary electrophoresis based on different partitioning of the analytes between the micelle and aqueous phase. The addition of modifiers was necessary to separate compounds that migrated at the same velocity as the micelle. For the separation of this type of analyte, cyclodextrins ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) and organic solvents such as methanol and acetonitrile are generally employed.

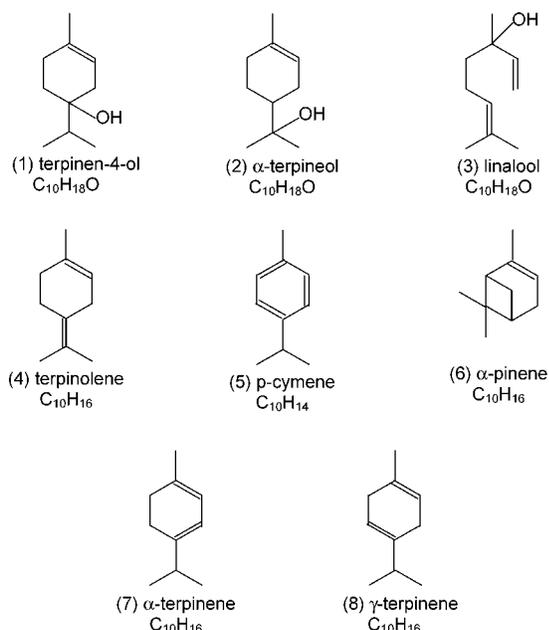
Determination of the chemotype in marjoram samples is very important for the industry and in some biomedical research works. Monoterpene alcohols are the main aroma components

\* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail: qa1rica@uco.es.).

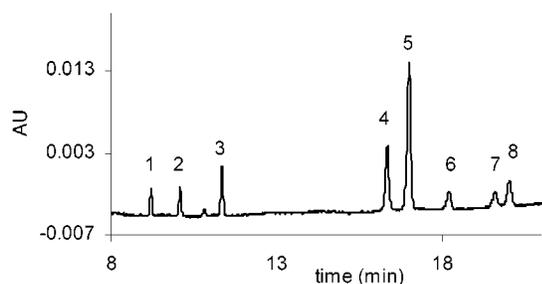
<sup>†</sup> University Federal of Pelotas.

<sup>‡</sup> University of Rio Grande do Sul.

<sup>§</sup> University of Córdoba.



**Figure 1.** Chemical structures of the monoterpene alcohols and hydrocarbons used in this study.



**Figure 2.** Electropherogram of eight monoterpene alcohols and hydrocarbons. Peaks: (1) terpinen-4-ol, (2) α-terpineol, (3) linalool, (4) terpinolene, (5) *p*-cymene, (6) (+)-α-pinene, (7) α-terpinene, and (8) γ-terpinene. Conditions: buffer, 10 mM phosphate, 6 mM borate, 50 mM SDS, 7 mM γ-CD, and 10% acetonitrile; pH 8.0; fused-silica capillary, 40 cm × 75 μm i.d.; applied voltage, 20 kV; detection, 200 nm; temperature, 25 °C.

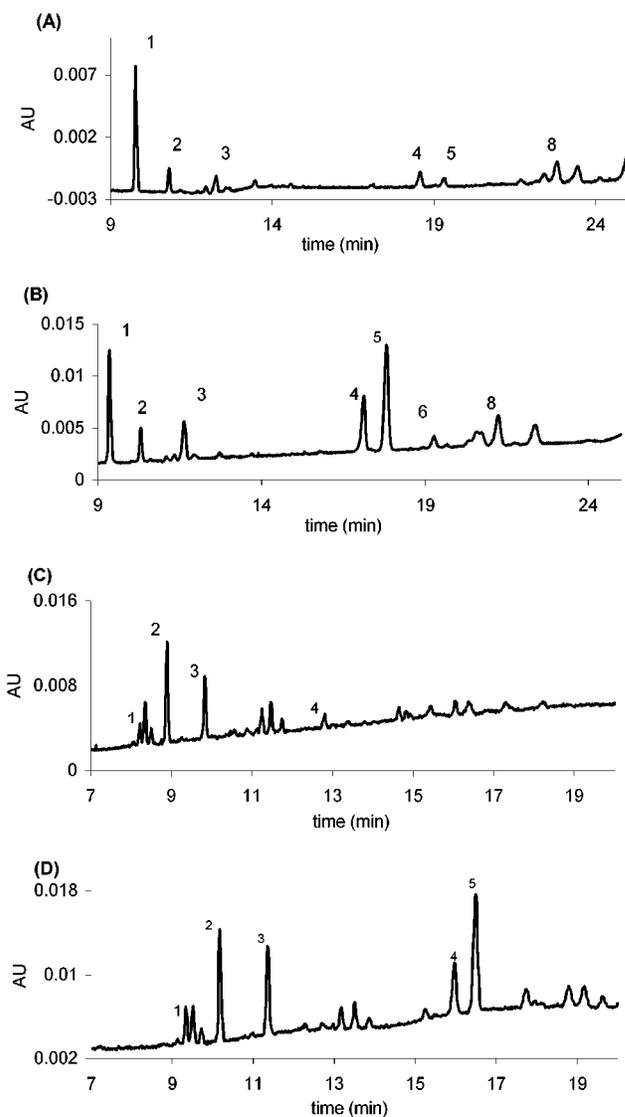
of fresh marjoram. The identification of the compounds studied in this work could be used to classify these samples according to their geographical origin and to detect fraud in commercial samples.

In this work, steam distillation was used for the extraction of essential oil from dried leaves and flowers of *Majorana hortensis* Moench. Different samples cultivated in the south of Brazil and in Spain were used. MEKC was used for the separation and quantification of eight monoterpene hydrocarbons and alcohols present in these types of samples. These compounds were chosen because they are a majority in these types of samples.

A review of the literature found no references dealing with the determination of these compounds in marjoram samples by MEKC. The method previously developed by the authors (17) for the separation and quantification of seven monoterpene hydrocarbons was adapted to include monoterpene alcohols.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Samples.** Seeds of *M. hortensis* Moench were acquired from The Netherlands (M1), Denmark (M2), and Germany (M3), and they were cultivated under the control of the Agricultural Experimental Station



**Figure 3.** Electropherograms of eight monoterpene alcohols and hydrocarbons in (A) essential oil of marjoram M2, (B) essential oil of marjoram M2 spiked with 5 μg mL<sup>-1</sup> of each monoterpene alcohol and hydrocarbon, (C) essential oil of marjoram M4, and (D) essential oil of marjoram M4 spiked with 5 μg mL<sup>-1</sup> of each monoterpene alcohol and hydrocarbon. Peaks: (1) terpinen-4-ol, (2) α-terpineol, (3) linalool, (4) terpinolene, (5) *p*-cymene, (6) (+)-α-pinene, (7) α-terpinene, and (8) γ-terpinene. Conditions: see Figure 2.

(FEPAGRO) in southern Brazil. Voucher specimens were identified and deposited at the herbarium of FEPAGRO. Fresh leaves and flowers from these plants dried at room temperature for 3 weeks were used in this study. Commercially available marjoram samples were purchased in markets, one from Sevilla in southern Spain (M4) and another from Soria, in northern Spain (M5).

**Standards.** Monoterpene alcohols and hydrocarbons (see Figure 1) such as terpinen-4-ol, α-terpineol, linalool, terpinolene, *p*-cymene, α-terpinene, and γ-terpinene were obtained from Fluka, and (+)-α-pinene was from Sigma. γ-Cyclodextrin was obtained from Fluka, and sodium dodecyl sulfate (SDS) was obtained from Sigma. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> were obtained from Aldrich. Stock solutions (1000 μg mL<sup>-1</sup>) of each monoterpene were made up in methanol, and all were stored in the refrigerator.

**Isolation of Essential Oil.** Fresh and dried leaves and commercially available plant material (40 g) were subjected to hydrodistillation until there was no significant increase in the volume of the collected oil (4.5 h) in a Clevenger-type apparatus (18–20). The isolated oils were dried over anhydrous sodium sulfate and stored under N<sub>2</sub> in a sealed

Table 1. Figures of Merit of the Monoterpene Hydrocarbons and Alcohols<sup>a</sup>

analyte	$y = a + bx$	$S_{y/x}$	$r$	$R^2$	RSD area (%)	RSD time (%)	LOD	LOQ
terpinen-4-ol	$a = 0.52 \times 10^{-2} \pm 0.73 \times 10^{-2}$ $b = 2.32 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2}$	0.015	0.996	99.23	5.5	2.3	0.94	3.14
$\alpha$ -terpineol	$a = 0.26 \times 10^{-2} \pm 1.06 \times 10^{-2}$ $b = 3.01 \times 10^{-2} \pm 0.09 \times 10^{-2}$	0.022	0.995	99.04	5.4	2.2	1.06	3.54
linalool	$a = -0.37 \times 10^{-2} \pm 0.17 \times 10^{-2}$ $b = 5.76 \times 10^{-2} \pm 0.15 \times 10^{-2}$	0.035	0.997	99.34	8.1	2.9	0.09	0.30
terpinolene	$a = -14.96 \times 10^{-2} \pm 5.36 \times 10^{-2}$ $b = 14.79 \times 10^{-2} \pm 0.48 \times 10^{-2}$	0.112	0.995	98.97	8.0	2.8	1.09	3.62
$p$ -cymene	$a = -16.92 \times 10^{-2} \pm 11.68 \times 10^{-2}$ $b = 33.27 \times 10^{-2} \pm 1.04 \times 10^{-2}$	0.243	0.995	99.04	7.6	2.7	1.05	3.51
$\alpha$ -pinene	$a = -6.90 \times 10^{-2} \pm 1.46 \times 10^{-2}$ $b = 4.71 \times 10^{-2} \pm 0.13 \times 10^{-2}$	0.030	0.994	99.25	8.0	2.8	0.93	3.10
$\alpha$ -terpinene	$a = -4.30 \times 10^{-2} \pm 1.40 \times 10^{-2}$ $b = 4.38 \times 10^{-2} \pm 0.12 \times 10^{-2}$	0.029	0.996	99.19	6.3	2.5	0.96	3.20
$\gamma$ -terpinene	$a = -8.72 \times 10^{-2} \pm 3.54 \times 10^{-2}$ $b = 8.18 \times 10^{-2} \pm 0.31 \times 10^{-2}$	0.074	0.993	98.54	7.5	2.7	1.30	4.33

<sup>a</sup>  $a$  = intercept;  $b$  = slope;  $r$  = correlation coefficient;  $S_{y/x}$  = standard deviation of residuals;  $R^2$  = curve-fitting level (%) obtained by ANOVA for the validation of the method; RSD = relative standard deviation of the peak area and electrophoretic migration time values; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification. Concentration, LOD, and LOQ are expressed in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Buffer: 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 50 mM SDS, 7 mM  $\gamma$ -CD, and 10% acetonitrile; pH 8.0; 20 kV; 25 °C; 5 s hydrodynamic injection; 200 nm.

vial until required. Stock solutions ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of each essential oil were dissolved in methanol, and all were stored in the refrigerator.

**Apparatus and Electrophoretic Separation Conditions.** A Beckman P/ACE 5500 capillary electrophoresis system equipped with a diode array detector and a System Gold data station were used in this study. A fused-silica capillary column, 75  $\mu\text{m}$  i.d. with an effective length (between inlet and detector) of 40 cm (total length = 47 cm), was used for the separation of the analytes.

All of the separations were performed at a temperature of 25 °C, and the applied voltage was 20 kV (average current = 75  $\mu\text{A}$ ). The samples were hydrostatically (5 s) introduced into the anodic end of the capillary. Detection was recorded at 200 nm. The electrolyte consisted of 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 6 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 50 mM SDS, 7 mM  $\gamma$ -cyclodextrin, and 10% acetonitrile, adjusted to pH 8.0 by the addition of 0.1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Daily, the capillary was rinsed for 10 min with deionized water, for 10 min with 0.1 M NaOH, for 5 min with deionized water, and for 15 min with running buffer. The flush between runs was of 1 min with deionized water, 0.1 M NaOH (2 min), deionized water (2 min), and buffer (3 min). These steps were necessary to prevent the adsorption of monoterpenes on the wall of the capillary. New capillaries were conditioned for 5 min with deionized water, for 10 min with 1 M HCl, for 5 min with deionized water, for 10 min with 0.1 M NaOH, for 5 min with deionized water, and for 20 min with running buffer. Working standard solutions of mixtures were obtained by appropriate dilution in water of the stock standard solutions, and they were prepared fresh daily.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Extraction of Essential Oils.** Leaves and flowers of five samples of marjoram (M1, The Netherlands; M2, Denmark; M3, Germany; M4, Sevilla, Spain; and M5, Soria, Spain) were air-dried and subjected to hydrodistillation using a Clevenger apparatus to produce oils with a yield between 1.1 and 1.4% w/v (M1 = 1.2%, M2 = 1.2%, M3 = 1.4%, M4 = 1.2%, and M5 = 1.1%). These values were comparable with those reported in the literature (2, 21).

**Separation and Determination of Analytes.** The first step was to test the separation of the eight monoterpenes by using standards. A good separation of the analytes was achieved following the electrophoretic conditions previously reported by

the authors (17). The method was evaluated by means of calibration curves and reproducibility experiments and by using the buffer and conditions mentioned under Experimental Procedures. Table 1 shows the corresponding regression equations and other parameters obtained for all monoterpenes electrophoretically separated in a concentration range between 1 and 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Standard deviation of residuals ( $S_{y/x}$ ) and curve-fitting level ( $R^2$ ) were obtained by analysis of variance (ANOVA) during the validation of the calibration model. Values between 0.24 and 0.01 were obtained for  $S_{y/x}$  in all cases, whereas  $R^2$  was always >98.54% for the analytes determined. The limit of detection (LOD) was calculated by using 3 times the standard deviation of the intercept divided by the slope, whereas the limit of quantification (LOQ) was calculated from 10 times the standard deviation of the intercept divided by the slope. The proposed method allows the determination of monoterpenes at low concentration levels (LODs between 0.09 and 1.30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The LOQs obtained were between 0.3 and 4.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for all monoterpenes. Eleven replicates were performed on the standard solution (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for each monoterpene). In all cases the relative standard deviations (RSDs) for the retention times were <2.9% and <8.1% for the peak areas.

**Analytical Applications to Real Samples.** The proposed method was applied to the direct determination of eight analytes in five marjoram samples. Using the experimental conditions optimized in a previous work (17), optimum separation and quantification were obtained for monoterpene alcohols and hydrocarbons. Figure 2 shows an electropherogram of eight monoterpenes at 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The UV-visible spectra of all monoterpenes were very similar;  $\alpha$ -pinene presents a spectrum slightly different because its structure is bicyclic, despite its being an isomer of the other monoterpene hydrocarbons in this study.

Solutions of each marjoram sample (M1–M5) were injected at various levels of concentration (10–500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentration was selected for the analysis of real samples due to good resolution achieved between the peaks

Table 2. Determination of the Analytes in Marjoram Samples Using the Proposed Method

analyte	real sample	concn ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		recovery (%)	concn in real sample ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	real sample	concn ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		recovery (%)	concn in real sample ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
		added	found				added	found		
terpinen-4-ol	marjoram 1	1	0.8	80.4	31.4	marjoram Sevilla	1	1.1	103.5	4.2
		3	3.2	107.2			3	2.9	96.8	
		5	5.5	109.1			5	5.1	100.8	
		10	11.0	110.1			10	10.3	103.4	
		15	15.7	104.7			15	15.6	103.8	
	marjoram 2	1	1.1	105.4	24.8	marjoram Soria	1	1.1	111.1	20.0
		3	2.6	87.0			3	3.1	103.8	
		5	4.8	95.9			5	5.1	101.6	
		10	10.5	104.5			10	10.5	105.1	
		15	15.5	103.0			15	15.5	103.3	
	marjoram 3	1	0.9	97.8	34.5		1	0.9	97.8	
		3	3.2	108.2			3	3.2	108.2	
		5	5.1	101.3			5	5.1	101.3	
		10	10.4	104.1			10	10.4	104.1	
		15	15.0	100.0			15	15.0	100.0	
$\gamma$ -terpinene	marjoram 2	1	0.9	94.4	6.4	marjoram Soria	1	1.0	100.0	10.4
		3	3.2	105.5			3	3.1	103.1	
		5	5.2	104.1			5	5.4	108.7	
		10	10.1	101.1			10	9.9	99.1	
		15	14.8	98.5			15	15.7	104.4	
	marjoram 3	1	1.1	108.5	19.8		1	1.1	108.5	
		3	3.0	100.0			3	3.0	100.0	
		5	5.2	104.6			5	5.2	104.6	
		10	10.6	106.2			10	10.6	106.2	
		15	15.0	100.0			15	15.0	100.0	
linalool	marjoram 1	1	1.0	100.0	3.4	marjoram Sevilla	1	0.9	96.3	5.1
		3	2.9	97.5			3	2.8	95.0	
		5	5.2	104.4			5	5.1	100.7	
		10	10.1	100.6			10	10.2	102.0	
		15	15.0	100.0			15	15.8	105.2	
	marjoram 2	1	1.0	100.0	4.5	marjoram Soria	1	0.9	98.9	3.6
		3	3.3	108.5			3	3.1	101.4	
		5	5.4	107.4			5	5.1	101.6	
		10	10.6	105.7			10	10.1	100.8	
		15	14.9	99.5			15	14.9	99.1	
	marjoram 3	1	0.8	81.4	3.5		1	0.8	81.4	
		3	3.1	103.7			3	3.1	103.7	
		5	5.6	112.3			5	5.6	112.3	
		10	9.3	93.1			10	9.3	93.1	
		15	15.5	103.6			15	15.5	103.6	
$\alpha$ -pinene	marjoram 2	1	1.0	100.0	ND <sup>a</sup>	marjoram Soria	1	0.8	82.4	1.0
		3	3.1	101.4			3	3.1	103.1	
		5	5.1	101.2			5	5.4	108.7	
		10	9.9	99.5			10	10.1	101.0	
		15	15.1	100.7			15	15.4	102.9	
$\alpha$ -terpinene		1	1.0	100.0		marjoram Soria	1	1.0	100.0	10.9
		3	3.2	107.9			3	3.2	107.9	
		5	5.0	100.0			5	5.0	100.0	
		10	10.1	101.3			10	10.1	101.3	
		15	15.0	100.0			15	15.0	100.0	
$\alpha$ -terpineol	marjoram 1	1	0.8	85.5	7.9	marjoram Sevilla	1	1.0	100.0	14.0
		3	3.2	105.7			3	2.8	92.7	
		5	5.4	108.3			5	5.1	101.9	
		10	10.1	100.5			10	10.6	106.2	
		15	15.3	101.8			15	14.9	99.4	
	marjoram 2	1	0.9	94.7	8.5	marjoram Soria	1	1.0	100.0	7.2
		3	3.2	105.3			3	3.1	104.3	
		5	5.3	105.6			5	5.3	106.7	
		10	10.6	106.2			10	10.3	102.5	
		15	14.4	96.0			15	15.0	100.0	
	marjoram 3	1	0.9	93.5	5.4		1	0.9	93.5	
		3	3.1	104.8			3	3.1	104.8	
		5	4.9	99.3			5	4.9	99.3	
		10	9.8	97.8			10	9.8	97.8	
		15	16.0	106.3			15	16.0	106.3	

Table 2. (Continued)

analyte	real sample	concn ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		recovery (%)	concn in real sample ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	real sample	concn ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		recovery (%)	concn in real sample ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
		added	found				added	found		
terpinolene	marjoram 1	1	0.9	94.7	ND <sup>a</sup>	marjoram Sevilla	1	1.2	113.3	0.3
		3	2.7	88.7			3	2.9	96.9	
		5	5.3	105.3			5	5.1	101.0	
		10	10.4	104.1			10	10.0	100.0	
		15	15.5	103.3			15	16.0	106.5	
	marjoram 2	1	0.8	80.7	1.6	marjoram Soria	1	1.0	100.0	4.0
		3	3.1	101.1			3	3.2	105.2	
		5	5.5	109.0			5	5.5	109.3	
		10	10.5	105.2			10	10.6	105.6	
		15	14.3	95.5			15	14.6	97.6	
	marjoram 3	1	0.9	98.0	2.0		1	0.9	98.2	ND
		3	3.0	100.0			3	2.7	90.6	
		5	4.9	99.3			5	4.7	94.9	
		10	10.5	105.5			10	10.0	100.0	
		15	15.0	100.0			15	15.3	102.1	
<i>p</i> -cymene	marjoram 1	1	0.8	81.8	ND	marjoram Sevilla	1	0.9	98.2	ND
		3	2.6	87.3			3	2.7	90.6	
		5	5.1	101.9			5	4.7	94.9	
		10	10.8	107.6			10	10.0	100.0	
		15	15.2	101.0			15	15.3	102.1	
	marjoram 2	1	0.9	89.5	0.3	marjoram Soria	1	0.8	81.8	2.5
		3	3.1	101.1			3	3.1	101.5	
		5	4.9	97.6			5	5.5	109.4	
		10	10.5	105.0			10	9.9	99.3	
		15	14.7	97.9			15	14.1	94.3	
	marjoram 3	1	0.8	83.5	0.8		1	0.8	83.5	0.8
		3	3.1	104.3			3	3.1	104.3	
		5	5.5	109.9			5	5.5	109.9	
		10	10.0	100.0			10	10.0	100.0	
		15	15.1	100.4			15	15.1	100.4	

<sup>a</sup> ND, not detected.

found in real samples at this level of concentration. To validate the proposed analytical method, the marjoram samples were spiked with a standard mixture. A 10 mL volume of each solution of marjoram sample ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was spiked at five different concentration levels, 1, 3, 5, 10, and  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ , for each monoterpene. The results are summarized in **Table 2**, showing recoveries between 80 and 113%, as was expected, because at lower concentration it was difficult to separate some monoterpenes that presented poor absorbance in the UV-visible zone. As one of the objectives of this work was to classify marjoram samples on the basis of the main chemotypes, for this purpose it is not necessary to identify all of the analytes in the samples analyzed. According to the results shown in **Table 2**, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, and linalool were present in all samples. Terpinen-4-ol is the major component in samples M1, M2, M3, and M5, and  $\alpha$ -terpineol is the most prominent in M4. **Figure 3** shows electropherograms of two real samples (M2 and M4) of essential oils. In these electropherograms it was observed that terpinen-4-ol is the major component in sample M2 (see **Figure 3A**), whereas  $\alpha$ -terpineol was the major terpene in sample M4 (see **Figure 3C**). When sample M2 was spiked with different amounts of monoterpene alcohols and hydrocarbons,  $\alpha$ -terpinene was not found because its peak was overlapped with other components (see **Figure 3B**). In the real sample M4, *p*-cymene,  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -terpinene, and  $\gamma$ -terpinene were not found (see **Figure 3C**). When sample M4 was spiked with the analytes of interest, components such as  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -terpinene, and  $\gamma$ -terpinene were not found because their peaks overlapped with other components present in the matrix of the real sample (see **Figure 3D**).

These results are of great importance to classify marjoram samples on the basis of their main chemotypes. Nykänen (6)

found terpinen-4-ol as the most prominent component in essential oils of marjoram samples cultivated in Finland. This author reported that the investigations of the essential oils of marjoram have shown that the aroma composition varies according to the geographical origin of the plants. Oberdieck (12) analyzed essential oils from marjoram samples of various origins (Germany, France, Hungary, Portugal, Egypt, Turkey, and Romania), and the main terpene found in these samples was terpinen-4-ol. Other authors (3, 10) found in essential oils from marjoram samples cultivated in Turkey that carvacrol was the major component. These investigations conclude that there are two chemotypes of marjoram oils: *cis*-sabinene hydrate/terpinen-4-ol type and carvacrol/thymol type. However, Charai et al. (5) reported that linalool was the major component found in marjoram oils, and they classified this plant as a linalool chemotype. The importance of the identification of this type of compounds is related with the information obtained to check if the marjoram oils were obtained by distillation of *M. hortensis* Moench (syn. *Origanum majorana* L.) or from other species (3). Marjoram samples (*M. hortensis* Moench) cultivated in the south of Brazil and the north of Spain presented similar electropherograms and could be considered to be of the terpinen-4-ol chemotype. Probably, both samples were cultivated under the same conditions of temperate climate and geographical region, whereas marjoram cultivated in the south of Spain was grown in a different geographical region with a very hot and arid climate.

**Conclusions.** The aim of this paper was to demonstrate the usefulness of the method previously developed by the authors to separate monoterpenes in real samples. Despite sample matrices that were very complex, separations and quantification of some monoterpene alcohols and hydrocarbons present in these

real samples were carried out. The electrophoretic method developed was applied for the identification and quantification of at least eight monoterpenes in this type of matrix for the first time. Moreover, it should be applied to other essential oils that have other types of monoterpenes. The use of this capillary electrophoresis technique for the analysis of marjoram samples can be considered as a new alternative to gas chromatography, the classical technique used at this time.

#### LITERATURE CITED

- (1) Kokkini, S. Herbs of the Labiatae. In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*; Academic Press: London, U.K., 1993; Vol. 4, pp 2342–2348.
- (2) Guenther, E. Oil of Marjoram. In *The Essential Oils*; Van Nostrand: New York, 1949; Vol. III, pp 519–545.
- (3) Särer, E.; Scheffer, J. J. C.; Svendsen, A. B. Monoterpenes in the Essential Oil of *Origanum majorana*. *Planta Med.* **1982**, *46*, 236–239.
- (4) Baratta, M. T.; Dorman, H. J. D.; Deans, S. G.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Ruberto, G. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Some Commercial Essential Oils. *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13*, 235–244.
- (5) Charai, M.; Mosaddak, M.; Faid, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Two Aromatic Plants: *Origanum majorana* L. and *Origanum compactum* Benth. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 657–664.
- (6) Nykänen, I. High-Resolution Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of the Flavor Composition of Marjoram (*Origanum majorana* L.) Cultivated in Finland. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1986**, *183*, 172–176.
- (7) Fischer, N.; Nitz, S.; Drawert, F. Original Composition of Marjoram Flavor and Its Changes during Processing. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 996–1003.
- (8) Fischer, N.; Nitz, S.; Drawert, F. Original Flavour Compounds and the Essential Oil Composition of Marjoram (*Majorana hortensis* Moench). *Flavour Fragrance J.* **1987**, *2*, 55–61.
- (9) Reverchon, E.; Donsì, G.; Pota. Extraction of Essential Oils Using Supercritical CO<sub>2</sub>: Effect of Some Process and Pre-Process Parameters. *Ital. J. Food Sci.* **1992**, *3*, 187–194.
- (10) Baser, K. H. C.; Kirimer, N.; Tümen, G. Composition of the Essential Oil of *Origanum majorana* L. from Turkey. *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 577–579.
- (11) Biondi, D.; Cianci, P.; Geraci, C.; Ruberto, G. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Sicilian Aromatic Plants. *Flavour Fragrance J.* **1993**, *8*, 331–337.
- (12) Oberdieck, R. Ein Beitrag zur Kenntnis und Analytik von Majoran (*Majorana hortensis* Moench). *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **1981**, *77*, 63–74.
- (13) Tena, M. T.; Valcárcel, M.; Hidalgo, P. J.; Ubera, J. L. Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 521–526.
- (14) Okamura, N.; Fujimoto, Y.; Kuwabara, S.; Yagi, A. High-Performance Liquid Chromatography Determination of Carnosic and Carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *J. Chromatogr. A* **1994**, *679*, 381–386.
- (15) Terabe, S.; Miyashita, Y.; Ishihama, Y.; Shibata, O. Cyclodextrin-modified Micellar Electrokinetic Chromatography: Separation of Hydrophobic and Enantiomeric Compounds. *J. Chromatogr.* **1993**, *636*, 47–55.
- (16) Verschure, M.; Sandra, P. Fractionation by SFE and Microcolumn Analysis of the Essential Oil and the Bitter Principles of Hops. *J. Chromatogr. Sci.* **1992**, *30*, 388–391.
- (17) Rodrigues, M. R. A.; Caramão, E. B.; Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M. Use of Cyclodextrins for the Separation of Monoterpene Isomers by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Microcolumn Sep.* **2001**, *13*, 293–299.
- (18) Guenther, E. Determination of Essential Oil Content of Plant Material and Oleoresins. In *The Essential Oils*; Van Nostrand: New York, 1948; Vol. I, pp 316–319.
- (19) Woodbury, J. E. Volatile Oil in Spices (AOAC 962.17). In *Spices and Other Condiments*; AOAC: Gaithersburg, MD, 1990; p 1001.
- (20) Ertl, F. Procedure Modification of AOAC Official Method 962.17, Volatile Oil in Spices. *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 901–906.
- (21) Taskinen, J. Composition of the Essential Oil of Sweet Marjoram Obtained by Distillation with Steam and by Extraction and Distillation with Alcohol-Water Mixture. *Acta Chem. Scand. B* **1974**, *28*, 1121–1128.

---

Received for review December 17, 2001. Revised manuscript received April 29, 2002. Accepted May 1, 2002. Financial support was provided from Spain's DGI of MCI within the framework of Project BQU2001-1815. M.R.A.R. acknowledges Brazil's Foundation CAPES program for a scholarship.

JF011667N



Fotografia 1 - Unidade em escala de laboratório que consiste basicamente de um cilindro de CO<sub>2</sub>, dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 260D), um reator em aço inoxidável (200 mL), um transdutor (Smar, LD301), equipado com um sistema para aquisição de dados (Smar, HT 201) com uma precisão de  $\pm 0,012$  MPa e um tubo coletor de vidro.



Fotografia 2 - Unidade em escala de laboratório: em detalhe o reator em aço inoxidável, o transdutor, o sistema de aquecimento do restritor e o tubo coletor de vidro.